

家兔 γ 干扰素基因的原核表达及其表达产物的单克隆抗体的制备

彭伟^{1,2}, 宋艳华², 胡波², 范志宇², 魏后军², 王芳^{1,2*}, 姜平^{1*}

(1. 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院 兽医研究所 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 将 PCR 扩增的家兔 γ 干扰素基因克隆至 pET-28a(+) 原核表达载体上, 构建重组载体 pET-28a(+)-IFN- γ 。重组载体转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导、HisTrap 亲和柱纯化, 获得 IFN- γ 重组蛋白。以 IFN- γ 重组蛋白为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 通过杂交瘤细胞技术获得 4 株抗 IFN- γ 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别被命名为 3H8、4G4、4F10、6C12, 它们的亚型分别为 IgG1- κ 链, IgG2b- κ 链, IgG1- κ 链, IgG1- κ 链。分别制备单克隆抗体腹水, 结果, 4 株单克隆抗体腹水的间接 ELISA 效价在 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 之间。本试验通过制备抗家兔 IFN- γ 单克隆抗体, 为研究和检测 IFN- γ 提供了一种重要的工具。

关键词: 家兔; γ 干扰素; 原核表达; 单克隆抗体

Prokaryotic expression of IFN- γ gene from rabbit and preparation of the monoclonal antibodies against the recombinant rabbit IFN- γ

PENG Wei^{1,2}, SONG Yan-hua², HU Bo², FAN Zhi-yu², WEI Hou-jun², WANG Fang^{1,2}, JIANG Ping¹

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products/Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The IFN- γ gene was amplified by PCR from rabbit and cloned into pET-28a(+) to generate the recombinant pET-28a-IFN- γ plasmid. The recombinant plasmid was then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). The recombinant IFN- γ protein was expressed by inducing with IPTG and purified with HisTrap affinity chromatography. With the fusion of the spleen cells from the recombinant protein immunized BALB/c mice and mouse myeloma cells (SP2/0), four hybridoma cell lines were prepared for secreting monoclonal antibodies (McAbs) against IFN- γ . The McAb was named as 3H8, 4G4, 4F10 and 6C12, and belongs to the subtype of IgG1- κ , IgG2b- κ , IgG1- κ and IgG1- κ , respectively. The antibody titers of the ascites produced against McAbs were 10^{-4} to 10^{-5} by ELISA measurement. In the present study, the rabbit anti-IFN- γ monoclonal antibodies were prepared and thus provides an important means for the study and detection of IFN- γ .

Key words: rabbit; IFN- γ ; prokaryotic expression; monoclonal antibody

干扰素(interferon, IFN)是一类由脊椎动物单核细胞或淋巴细胞在受到病毒或其他诱生剂的作用时产生的一种分泌性可溶糖蛋白,具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等多种生物学活性。1957年英国学

者 Isaacs 等^[1]首先从鸡体内发现了病毒感染的细胞能产生一种因子,它作用于其他细胞能干扰病毒的复制,因而被命名为干扰素。研究表明,内源性 IFN- γ 水平的高低在很大程度上可以反映机体的细

收稿日期: 2014-04-10; 修回日期: 2014-08-22

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-44); 江苏省自主创新项目(CX(13)5029)

作者简介: 彭伟(1990-),男,河南信阳人,硕士生。*通信作者: 姜平,教授,主要从事猪禽疫病病原分子生物学的研究, E-mail: jiangp@njau.edu.cn; 王芳,研究员,主要从事畜禽传染病防控技术的研究, E-mail: rwangfang@126.com

胞免疫状态,对样本中的 IFN- γ 进行定量分析,在免疫机制研究、免疫功能分析、疫苗免疫效果评估、器官移植、过敏反应以及多种胞内病原感染的诊断等方面都具有极其重要的理论价值和应用价值^[2-4]。

1975 年, Köhler 等^[5]建立的杂交瘤技术对现代生命科学的研究和发展起着巨大的推动作用。单克隆抗体具有成本低、特异性和纯度高、均一性好等优点,除用于临床疾病的诊断和治疗外,还可用于生物制剂的纯化和免疫学基础研究等各个领域^[6-7]。近年来,国内外在干扰素单克隆抗体的研究和应用方面开展了很多工作,先后有人研制出人、牛、马、猪、鸡、鸭等动物的干扰素单克隆抗体^[8-12]。但是,针对家兔的干扰素单克隆抗体的研制却鲜有报道。本研究通过杂交瘤细胞技术,制备了抗家兔 IFN- γ 单克隆抗体,填补了家兔干扰素单克隆抗体相关研究的空白,为研究和检测 IFN- γ 提供了一种重要的工具,也为建立免疫相关检测方法以及研究家兔体内的免疫机制和免疫功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

7~8 周龄 BALB/c 小鼠购于扬州大学比较医学中心。

1.2 质粒、细胞和菌株

pET-28a(+) 质粒,大肠杆菌 DH5 α 、BL21, SP2/0 细胞均由江苏省农业科学院兽医研究所家兔与兽医生物技术研究室保存。

1.3 主要试剂和仪器

DL2000 DNA Marker, T4 DNA 连接酶,限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III, 凝胶回收纯化试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。柱式质粒 DNAout 试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司。胎牛血清购自 Gibco 公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG(HRP-IgG) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。ECL 化学发光液购自南京麦高德生物科技有限公司。RPMI 1640 基础培养基购自 Invitrogen 公司。IPTG 和 PEG 均购自 Sigma 公司。Clonotyping System/HRP 抗体亚类鉴定试剂盒购自 Southern Biotechnology 公司。

1.4 重组表达载体 pET-28a(+)-IFN- γ 的构建

参照 GenBank 中已登录的家兔 IFN- γ 基因序列,应用软件 Primer Premier 5.0 分析家兔 IFN- γ 基因序列,并参照原核表达载体 pET-28a(+)-17 ku 的多克隆位点序列,设计了 1 对引物,上游引物序列为 5'-GCCGGATCCATGAGAGAAACAGAACAC-3'

(下划线处为 *Bam*H I 酶切位点),下游引物序列为 5'-GCGAAGCTTTCAGTACTTGGATGCTCG-3' (下划线处为 *Hind* III 酶切位点)。上、下游引物理论上的扩增片段大小为 504 bp。以本实验室保存的 pFastBac1-IFN- γ 为模板扩增 IFN- γ 基因^[13], 基因片段经 *Bam*H I + *Hind* III 双酶切后,定向插入经相同酶切的 pET-28a(+)-17 ku 表达载体中。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 后,对双酶切筛选出的阳性菌株进行测序。

1.5 IFN- γ 蛋白的诱导表达和纯化

将重组载体 pET-28a(+)-IFN- γ 转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,挑取单菌落接种到含卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,按 1:100 的体积比将培养物接种于含卡那霉素抗性的新鲜 LB 液体培养基中,振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 值为 0.6 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,诱导表达 4 h,离心收集菌体。部分菌体加入 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水中处理 5~10 min,12 000 r/min 离心后,取 10 μ L 上清进行 12% SDS-PAGE 电泳分析,其余菌体经超声波破碎,收集上清并用 HisTrap 亲和柱纯化目的蛋白,具体操作则按照亲和层析柱产品说明书进行。

1.6 IFN- γ 蛋白单克隆抗体的制备

IFN- γ 重组蛋白(蛋白的质量浓度为 900 μ g/mL)以 1:1 的体积比加入弗氏完全佐剂,经乳化后皮下注射给 BALB/c 小鼠,每只 200 μ L。2 周后皮下注射弗氏不完全佐剂乳化的等量抗原。间隔 2 周后,再重复免疫 1 次。融合前第 3 天腹腔注射等量抗原以加强免疫。参照刘秀梵^[14]报道的方法将免疫小鼠的脾细胞和小鼠 SP2/0 细胞融合。融合细胞培养 5 d 后,用 HAT 培养基换液 1 次,第 10 天用 HT 培养基换液,等到融合细胞覆盖孔底 1/10 时,取上清用间接 ELISA 筛选抗体阳性孔。筛选时以 IFN- γ 重组蛋白、诱导后 pET-28a(+)-17 ku 菌体蛋白和 pET-28a(+)-17 ku 重组蛋白^[15] 分别包被 ELISA 板,筛选抗 IFN- γ 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株^[16]。

1.7 腹水的制备及单克隆抗体的纯化

参照刘秀梵^[14]报道的方法制备单克隆抗体腹水。采用辛酸-硫酸铵方法纯化单克隆抗体腹水,纯化后的单克隆抗体于一 70 $^{\circ}$ C 保存^[17]。

1.8 单克隆抗体的 Western-blot 检测

取 IFN- γ 重组蛋白、诱导的 pET-28a(+)-17 ku 菌体蛋白和 pET-28a(+)-17 ku 重组蛋白进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳后取下凝胶,将其转印

于 NC 膜上, 2 mA/cm², 转印 60 min 后, 用 50 g/L 脱脂奶粉溶液 4 °C 封闭转移膜过夜, 以腹水为一抗 (1 : 400 稀释), HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗 (1 : 5 000 稀释), 进行 Western-blot 鉴定。用 ECL 显色, 拍照记录结果。

1.9 单克隆抗体亚类的鉴定和腹水效价的测定

利用 Southern Biotechnology 公司的 Cloning System/HRP 抗体亚类鉴定试剂盒鉴定单克隆抗体的亚类, 具体操作步骤则按说明书进行。以纯化蛋白 (1 μ g/mL) 包被 ELISA 板, 倍比稀释的腹水作为一抗, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗 (1 : 5 000 稀释), 进行间接 ELISA 单克隆抗体腹水效价的测定。

2 结果

2.1 pET-28a(+)-IFN- γ 重组表达载体的构建

通过 PCR 获得大小约 504 bp 的目的片段 (见图 1)。PCR 产物经 *Bam*H I + *Hind* III 双酶切后定向插入经相同酶切的 pET-28a(+)-表达载体中, 获得重组质粒 pET-28a(+)-IFN- γ 。酶切鉴定结果 (见图 2) 和测序分析说明, IFN- γ 基因已按正确的阅读框插入到 pET-28a(+)-载体中, 且序列正确。

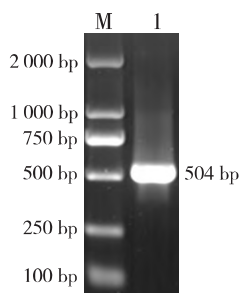


图 1 IFN- γ 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of IFN- γ gene

M: DNA 分子质量标准; 1: PCR 扩增的 IFN- γ 基因

M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR-amplified IFN- γ gene

2.2 重组蛋白的表达及纯化

含重组质粒的全菌裂解液的 SDS-PAGE 电泳结果表明, 经 IPTG 诱导表达后的全菌裂解液与空载体对照相比, 在约 18 ku 处有一条明显的条带, 与预期大小一致。HisTrap 亲和柱纯化回收液的 SDS-PAGE 电泳结果显示, 仅在约 18 ku 处有一条明显条带 (见图 3)。

2.3 IFN- γ 蛋白单克隆抗体的制备及特异性鉴定

取纯化后的重组蛋白皮下注射 BALB/c 小鼠 3 次, 融合前第 3 天腹腔加强免疫 1 次, 无菌操作取脾细胞, 在融合剂 (PEG) 作用下与 SP2/0 细胞进行融

合, 对杂交瘤细胞进行 3 次亚克隆。经 ELISA 方法筛选, 共获得 4 株能稳定分泌抗 IFN- γ 单克隆抗体的细胞株。这些细胞株连续培养 6 个月以及进行反复冻存复苏后, 均能稳定传代并分泌抗体。Western-blot 结果 (见图 4) 表明, 这些单克隆抗体与 IFN- γ 蛋白有特异性反应, 而与诱导后的 pET-28a(+)-菌体蛋白和 pET-28a(+)-17 ku 重组蛋白不发生任何反应。

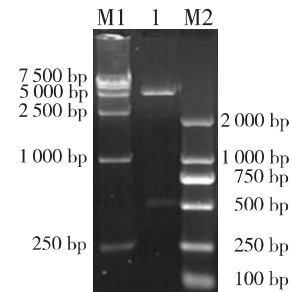


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme digestion identification of the recombinant plasmid

M: DNA 分子质量标准; 1: 重组质粒 pET-28a(+)-IFN- γ 的 *Bam*H I + *Hind* III 双酶切产物

M1: DL15000 DNA Marker; M2: DL2000 DNA Marker; 1: The products from recombinant plasmid pET-28a(+)-IFN- γ digested with *Bam*H I + *Hind* III

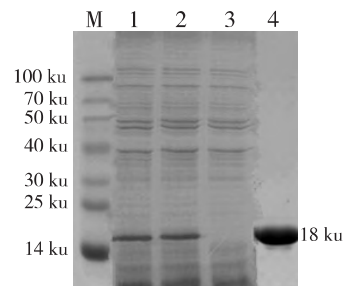


图 3 IFN- γ 基因在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expressed recombinant IFN- γ in *E. coli*

M: 蛋白质分子质量标准; 1, 2: 诱导后的 pET-28a(+)-IFN- γ 菌体蛋白; 3: 诱导后的 pET-28a(+)-菌体蛋白; 4: 纯化后的 IFN- γ 蛋白

M: Protein molecular weight Marker; 1, 2: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) transformed by pET-28a(+)-IFN- γ ; 3: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) transformed by pET-28a(+); 4: Purified IFN- γ fusion protein

2.4 抗 IFN- γ 蛋白单克隆抗体的特性

抗体亚类鉴定结果表明, 3H8、4F10 和 6C12 单克隆抗体的亚类均为 IgG1, κ 链; 4G4 单克隆抗体的亚类为 IgG2b, κ 链。4 株单克隆抗体腹水的间接 ELISA 效价分别为 1 : 102 400、1 : 102 400、1 : 204 800、1 : 6 400 (见表 1)。

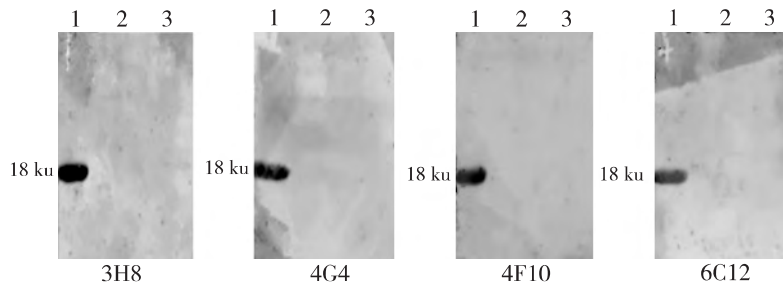


图 4 单克隆抗体与 IFN- γ 重组蛋白的 Western-blot 分析

Fig. 4 Western-blot analysis of the purified recombinant IFN- γ reaction with McAbs

1: 纯化后的 IFN- γ 蛋白; 2: 诱导后的 pET-28a(+) 菌体蛋白; 3: pET-28a(+)-17 ku 重组蛋白

1: Purified IFN- γ fusion protein; 2: Total protein from *E. coli* BL21(DE3) transformed with pET-28a(+); 3: pET-28a(+)-17 ku fusion protein

表 1 IFN- γ 单克隆抗体的特性

Table 1 Properties of McAbs to IFN- γ

单克隆抗体 McAbs	亚型 Subtypes	效价 Titer
3H8	IgG1, κ 链	1 : 102 400
4G4	IgG2b, κ 链	1 : 102 400
4F10	IgG1, κ 链	1 : 204 800
6C12	IgG1, κ 链	1 : 6 400

3 讨论

干扰素(IFN- γ)是机体内具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节功能的重要细胞因子,主要由激活的 T 细胞、NK 细胞和巨噬细胞产生。评价 IFN- γ 在机体内的动态变化水平指标,对于了解传染性疾病的发生、发展、转归情况及其机体保护性免疫反应动态规律提供了较大帮助。因此,建立评价 IFN- γ 在机体中水平变化的检测方法显得十分重要^[2-4]。

单克隆抗体在研究细胞因子的功能上有许多用途,如结构和功能的研究、定量检测、鉴别和纯化。近年来,国内外在干扰素单克隆抗体的研究和应用方面开展了很多工作。为了适应临床工作、基础研究及应用研究的需要,利用融合技术制备干扰素单克隆抗体显得很有必要。无论是对免疫细胞功能及机体免疫应答方面的研究,对疾病状态下干扰素产生水平的判定,还是制备和纯化干扰素过程中的定性定量分析,都需要有一种简便、快捷、可靠和经济的检测手段,而特异性的干扰素单克隆抗体恰恰在这方面起到了重要的作用。先后有人研制出牛、马、猪、鸡、鸭等动物的干扰素单克隆抗体,但家兔的干扰素单克隆抗体却鲜有报道^[8-12]。

本研究克隆的家兔 IFN- γ 基因与 GenBank 中已有的 IFN- γ 基因相符,与国内外学者的研究结果也一致,这表明家兔的 IFN- γ 基因在进化上高度保守。本研究利用 IFN- γ 重组蛋白通过动物免疫、细

胞融合、筛选克隆获得 4 株抗 IFN- γ 的特异性单克隆抗体,并且制备了腹水。在筛选克隆阶段,对照组的设置不仅包括诱导后的 pET-28a(+) 菌体蛋白,也包括本实验室保存的 pET-28a(+)-17 ku 重组蛋白。两组对照的设置使克隆的筛选更具可靠性。经鉴定,3H8、4F10、6C12 单克隆抗体的亚型为 IgG1, κ 链; 4G4 单克隆抗体的亚型为 IgG2b, κ 链。杂交瘤细胞连续传代培养,其分泌抗体的能力稳定。利用 4 株 IFN- γ 单克隆抗体制备腹水,Western-blot 结果显示,腹水具有很高的特异性。ELISA 结果显示,3H8 和 4G4 腹水的效价均为 1 : 102 400, 4F10 腹水的效价为 1 : 204 800, 6C12 腹水的效价为 1 : 6 400。4 株抗 IFN- γ 单克隆抗体具有特异性强、均质性好、稳定性高、可无限量生产等优点。本研究筛选出了 4 株能稳定分泌 IFN- γ 单克隆抗体的细胞株,为进一步研究 IFN- γ 单克隆抗体在家兔体内的免疫功能和免疫调控奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] ISAACS A, LINDENMANN J. Virus interference. I. The interferon [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1957, 147(927): 258-267.
- [2] 武迎红, 王学理, 段小宇, 等. 干扰素的研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2007, 22(4): 425-428.
WU Ying-hong, WANG Xue-li, DUAN Xiao-yu, et al. Progress in the study of interferon [J]. *Journal of Inner Mongolia University for Nationalities: Natural Science*, 2007, 22(4): 425-428. (in Chinese)
- [3] SIDDIQUI M. Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2010, 72(1): 12-17.
- [4] 卢年芳, 黄爱龙, 唐霓, 等. 干扰素 α 抗病毒活性的实验研究 [J]. 中华肝病杂志, 2005, 13(12): 892-896.
LU Nian-fang, HUANG Ai-long, TANG Ni, et al. An experimental study on antiviral effects of IFN alpha [J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2005, 13(12): 892-896. (in Chinese)
- [5] KÖHLER G, MILSEIN C. Continuous cultures of fused cells

- secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256(5517):495-497.
- [6] 李超,林祥梅,李全芬,等.干扰素单克隆抗体的研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(5):2241-2243.
LI Chao, LIN Xiang-mei, LI Quan-fen, *et al.* Research advances in interferon monoclonal antibody[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(5):2241-2243. (in Chinese)
- [7] 魏万贵,王莉,白云峰,等.抗 α -玉米赤霉醇单克隆抗体的研制及初步应用[J].细胞与分子免疫学杂志,2007,23(1):68-71.
WEI Wan-gui, WANG Li, BAI Yun-feng, *et al.* Preparation and preliminary application of monoclonal antibody against alpha-zearalanol[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2007, 23(1):68-71. (in Chinese)
- [8] 吴美英,艾艳萍,任韧,等.重组人 α 干扰素单克隆抗体的研制及其应用[J].中华实验和临床病毒学杂志,2002,16(3):61-63.
WU Mei-ying, AI Yan-ping, REN Ren, *et al.* Preparation and application of monoclonal antibodies to recombinant human IFN- α [J]. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2002, 16(3):61-63. (in Chinese)
- [9] 张向乐,孟春春,丁铲,等.抗鸡 β 干扰素单克隆抗体的制备及初步鉴定[J].中国动物传染病学报,2013,21(2):14-19.
ZHANG Xiang-le, MENG Chun-chun, DING Chan, *et al.* Generation and characterization of monoclonal antibodies against chicken interferon- β [J]. *Chinese Journal of Veterinary Parasitology*, 2013, 21(2):14-19. (in Chinese)
- [10] 呼鑫鑫,王君伟.抗鹅 α 干扰素单克隆抗体的制备及初步鉴定[J].中国预防兽医学报,2008,30(10):820-823.
HU Xin-xin, WANG Jun-wei. Preparation and characterization of monoclonal antibody against interferon- α of goose[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 30(10):820-823. (in Chinese)
- [11] 白宇,童铁钢,刘光亮,等.马 γ 干扰素单克隆抗体的制备及其特性分析[J].农业生物技术学报,2008,16(1):10-14.
BAI Yu, TONG Tie-gang, LIU Guang-liang, *et al.* Preparation and analysis of monoclonal antibodies against equine interferon-gamma [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2008, 16(1):10-14. (in Chinese)
- [12] 徐贤坤,熊毅,刘棋,等.水牛 γ 干扰素单克隆抗体的制备及其特性分析[J].农业生物技术学报,2010,18(3):610-615.
XU Xian-kun, XIONG Yi, LIU Qi, *et al.* Preparation and analysis of monoclonal antibodies against water buffalo interferon-gamma[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2010, 18(3):610-615. (in Chinese)
- [13] 王芳,胡波,何孔旺,等.新西兰白兔 γ 干扰素在昆虫细胞中的表达及其活性测定[J].华北农学报,2010,25(3):9-13.
WANG Fang, HU Bo, HE Kong-wang, *et al.* Expression of IFN- γ of New Zealand rabbit in insect cells and its antiviral activity[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(3):9-13. (in Chinese)
- [14] 刘秀梵.单克隆抗体在农业上的应用[M].合肥:安徽科学技术出版社,1994:8-36.
LIU Xiu-fan. *Applications of Monoclonal Antibodies in Agriculture*[M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press, 1994:8-36. (in Chinese)
- [15] 程王琨,陈攀,李玉峰,等.汉赛巴尔通体17ku蛋白的表达及间接ELISA方法的建立[J].畜牧兽医学报,2013,44(10):1616-1621.
CHENG Wang-kun, CHEN Pan, LI Yu-feng, *et al.* Expression of 17 ku protein of *Bartonella henselae* and its usage in the development of an indirect ELISA[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(10):1616-1621. (in Chinese)
- [16] YU S Q, XIE H, DATTA A, *et al.* Galactose residues on the lipooligosaccharide of *Moraxella catarrhalis* 26404 form the epitope recognized by the bactericidal antiserum from conjugate vaccination[J]. *Infect Immun*, 2008, 76(9):4251-4258.
- [17] 白丽,钱金楸,王晶.应用辛酸硫酸铵法提取小鼠腹水和血清中的IgG抗体[J].大理医学院学报,2000,9(4):3-4.
BAI Li, QIAN Jin-fu, WANG Jing. Purification of mouse IgG from ascites fluid and serum by caprylic acid and ammonium sulfate[J]. *Journal of Dali Medical College*, 2000, 9(4):3-4. (in Chinese)

(责任编辑 胡弘博)