

莱茵衣藻 IFT25 的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备

王震¹, 董彬¹, 樊振川^{1,2,3}, 孟德梅^{*1,2,3}

(1. 天津科技大学 教育部食品营养与安全重点实验室,天津 300457;2. 天津市食品营养与安全药物化学联合实验室,天津 300457;3. 天津科技大学 新农村发展研究院,天津 300457)

摘要: IFT25 是维持纤毛运动和感知所必须元件纤毛内运输蛋白 IFT 复合物 B 中的重要组分之一,探索 IFT25 尤其在模式生物莱茵衣藻中的作用机制具有重要作用。作者采用经济和简单的方法,制备莱茵衣藻 IFT25 的兔源多克隆抗体。将 *ift25* 分别连接到 pMAL-c2X-和 pET-28a(+)-载体上,转入大肠杆菌 BL21(DE3),用 IPTG 诱导大量表达,并经亲和纯化后蛋白质纯度超过 90%。通过颈背部皮下多次免疫 8 周龄大的新西兰大白兔,制备多克隆抗体,取第五次免疫后血清用 ELISA 测定效价超过 128 000。抗血清依次经过 Protein A 和硝酸纤维素膜纯化后,用 Western blotting 检测抗体特异性,结果表明制备的抗体可以特异性识别莱茵衣藻中的 IFT25,为 IFT25 作用机制的阐明和纤毛相关疾病的诊断提供了重要理论和方法支持。

关键词: 莱茵衣藻;纤毛;IFT25;原核表达;蛋白纯化;多克隆抗体

中图分类号: Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)09—0903—06

Prokaryotic Expression and Purification of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT25 in *Escherichia coli* and Preparation of Polyclonal Antibody

WANG Zhen¹, DONG Bin¹, FAN Zhenchuan^{1,2,3}, MENG Demei^{*1,2,3}

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. International Research Center of Tianjin for Food Nutrition and Safety and Medicinal Chemical, Tianjin 300457, China; 3. The New Rural Development Research Institute, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: IFT25 is one of the important components of IFT-B complexes, which are necessary to maintain cilia movement and perception. To explore IFT25 mechanism especially in the model organism *Chlamydomonas reinhardtii* plays an important role. This experiment adopts economic and simple method to prepare the rabbit polyclonal antibody of the *Chlamydomonas reinhardtii* IFT25. The target gene *ift25* was cloned into vectors of pMAL-c2X- and pET-28a (+)-, respectively. Then

收稿日期: 2015-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501544);天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(13JCYBJC41900, 17JCQNJC14400)。

* 通信作者: 孟德梅(1987—),女,山东曲阜人,工学博士,讲师,硕士研究生导师,主要从事食品分子生物学方面的研究。

E-mail: mengdm@tust.edu.cn

引用本文: 王震,董彬,樊振川,等. 莱茵衣藻 IFT25 的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(09): 903-908.

the plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to induce highly expressed by IPTG. After purified by affinity adsorption purification, the purity of fusion protein is both higher than 90%. Through the back of the neck skin repeatedly immune eight weeks of the New Zealand white rabbit to prepare polyclonal antibody. After the fifth immune antiserum titer was determined by ELISA, which titer more than 12 800. Polyclonal antibodies were then successively prepared by Protein A affinity adsorption purification and nitrocellulose membrane purification. And the specificity of polyclonal antibodies was detected by Western blotting. Results showed that the polyclonal antibody prepared could specifically and precisely bind IFT25 in *Chlamydomonas reinhardtii*, which could provide important theoretical and methodological supports to clarify mechanisms of the action of IFT25 and diagnose diseases associated with cilia.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, cilia, IFT25, prokaryotic expression, protein purification, polyclonal antibody

纤毛是存在于细胞表面具有运动或感知功能的细胞器,多项研究报道,纤毛的结构或功能障碍会导致许多疾病^[1-4],如多囊肾病、视网膜变性、慢性呼吸疾病、脑积水和不孕等。为了预防和治疗这些疾病,许多研究者对纤毛内各种蛋白质组分、结构及其作用机理进行了大量研究^[5-7]。纤毛的运动和感知是由马达蛋白、IFT 颗粒、BBS 等元件来维持的,其中 IFT 颗粒是维持纤毛功能所必须的^[8]。研究表明,IFT 颗粒包含至少 20 种蛋白质组分,这些组分形成一个复合物整体,可以运送细胞体内蛋白质进出纤毛^[9]。IFT 颗粒中蛋白质组分的构象改变或缺失将会引起纤毛的组装和功能障碍^[4,6]。

IFT 颗粒包含 IFT-A 和 IFT-B 复合物,两者分别包含 6 种和 14 种组分,还有一些新成员将不断被发现^[8,10]。IFT 颗粒的各个组分在各个物种间几乎呈高度保守性,但是在秀丽隐杆线虫和果蝇中却没有发现 IFT-B 复合物的组分 IFT25,暗示着 IFT25 可能区别于其他常规的 IFT-B 复合物组分,在纤毛运输系统中发挥特殊的作用^[10]。在莱茵衣藻中研究发现,IFT25 是一种磷酸化蛋白质,可以和 IFT27 结合,促进 IFT27 的稳定性和可溶性,说明两者可能有功能上的关联^[11]。在小鼠中研究发现,IFT25 缺陷型不出现纤毛结构和长度的明显变化,说明 IFT25 不参与纤毛的组装,但是发现其在维持 Hedgehog 信号正确传导中发挥作用。同时在小鼠的研究中,IFT25 缺陷型细胞中没有发现有丝分裂缺陷,这可能表明哺乳动物中不需要 IFT25 调控细胞周期^[12]。

目前关于 IFT25 的作用机制尚不清晰,因此深入研究模式生物莱茵衣藻中 IFT25 在纤毛组装、纤毛内物质运输及信号传导中的作用机制具有重要意义。

制备特异性和灵敏性的莱茵衣藻 IFT25 抗体,是顺利完成 IFT25 在蛋白水平表达模式、以及 IFT25 与其他蛋白质互作机制研究的重要前提。作者虽在 2009 年对莱茵衣藻 IFT25 和 IFT27 的互作进行了详细研究^[11],但是至今没有商品化的莱茵衣藻 IFT25 抗体可供研究者使用,也没有关于莱茵衣藻 IFT25 抗体制备方法的报道。作者采用经济和简单的方法,以原核表达莱茵衣藻 IFT25 为抗原制备兔源多克隆抗体,并运用多种方法进行抗体纯化以提高抗体的特异性,从而为全面阐明 IFT25 在纤毛中的具体作用机制及理解纤毛相关疾病的致病机理奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 XL1-blue, BL21 (DE3) 感受态, pGEX-2T-ift25-lcc-his-ift27 质粒:均为作者所在实验室保存;莱茵衣藻 cc125 藻种:作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂 DNA Marker (1 000 bp, 100 bp)、dNTPs: 购自全式金公司;T₄ DNA 连接酶、*Pfu* DNA 聚合酶、限制性内切酶 (*Bam*H I、*Hind* III)、彩色预染蛋白 Marker、IPTG: 购自 Fermentas 公司;质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒:均购自索

莱宝公司;引物合成和基因测序:由北京奥科鼎盛公司完成;HRP 标记的山羊抗兔 IgG:购自康为世纪;Dextrin Sepharose™ High Performance、Ni Sepharose™ 6 Fast Flow、Protein A Sepharose™:购自 GE 公司。

1.1.3 实验动物 新西兰大白兔 2 只,8 周龄大,体重 1.5~2.0 kg,由天津欧阳实验种兔场提供。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体构建 实验室保存的 pMAL-c2X 和 pET-28a(+)表达载体用 *Bam*H I、*Hind* III 进行双酶切,并进行切胶回收;以表 1 中设计的引物 PCR 扩增出 *ift25*,用 *Bam*H I、*Hind* III 进行双酶切,产物纯化回收目的基因;将目的基因分别与两个载体用 T₄ DNA 连接酶连接后,转化到大肠杆菌 XL1-blue 中,分别涂到含氨苄青霉素(120 μg/mL)、卡那霉素(30 μg/mL)的 LB 平板上筛选阳性菌落;挑取阳性菌落过夜培养,提取质粒,酶切和测序验证。

表 1 扩增 *ift25* 所用引物序列

Table 1 Sequences of the PCR primers for the gene of *ift25*

引物	引物序列	酶切位点
上游	ATGGATCCATGAAGGACTATGCCGAGAG	<i>Bam</i> H I
下游	ACAAGCTTTTGAAGTCTGCTCGAAG	<i>Hind</i> III

注:加黑标注序列为保护碱基,斜体标注序列为酶切位点,下划线标注序列为基因互补序列。

1.2.2 重组质粒在大肠杆菌中诱导表达验证 将正确重组质粒用热激法转化到大肠杆菌 BL21 中,在分别含氨苄青霉素(120 μg/mL)和卡那霉素(30 μg/mL)的 LB 平板上筛选含 pMAL-c2X-*ift25* 和 pET-28a(+)-*ift25* 阳性菌落;挑取阳性菌落过夜培养,然后按照 5%接种体积分数分别转接到 5 mL 含氨苄青霉素(120 μg/mL)和卡那霉素(30 μg/mL)的 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 值到 0.6~0.8,加入终浓度 0.2 mmol/L 的 IPTG,25 ℃、180 r/min 诱导表达 6 h,收集菌体进行 SDS-PAGE 分析^[13-14]。

1.2.3 融合蛋白 MBP-IFT25 的纯化 将含 pMAL-c2X-*ift25* 重组质粒的大肠杆菌 BL21 经过诱导表达后,超声波破碎菌体细胞,离心收集上清液。含融合蛋白上清液用 Dextrin Sepharose™ High Performance 进行亲和纯化,纯化条件为:结合缓冲液 A(20 mmol/L Tris,300 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,0.1% β-巯基乙醇,pH 7.4),洗脱缓冲液 A(20

mmol/L Tris,300 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,0.1% β-巯基乙醇,10 mmol/L 麦芽糖,pH 7.4),将洗脱出的蛋白质样品进行 SDS-PAGE 分析^[15]。

1.2.4 融合蛋白 6×His-IFT25 的纯化 含 pET-28a(+)-*ift25* 重组质粒的大肠杆菌 BL21 经过诱导表达后,菌体细胞进行超声波破碎,离心收集包涵体。包涵体用洗涤液缓冲液(50 mmol/L Tris,100 mmol/L NaCl,1 mol/L 尿素,1% TritonX-100,pH 8.0)洗涤 3 次后,然后用变性缓冲液(20 mmol/L NaH₂PO₄,8 mol/L 尿素,500 mmol/L NaCl,pH 7.4)进行变性溶解。融合蛋白在变性条件下用 Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 进行亲和纯化,纯化条件为:结合液缓冲液 B(20 mmol/L NaH₂PO₄,8 mol/L 尿素,500 mmol/L NaCl,pH 7.4),分别用含有 60、100、300 mmol/L 咪唑的洗脱液缓冲液 B(20 mmol/L NaH₂PO₄,8 mol/L 尿素,500 mmol/L NaCl,pH 7.4)进行梯度洗脱,洗脱出的蛋白质样品进行 SDS-PAGE 分析^[16-17]。

1.2.5 多克隆抗体的制备 取两只 8 周大的新西兰大白兔,在实验室适应一周后准备免疫。初次免疫前在耳源静脉取血,分离血清,在后续试验中作为阴性血清;初次免疫,取 2 mg MBP-IFT25 与等体积的完全弗氏佐剂充分乳化,在兔子颈背部选多点皮下注射;10~14 d 后进行加强免疫,取 2 mg MBP-IFT25 与等体积的不完全弗氏佐剂充分乳化,在兔子颈背部多点皮下注射;之后每次加强免疫前耳源取血,ELISA 测定抗血清的效价,当效价满足试验要求,加强免疫后一周取血分离抗血清^[18-20]。

1.2.6 ELISA 测定抗血清效价 酶标板每孔包被 1 μg 融合蛋白 MBP-IFT25,0.5%的脱脂奶粉封闭,抗血清和阴性血清设定稀释梯度为 1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000、1:128 000、1:256 000,二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(1:20 000),TMB(3',3',5',5',-四甲基联苯胺)显色后测定 OD₄₅₀,抗血清 OD₄₅₀/阴性血清 OD₄₅₀≥2.0 为阳性,其最高稀释倍数为抗血清的效价^[19]。

1.2.7 抗血清的纯化 分离完的抗血清用 Protein A Sepharose™ 进行纯化,纯化条件为:结合缓冲液 C(12 mmol/L Na₂HPO₄,8 mmol/L NaH₂PO₄,pH 7.0),洗脱缓冲液 C(0.1 mol/L 甘氨酸,pH 2.7),流速 0.5 mL/min。收集吸收峰对应的洗脱液,用 1 mol/L Tris-HCl(pH 9.0)将洗脱液 pH 值调至中性。Protein A

Sepharose™ 纯化完的抗体用硝酸纤维素膜亲和法^[21]进一步纯化,将 6×His-IFT25 经过 SDS-PAGE 和电印迹转移到硝酸纤维素膜(PVDF)上,丽春红染色后剪下目的条带,5%脱脂奶粉封闭后与经过 Protein A Sepharose™ 的抗体 4 ℃结合过夜,用洗脱缓冲液 C 进行洗脱,收集洗脱液并将 pH 值调至中性。

1.2.8 Western blotting 检测多克隆抗体的特异性
莱茵衣藻 cc125 接种到 Tris-Acetate-Phosphate (TAP)^[22]培养基中室温光照培养 3 d,取 1 mL 加入离心管中,2 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液;向沉淀中加入 54 μL Buffer A (工作浓度 0.1 mol/L 的 Na₂CO₃)和 6 μL DTT(1 mol/L),涡旋振荡器振荡 5 s 重悬衣藻细胞;向离心管中继续加入 40 μL Buffer B(5% SDS、30%蔗糖),室温振荡 45 min;10 000 r/min 离心 5 min,收集上清液。取 4 μL 衣藻上清液加入 1 μL 5×上样缓冲液混匀,进行 SDS-PAGE 和电转印后,衣藻蛋白转移到 PVDF 膜上,5%的脱脂奶粉封闭;多克隆抗体稀释度 1:1000,二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(1:5000),加入显色液后曝光压片显色或曝光照相^[20]。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建及鉴定

两套重组质粒进行双酶切验证,结果见图 1。两套重组质粒均获得了 570 bp 的片段,并将重组质粒送到金唯智公司测序,测序引物选择通用引物,经过对比序列完全正确,说明表达载体构建成功,将其分别命名为 pMAL-c2X-ift25 和 pET-28a(+)-ift25。

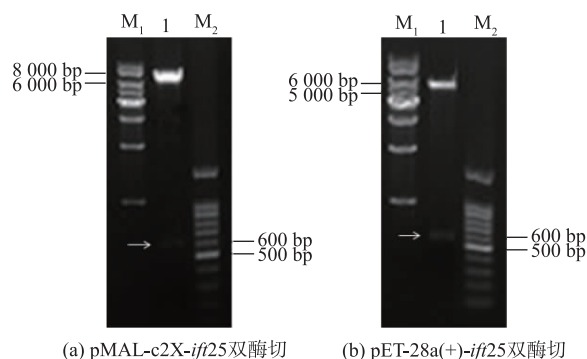


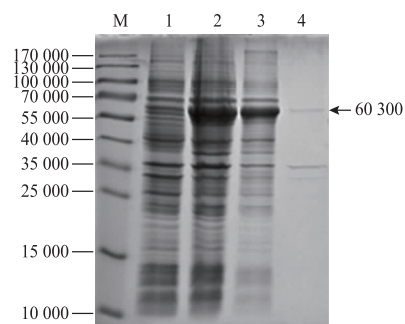
图 1 重组质粒的双酶切验证

Fig. 1 Double enzyme verification of recombinant plasmid

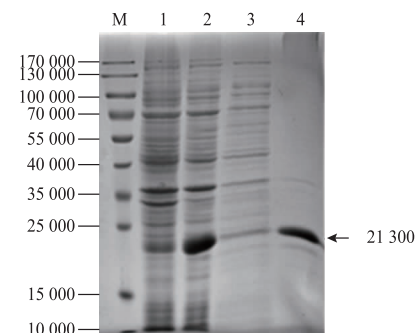
2.2 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达及融合蛋白的可溶性分析

pMAL-c2X-ift25 和 pET-28a (+)-ift25 均转化

到大肠杆菌 BL21 中。含 pMAL-c2X-ift25 的菌体经过 IPTG 诱导,SDS-PAGE 在 60 000 处出现目的条带,而未经诱导的含重组质粒的菌体蛋白没有此带,说明目的 MBP-IFT25 成功表达;将诱导完的菌体经过超声破碎,目的条带主要出现在上清液中,而沉淀中则几乎没有,说明融合蛋白呈水可溶性,见图 2。含 pET-28a (+)-ift25 的菌体经过 IPTG 诱导,SDS-PAGE 在 20 000 附近出现目的条带,而未经诱导的空白对照则没有此带,说明 6×His-IFT25 成功表达,而且主要分布在沉淀中,说明 6×His-IFT25 主要以包涵体形式表达。这之前报道相同,即 MBP 对融合蛋白有促水溶作用^[14];本试验中 6×His 与 IFT25 融合表达时融合蛋白的水溶性较差。



(a) pMAL-c2X-ift25 的诱导表达及可溶性分析



(b) pET-28a(+)-ift25 的诱导表达及可溶性分析

M: 蛋白质相对分子质量 Marker;1: 未加 IPTG 诱导菌体;2: 加 IPTG 诱导菌体;3: 细胞破碎后上清液;4: 细胞破碎后沉淀。

图 2 SDS-PAGE 检测重组表达载体 pMAL-c2X-ift25 和 pET-28a(+)-ift25 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达及融合蛋白的可溶性

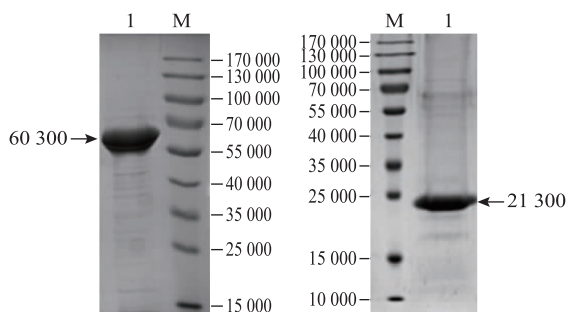
Fig. 2 SDS-PAGE analyzed the expression of recombinant vector pMAL-c2X-ift25 and pET-28a(+)-ift25 in *E. coli* BL21 (DE3) and the solubility of fusion protein

因为呈水溶型的目的蛋白可以保持蛋白质的天然构象,制备的抗体可以更特异性的结合目的蛋

白,包涵体在变性溶解、复性操作后可以恢复蛋白质的天然构象,但是在提高复性效率上存在诸多难度和挑战,而且不能达到完全复性。因此,作者选择呈水溶性的 MBP-IFT25 作为免疫动物的抗原;包涵体 6×His-IFT25 则用于抗体的膜纯化^[21]。

2.3 融合蛋白的纯化

融合蛋白 MBP-IFT25 和 6×His-IFT25 经过亲和纯化后,用 SDS-PAGE 进行分析,见图 3。结果表明两个融合蛋白的相对分子质量正确,且经灰度分析(SAGECREATION 凝胶成像仪)表明,两者纯度均达 90%以上。



(a) MBP-IFT25 的亲和纯化 (b) 6×His-IFT25 的亲和纯化

图 3 MBP-IFT25 和 6×His-IFT25 的亲和纯化

Fig. 3 Affinity purification of MBP-IFT25 and 6×His-IFT25

2.4 ELISA 测定抗血清效价及多克隆抗体的特异性检测

融合蛋白 MBP-IFT25 作为抗原免疫两只新西兰大白兔,用 ELISA 测定免疫过程中的抗血清效价,结果在第四次免疫后 12 d,两只兔子的抗血清效价均超过 1 280 000,见图 4,满足试验要求,于第五次免疫后一周取血分离抗血清。

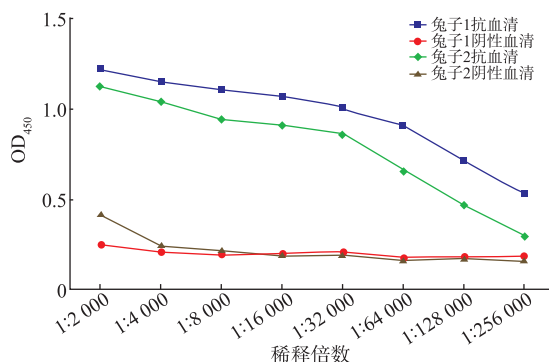


图 4 间接 ELISA 法测定抗血清的效价

Fig. 4 Results of ELISA test of anti-IFT25 polyclonal antiserum

取兔子 1 抗血清首先经过 Protein A 纯化,结果见图 5,再进行抗原-抗体膜纯化。用 Western blotting 检测其识别莱茵衣藻中 IFT25 的特异性,经过显色可以在 20 000 附近识别出单一条带,条带相对分子质量大小符合预期,见图 6,即制备的多克隆抗体可以特异性识别 IFT25,可以直接用于后续对 IFT25 的研究。

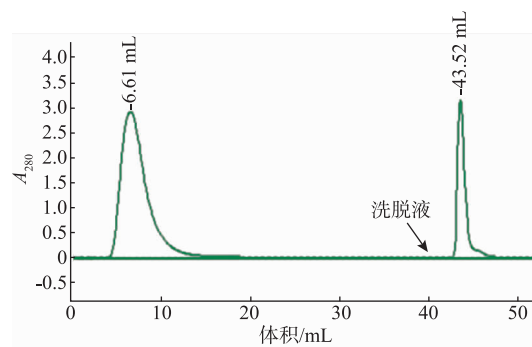
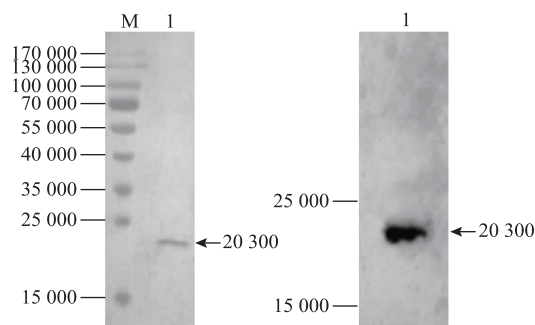


图 5 Protein A 纯化 IFT25 的抗血清

Fig. 5 Anti-IFT25 was purified by protein A



(a) Western blotting(曝光照相) (b) Western blotting(曝光压片)

图 6 Western blotting 分析 IFT25 多克隆抗体的特异性

Fig. 6 Western blotting analysis of the specificity of IFT25 polyclonal antibody

3 结语

IFT25 作为纤毛内运动蛋白 IFT 复合物 B 中的一个重要组分,在纤毛运动和感知中的作用机制仍不清晰。制备特异性和灵敏性的 IFT25 抗体,来检测其在模式生物莱茵衣藻中的表达模式及与其他 IFT 成员的互作机制是阐明 IFT25 在生物体内作用机制的重要方式。作者成功构建了 MBP-IFT25 和 6×His-IFT25 两种融合蛋白,亲和纯化后蛋白质纯度超过 90%。并用水溶性的 MBP-IFT25 融合蛋白作为抗原制备其多克隆抗体,ELISA 测定效价超过

128 000。依次经 Protein A 和硝酸纤维素膜纯化制备的抗体,用 Western blotting 检测具有很好的特异性,能够正确的特异性识别莱茵衣藻中的 IFT25 蛋白质,表明所制备的 IFT25 抗体可以直接用于

ELISA、Western blotting 及活体中的检测,为 IFT25 作用机制的阐明和纤毛相关疾病的诊断提供了重要理论和方法支持。

参考文献:

- [1] NARASIMHAN V, ROY S. Cilia: organelles at the heart of heart disease[J]. **Current Biology**, 2015, 25(13): R559-R562.
- [2] WANG S, WEI Q Q, DONG G, et al. ERK-mediated suppression of cilia in cisplatin-induced tubular cell apoptosis and acute kidney injury[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2013, 1832: 1582-1590.
- [3] WINYARD P, JENKINS D. Putative roles of cilia in polycystic kidney disease[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2011, 1812: 1256-1256.
- [4] SCHMIDTS M, VODOPIUTZ J, SONIA C S, et al. Mutations in the gene encoding IFT dynein complex component WDR34 cause juvenile asphyxiating thoracic dystrophy[J]. **The American Journal of Human Genetics**, 2013, 93(5): 932-944.
- [5] OU G S, BLACQUE O E, SNOW J J, et al. Functional coordination of intraflagellar transport motors[J]. **Nature**, 2005, 436: 583-587.
- [6] BROWN J M, COCHRAN D A, CRAIGE B, et al. Assembly of IFT trains at the ciliary base depends on IFT74[J]. **Current Biology**, 2015, 25(12): 1583-1593.
- [7] PEDERSEN L B, MILLER M S, GEIMER S, et al. Chlamydomonas IFT172 is encoded by FLA11, interacts with CrEB1, and regulates IFT at the flagellar tip[J]. **Current Biology**, 2005, 15: 262-266.
- [8] INGLIS P N, BOROEVIK K A, LEROUX M R. Piecing together a ciliome[J]. **Trends in Genetics**, 2006, 22(9): 491-500.
- [9] NICOLA P G. Cilia and ciliopathies: Classic examples linking phenotype and genotype—An overview[J]. **Reproductive Toxicology**, 2014, 48: 98-105.
- [10] TASCHNER M, BHOGARAJU S, LORENTZEN E. Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis[J]. **Differentiation**, 2012, 83(2): 12-22.
- [11] WANG Z, FAN Z C, SHANA M, et al. Intraflagellar transport (IFT) protein IFT25 is a phosphoprotein component of IFT complex B and physically interacts with IFT27 in Chlamydomonas[J]. **PLoS One**, 2009, 4(5): e5384.
- [12] KEADY B T, SAMTANI R, TOBITA K, et al. IFT25 links the signal-dependent movement of hedgehog components to intraflagellar transport[J]. **Developmental Cell**, 2012, 22(5): 940-951.
- [13] PRYOR K D, LEITING B. High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His6-Tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system[J]. **Protein Expression and Purification**, 1997, 10(1): 309-319.
- [14] KAPUST R B, WANUGH D S. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused[J]. **Protein Science**, 1999, 8: 1668-1674.
- [15] NILSSON J, LUNDEBERG J, et al. Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins[J]. **Protein Expression and Purification**, 1997, 11(1): 1-16.
- [16] FRANKEN K L M C, HIEMSTRA H S, MEIJGAARDEN K E, et al. Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent[J]. **Protein Expression and Purification**, 2000, 18(1): 95-99.
- [17] WANG Jun, LEI Jianyong, CHEN Yun, et al. Expression and purification of cell penetrating peptide TAT and mouse stem cell transcriptional factor Oct4 recombinant protein [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32 (9): 962-966. (in Chinese)
- [18] LIU Ping, ZHANG Zhao, ZHENG Xibang. Preparation of polyclonal antibody of goats SOX2[J]. **Scientia Agricultura Sinica**, 2012, 45(1): 178-183. (in Chinese)
- [19] LIU F X, WU X D, LI L, et al. Expression, purification and characterization of two truncated peste des petits ruminants virus matrix proteins in *Escherichia coli*, and production of polyclonal antibodies against this protein[J]. **Protein Expression and Purification**, 2013, 91(1): 1-9.
- [20] CHEN F W, YANG X, PANG D X, et al. Expression, purification and antibody preparation using different constructs of PCV2 capsid protein[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2014, 67: 289-294.