

文章编号:1673-1689(2011)06-0934-06

Serpin 多抗制备和产 Serpin 的双歧杆菌菌株 的初步筛选

崔佳¹, 万翠香^{1, 2}, 杨友均¹, 黎鹏^{1, 2}, 魏华^{*1, 2},
章昭琳², 徐迪², 徐锋², 李波²

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学, 江西 南昌 330047; 2. 南昌大学 中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘要: 从长双歧杆菌 WBL001 基因组中克隆了 *serpin* 基因, 构建重组 Serpin 蛋白的原核表达体系 pBX₂-*serpin*, 纯化表达产物作为抗原, 免疫小鼠制备 Serpin 的多克隆抗体。采用偶联 Serpin 的磁珠纯化多克隆抗体, 并探究了不同溶剂对抗体洗脱效率的影响。纯化的多抗用于斑点杂交筛选产 Serpin 蛋白的菌株。结果表明: 磁珠纯化多克隆抗体以 1 mol/L NaOH 的洗脱率最高, 达 50%; 纯化后的 Serpin 抗体消除了与部分乳酸菌和致病菌的非特异性反应; 采用斑点杂交方法从 11 株双歧杆菌中筛选到婴儿双歧杆菌 WBAN07 具有类 Serpin 蛋白。

关键词: 长双歧杆菌 WBL001; *serpin*; 纯化; 抗血清; 斑点杂交

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Preparation of Polyclonal Antibodies of Serpin and Preliminary Screening of the Bifidobacteria Species of Yielding Serpin

CUI Jia¹, WAN Cui-xiang^{1, 2}, YANG You-jun¹, LI Peng^{1, 2}, WEI Hua^{*1, 2},
ZHANG Zhao-lin², XU Di², XU Feng², LI Bo²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang 330047, China)

Abstract: *Serpin* was amplified from the genome of *Bifidobacterium longum* WBL001. Recombinant plasmid pBX₂-*serpin* was constructed and expressed in *Escherichia coli* for Serpin production. The recombinant protein was purified and used as antigen for mice immunization. Antiserum was purified specifically by Serpin-coupled magnetic beads. The antibody eluting was optimized by using different eluents. Serpin-like protein was screened out from 11 *Bifidobacteria* strains by colony immunoblotting. The result indicated that 1 mol/L NaOH is the best fluent for antibody elution from magnetic beads (about 50% recovery). Non-specific reactions of antiserum with lactic acid bacterium and pathogens were eliminated after purification. Serpin-like protein

收稿日期: 2010-11-25

基金项目: 国家 863 计划项目(2008AA10Z337); 国家自然科学基金项目(30900038, 31000048); 江西省教育厅科研基金(GJJ10379)。

* 通信作者: 魏华(1966—), 男, 江西南昌人, 工学博士, 研究员, 主要从事食品生物技术研究。Email: weihua114@live.cn

had been found in *B. infantis* WBAN07 from 11 *Bifidobacteria* strains by colony immunoblotting.

Key words: *Bifidobacterium longum* WBL001, *serpin*, purification, antiserum, colony immunoblotting detection

双歧杆菌作为人体肠道微生态体系中的益生菌,发挥着生物屏障、营养、免疫、控制内毒素血症等生理作用。目前国内外报道双歧杆菌的作用与外膜蛋白密切相关^[1-3],如:Guglielmetti^[2]在具有高黏附力的两歧双歧杆菌 MIMBb75 中纯化到一种外膜脂蛋白 BopA,并证实其参与了双歧杆菌对 Caco-2 细胞的黏附;Candela^[3]研究发现乳双歧杆菌 BI07 表面存在人纤溶蛋白酶原的受体蛋白烯醇酶,这使得菌体表面获得蛋白水解性,进而推测有利于菌体在人体肠道内定植。

Serpin (serine protease inhibitor) 也存在于双歧杆菌表面,具有丝氨酸蛋白酶抑制剂的功能,由 350 至 500 个氨基酸组成。2006 年研究发现该蛋白起着保护菌体抵抗外源蛋白酶的消化作用,推测其可能参与双歧杆菌在人体肠道内的定植^[4]。目前, Serpin 在原核生物特别是双歧杆菌中的存在和分布及其功能的国内外研究报道甚少^[5-6]。

由于 *serpin* 基因的同源保守性较差^[7],通过保守序列引物扩增的方法很难达到分离 *serpin* 的目的,为此,通过制备 Serpin 多克隆抗体,利用免疫学斑点杂交方法筛选产 Serpin 或类 Serpin 蛋白的双歧杆菌。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株和质粒 金黄色葡萄球菌 cowan I (*Staphylococcus aureus* cowan I)、白色假丝酵母 Z1 (*Candida guilliermondii* Z1)、单核增生李斯特菌 54001 (*Listeria monocytogenes* 54001)、阪崎肠杆菌 45401 (*Enterobacter sakazaii* 45401)、福氏志贺菌 301 (*Shigella flexneri* 301)、副溶血弧菌 1997 (*Vibrio parahaemolyticus* 1997)、粪肠球菌 SL5 (*Enterococcus faecalis* SL5)、大肠埃希菌 O157 : H7 EDC (*Escherichia coli* O157 : H7 EDC)、植物乳杆菌 1.1856 (*Lactobacterium plantarum* 1.1856)、长双歧杆菌 WBL001 (*Bifidobacterium longum* WBL001)、两歧双歧杆菌 WBBi01 (*Bifidobacterium bifidum* WBBi01)、两歧双歧杆菌 WBBi02 (*Bifidobacterium bifidum* WBBi02)、

婴儿双歧杆菌 WBIN03 (*Bifidobacterium infantis*)、短双歧杆菌 WBBR04 (*Bifidobacterium breve* WBBR04)、动物双歧杆菌 WBBR05 (*Bifidobacterium animalis* WBBR05)、两歧双歧杆菌 WBBR06 (*Bifidobacterium bifidum* WBBR06)、婴儿双歧杆菌 WBAN07 (*Bifidobacterium infantis* WBAN07)、青春双歧杆菌 WBAD08 (*Bifidobacterium adolescentis* WBAD08)、乳双歧杆菌 WLABO9 (*Bifidobacterium lactis* WLABO9)、长双歧杆菌 C3 (*Bifidobacterium longum* C3)、大肠埃希菌 DH5 α (*Escherichia coli* DH5 α) 来源于南昌大学食品科学与技术国家重点实验室。表达载体 pBX₂ 为中国科学院微生物研究所陶勇博士惠赠。

1.1.2 实验对象 Balb/c 小鼠:南昌大学医学院动物实验中心提供。

1.1.3 主要器材 PVDF 膜: Millipore 公司产品;弗氏佐剂: Sigma 公司产品; Ni²⁺-NTA 树脂: Merk 公司产品。超声细胞破碎仪: 宁波新芝生物科技股份有限公司产品; PCR 仪: Eppendorf 公司产品; 离心机: Thermo 公司产品; 凝胶成像系统: Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 *serpin* 基因克隆 设计引物, PstI 上游: 5'-CGCGCGGCCGCCATATGTACCAATCGCT-GCTAAGTTCTGA-3' (Nde I),

Psr 下游: 5' - CAGCTGCAG CTCGAG GAACCGGTGTCGATCATCTTG-3' (Xho I)。

使用 2 $\times$ pfu Mix 通过 PCR 从长双歧杆菌 WBL001 基因组中扩增目的片段后加 poly A 尾并连接至 pMD18-T 克隆载体, 转入 *E. coli* DH5 α , 筛选获得阳性克隆子后测序。测序正确的目的片段经 Nde I 和 Xho I 双酶切后与表达载体 pBX₂ 连接构建重组表达载体 pBX₂-*serpin*, 挑取阳性克隆子, 双酶切验证及测序正确后, 转入表达宿主 BL21, 备用。

1.2.2 Serpin 蛋白的表达和纯化 将携带重组表达载体的 BL21 菌培养至 A₆₀₀ = 0.4 ~ 0.6, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 3 h。离心洗涤收集菌体后, 采用超声波破碎, 分离上清

和沉淀, SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。同时以空质粒的 pBX₂ 的 *E. coli* BL21 作为对照。参照 Ni²⁺-NTA His·Bind 树脂柱说明书对表达的 Serpin 蛋白进行特异性纯化。用 6 mol/L 尿素裂解液裂解包涵体蛋白, 制备包涵体蛋白的可溶液, 3 倍柱体积的洗脱缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 值为 8.0, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑) 可以将目的蛋白大量洗脱收集, SDS-PAGE 检测纯化结果^[8-10]。

1.2.3 抗血清制备 将纯化的 Serpin 蛋白与等量的弗氏佐剂混合均匀后免疫小鼠。第一次免疫用弗氏完全佐剂, 每只小鼠皮下注射 250 μ L (约 0.1 μ g/ μ L), 之后每隔 7 d 改用弗氏不完全佐剂加强免疫 5 次, 每只小鼠皮下注射 500 μ L (约 0.1 μ g/ μ L)。免疫 6 次后, 小鼠眼眶取血, 分离血清, 待用。采用间接 ELISA 法检测抗体效价, 抗原 Serpin 蛋白包被质量浓度为 25 μ g/mL, 抗血清倍比稀释 (V:V) 1:1 000、1:2 000、1:3 000、1:4 000、1:5 000、1:6 000, 实验操作步骤参见文献^[11]。

1.2.4 多克隆抗体的特异性纯化 采用磁珠纯化抗体法。先用 6.75 mg EDC 和 4 mg NHS 使 250 μ L 磁珠 (15.7 mg/mL) 羧基活化, 室温反应 40 min 后加 0.4 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.8, 加入纯化的抗原 Serpin 蛋白 500 μ L (约 0.1 μ g/ μ L), 此体系室温反应 3 h 后放 4 $^{\circ}$ C 过夜, 使抗原蛋白充分偶联到磁珠。次日吸掉未结合的蛋白, 加入 1.0 mL 3% BSA 封闭, 37 $^{\circ}$ C 180 r/min 振荡 1.5 h, 移去 BSA, 用 PBST 洗涤 3 次, 加入稀释 20 倍的抗血清 800 μ L, 反应 5 h, 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min, 使抗原抗体充分结合, PBST 洗涤 3 次, 用 50 μ L 1 mol/L NaOH 洗脱结合的抗体, 洗脱下来的抗体要及时将 pH 调整到 7.0, -20 $^{\circ}$ C 保存^[12]。

1.2.5 抗体洗脱效率分析 取 80 μ L 偶联了抗原 Serpin 蛋白的磁珠, 每管 10 μ L, 将其中 7 管加入抗血清, 结合 5 h, 另一管加入 PBS 作为空白对照, PBS 洗去未结合的抗血清, 分别用 1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH、质量分数为 10% TCA、体积分数 75% 乙醇、体积分数 50% 丙酮、80% 饱和硫酸铵洗脱结合抗体, PBS 洗脱组为阴性对照, 洗脱时间均为 1 min, PBS 洗 3 次, 加入羊抗鼠二抗 (稀释 5 000 倍) 各 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 30 min, PBS 洗 3 次, 加入 TMB 显色液, 显色 15 min, 加入终止液 (0.2 mol/L 浓 H₂SO₄), 450 nm 检测每管 OD 值。洗脱率 = (阴性对照 OD₄₅₀ - 各溶液 OD₄₅₀) / 阴性对照 OD₄₅₀ $\times$ 100%。

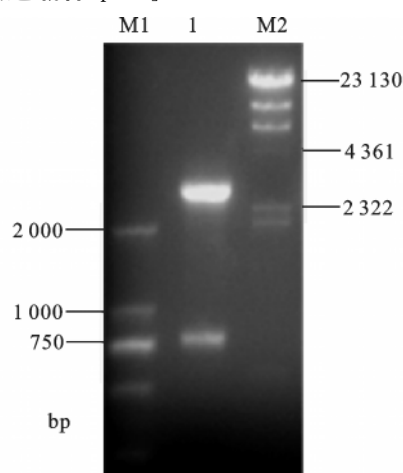
1.2.6 多克隆抗体的特异性检测 参照文献^[15]

做斑点杂交, 把材料 1.1.1 中的菌株分别活化培养, 取菌液各 5 μ L (10⁹ CFU/mL) 分别点于膜上, 加入抗血清 (稀释 5 000 倍) 孵育 1 h, 再加羊抗鼠 IgG 酶标二抗, 按照浓缩型 DAB 试剂盒的说明进行显色^[13-14]。

2 结果

2.1 重组质粒 pBX₂-serpin 的构建

重组质粒 pBX₂-serpin 双酶切鉴定结果如图 1 所示, 在 750 bp 左右酶切产生一条与目的片段 serpin 大小相符的条带, 表明目的片段 serpin 已成功连接入表达载体 pBX₂。



M1: DL2000; M2: λ -Hind III; 1: pBX₂-serpin digested by *Nde* I and *Xho* I

图 1 pBX₂-serpin 双酶切鉴定电泳图

Fig. 1 Electrophoresis pattern of recombinant plasmid pBX₂-serpin digested by two enzymes

阳性重组质粒序列分析表明: 克隆获得的 serpin 基因片段为 768 bp, 与 GenBank 中 *B. longum* WBL001 serpin 序列完全一致。

2.2 抗原表达

携带 pBX₂-serpin 的 *E. coli* BL21, 37 $^{\circ}$ C IPTG 诱导表达, 收集表达的上清与沉淀, 以带 pBX₂ 的 *E. coli* BL21 表达蛋白为对照, Serpin 蛋白的诱导表达结果如图 2 所示。诱导的 pBX₂-serpin 载体与空质粒诱导带相比, 在 33 000 附近出现一条显著的蛋白过量表达条带, 与目的蛋白预计大小相符。

2.3 Serpin 蛋白纯化

Serpin 包涵体蛋白用 6 mol/L 尿素溶解, 经过亲和柱纯化, 得到纯度较高的蛋白带, 如图 3 所示, 该纯化蛋白用于免疫小鼠, 制备多克隆抗体。

2.4 多抗效价检测

小鼠产生的抗血清经稀释梯度后, 其间接 ELISA 结果表明: 抗血清效价在 1:5 000 左右。

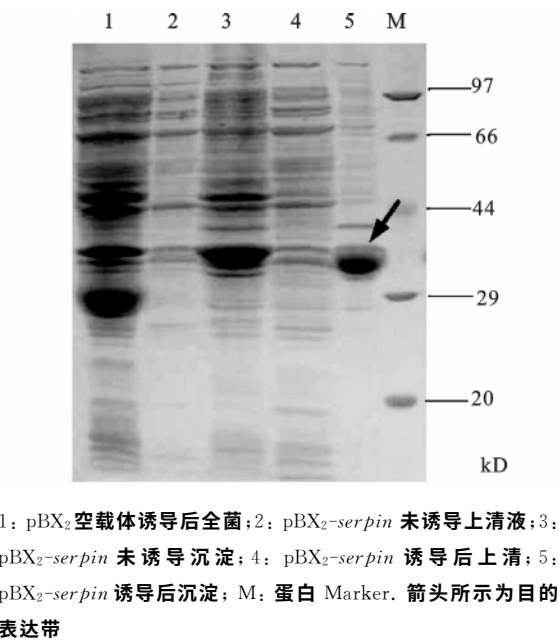


图 2 SDS-PAGE 检测 Serpin 蛋白表达图谱

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis pattern of the expression of Serpin

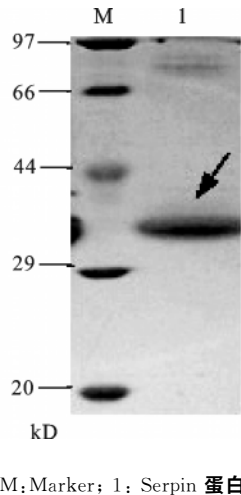


图 3 SDS-PAGE 检测 Serpin 蛋白纯化图谱

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis pattern of the purification of Serpin

2.5 特异性实验

2.5.1 抗体纯化 利用磁珠法对抗血清进行纯化的结果如图 4 所示,电泳显示抗体被解链为重链和轻链,可能是由于 Loading Buffer 中含二硫苏糖醇 (DTT)和 SDS 使蛋白内部二硫键解聚所致。

2.5.2 不同溶液对抗体洗脱效率的影响 纯化抗体实验中,6 种溶液分别洗脱 1 min,按 1.2.6 步骤计算出洗脱率,如图 5 所示,可知 1 mol/L NaOH 对抗体的洗脱效率最高。

2.5.3 交叉反应 20 株致病菌和益生菌与抗血清和纯化的 Serpin 抗体的交叉反应结果如表 1 所示。抗血清与金黄色葡萄球菌、白色假丝酵母、阪崎肠杆菌、福氏志贺菌、副溶血弧菌和部分乳杆菌有交

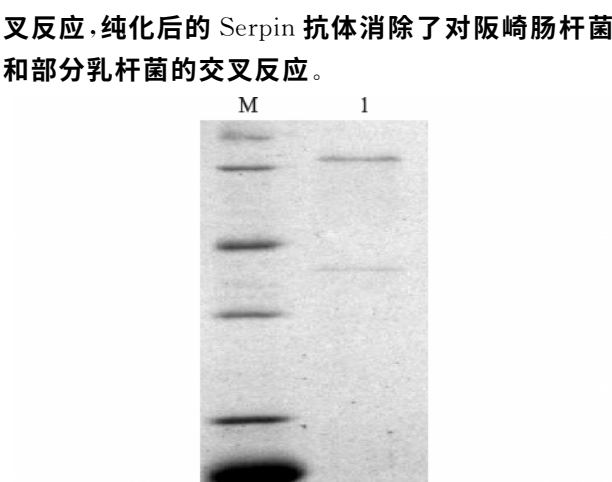


图 4 SDS-PAGE 检测 Serpin 抗体纯化图谱

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis pattern of the purification of antiserum

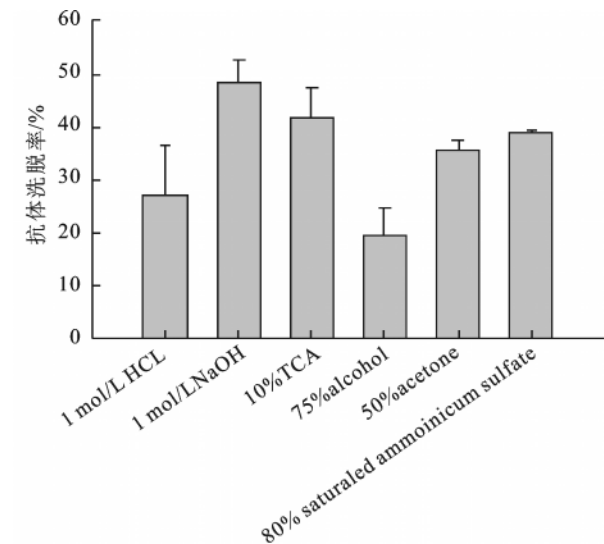


图 5 纯化抗体中不同溶液的洗脱率

Fig. 5 Efficiency of eluting antibody by different solutions

表 1 抗体特异性检测结果

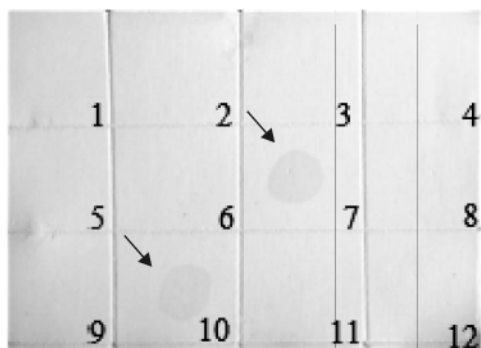
Tab. 1 The result of antibody specificity

编号	菌株	抗血清	纯化抗体
1	抗原蛋白 Serpin	+	+
2	金黄色葡萄球菌 cowan I	+	+
3	白色假丝酵母 Z1	+	+
4	单核增生李斯特菌 54001	—	—
5	单核增生李斯特菌 4b	—	—
6	阪崎肠杆菌 45401	+	—
7	阪崎肠杆菌 45402	+	—
8	福氏志贺菌 301	+	+

续表 1

编号	菌株	抗血清	纯化抗体
9	福氏志贺菌 2457	+	+
10	副溶血弧菌 1997	+	+
11	副溶血弧菌 1616	+	+
12	大肠埃希菌 O157:H7 EDC	+	+
13	粪肠球菌 SL5	+	—
14	嗜酸乳杆菌 ATCC4356	+	—
15	德氏乳杆菌 1.2624	—	—
16	鼠李糖乳杆菌 1.2134	+	+
17	植物乳杆菌 1.1856	—	—
18	保加利亚乳杆菌 F1	+	—
19	pBX2 BL21 表达菌	+	+
20	pBX2-serpin BL21 表达菌	+	+
21	金黄色葡萄球菌 26003	+	—

2.5.4 斑点杂交 11 株双歧杆菌作为实验组, 抗原 Serpin 和 PBS 为对照, 分别与纯化抗体反应, 杂交检测结果显示除长双歧杆菌 WBL001 有显色外, 婴儿双歧杆菌 WBAN07 也能与纯化抗体产生不同程度的显色反应。结果见图 6 所示。



1. 两歧双歧杆菌 WBB101; 2. 两歧双歧杆菌 WBB102; 3. 婴儿双歧杆菌 WBIN03; 4. 短双歧杆菌 WBBR04; 5. 动物双歧杆菌 MB254; 6. 两歧双歧杆菌 WBBR06; 7. 婴儿双歧杆菌 WBAN07; 8. 青春双歧杆菌 WBAD08; 9. 乳双歧杆菌 WLABO9; 10. 长双歧杆菌 WBL001; 11. PBS; 12. 长双歧杆菌 C3

图 6 纯化抗体与 11 株双歧杆菌斑点杂交检测结果

Fig. 6 The result of colony immunoblotting of purified antibodies and Bifidobacterium

3 讨论

双歧杆菌外膜蛋白的功能及其在不同种属中的分布是双歧杆菌功能研究的热点和难点。少量文献报道了双歧杆菌外膜蛋白参与肠上皮细胞的黏附、招募纤溶酶原以促进菌体对复杂基质的分

解、吸收利用等功能^[1-3]。然而, 由于外膜的较强疏水性、缺乏较好的筛选模型等, 使得双歧杆菌的外膜蛋白研究尚处于探索阶段。目前, 鲜有文献报道对特定外膜蛋白在双歧杆菌种属中的分布进行系统筛查。本研究利用免疫学的技术原理, 从已知产 Serpin 的双歧杆菌出发, 筛选产 Serpin 或类 Serpin 的双歧杆菌。

鉴于 Serpin 是一个跨膜蛋白, 具有较强的疏水性, 我们设计特异性引物, 从长双歧杆菌 WBL001 基因组中克隆了去掉跨膜片段的 *serpin* 基因, 构建了原核表达载体 pBX2-*serpin*, 实现了 Serpin 的高效表达。为从免疫血清中获得特异性强的 Serpin 多克隆抗体, 我们采用偶联 Serpin 的磁珠进行了纯化, 消除了对部分乳杆菌的交叉反应, 此种纯化抗体的方法特异性强, 为后续筛选产 Serpin 的菌株奠定了基础。斑点杂交是用来验证蛋白与蛋白之间、蛋白与菌体之间相互作用的一种简便的研究方法, 在本研究中, 我们应用斑点杂交的原理从 11 株双歧杆菌中筛选到了产 Serpin 的婴儿双歧杆菌 WBAN07。类似地, Nissen^[13]采用斑点杂交的方法检测 Serpin 蛋白在重组长双歧杆菌中的存在。Durecz^[14]采用一种菌体免疫斑点杂交的方法, 将制备的动物双歧杆菌的多克隆抗体与粪便中的菌株杂交, 检测粪便中长双歧杆菌的存在, 且证实了此多克隆抗体能与动物双歧杆菌表面的 45 kD 蛋白产生免疫反应。然而, 国内外鲜有采用本研究的系统方法从已知功能蛋白的益生菌菌株出发, 筛选产类似功能蛋白未知菌株的报道。

Serpin 作为 2006 年瑞士雀巢公司发现的来源于长双歧杆菌的丝氨酸蛋白酶的抑制剂, 目前仅发现其在长双歧杆菌和短双歧杆菌中存在。2010 年 Turrone^[7]采用 Northern 杂交, 引物扩增和 qRT-PCR 方法证实了短双歧杆菌中 Serpin 的存在。本研究发现的婴儿双歧杆菌存在 Serpin 蛋白, 丰富了其在双歧杆菌种属中分布的信息。

研究中纯化后的抗体虽消除了与阪崎肠杆菌、嗜酸乳杆菌和保加利亚乳杆菌的交叉反应, 然而与一些致病菌仍有交叉反应。经 NCBI 网站进行 BLAST 表明, Serpin 蛋白在肠杆菌、副溶血弧菌等 529 个菌种广泛存在, 这些致病菌和双歧杆菌的 Serpin 存在哪些氨基酸序列组成、蛋白结构及功能差异, 尚需进一步研究。

研究利用多克隆抗体斑点杂交的方法筛选功能蛋白, 为今后益生菌功能蛋白的筛选提供了方法学参考。

参考文献(References):

- [1] Aires J, Anglade P, Baraige F, et al. Proteomic comparison of the cytosolic proteins of three *Bifidobacterium longum* human isolates and *B. longum* NCC2705[J]. **BMC Microbiol**, 2010, 10: 29.
- [2] Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D, et al. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2008, 74(15): 4695—4702.
- [3] Candela M, Biagi E, Centanni M, et al. Bifidobacterial enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host[J]. **Microbiol**, 2009, 155: 3294—3303.
- [4] Ivanov D, Emonet C, Foata F, et al. A Serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases[J]. **J Biol Chem**, 2006, 281(25): 17246—52.
- [5] Roberts TH, Hejgaard J, Saunders NF, et al. Serpins in unicellular Eukarya, Archaea, and Bacteria: sequence analysis and evolution[J]. **J Mol Evol**, 2004, 59(4): 437—447.
- [6] Fulton KF, Buckle AM, Cabrita LD, et al. The high resolution crystal structure of a native thermostable Serpin reveals the complex mechanism underpinning the stressed to relaxed transition[J]. **J Biol Chem**, 2005, 280(9): 8435—8442.
- [7] Turrone F, Foroni E, Motherway MO, et al. Characterization of the serpin-encoding gene of *Bifidobacterium breve* 210B [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2010, 76(10): 3206—3219.
- [8] 贺松, 龚芳红, 张德纯, 等. 嗜酸乳杆菌 β -半乳糖苷酶基因的克隆及其作为食品级筛选标记的研究[J]. **食品与生物技术学报**, 2010, 29(5): 777—781.
- HE Song, GONG Fang-hong, ZHANG De-chun, et al. Cloning of β -Galactosidase gene from *Lactobacillus acidophilus* and study of its activity as a food-grade selection marker[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(5): 777—781. (in Chinese)
- [9] 王洪斌, 董丹, 许冰, 等. 蓖麻毒素 A 链基因的克隆表达, 纯化及其活性[J]. **食品与生物技术学报**, 2010, 29(1): 146—149.
- WANG Hong-bin, DONG Dan, XU Bing, et al. Expression, purification and characterization of ricin A from *E. coli*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(1): 146—149. (in Chinese)
- [10] Omori T, Ueno K, Muramatsu K, et al. Characterization of recombinant β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1[J]. **Chem Cent J**, 2010, 4: 9.
- [11] 高艳, 陈雪梅, 吴爱群, 等. 增强型绿色荧光蛋白原核表达纯化与多克隆抗体的制备[J]. **郑州大学学报: 医学版**, 2003, 38(3): 345—347.
- Gao Yan, Chen Xuemei, Wu Aiqun, et al. Expression and purification of enhanced green fluorescent protein and preparation of multiple cloning antibody[J]. **Journal of Zhengzhou University: Medical Sciences**, 2003, 38(3): 345—347. (in Chinese)
- [12] 徐锋, 彭珍, 万翠香, 等. 高特异性长双歧杆菌多克隆抗体的制备[J]. **中国生物制品学杂志**, 2010, 23(2): 182—184.
- Xu Feng, Peng Zhen, Wan Cuixiang, et al. Preparation of high specific polyclonal antibody against *bifidobacterium longum*[J]. **Chin J Biologicals February**, 2010, 23(2): 182—184. (in Chinese)
- [13] Nissen L, Pasini L, Biavati B, et al. cloning and detection of serpin-like protein encoding gene in *Bifidobacterium longum* strains[J]. **Ann Microbiol**, 2008, 58(1): 127—131.
- [14] Duez H, Pelletier C, Cools S, et al. colony immunoblotting method for quantitative detection of a *Bifidobacterium animalis* probiotic strain in human faeces[J]. **J Appl Microbiol**, 2000, 88, 1019—1027.
- [15] 彭珍, 魏华, 万翠香, 等. 单核增生李斯特菌 Internalin A 的克隆表达与抗体制备[J]. **中国微生态学杂志**, 2009, 21(12): 1073—1076.
- Peng Zhen, Wei Hua, Wan Cuixiang, et al. Cloning, expression and antisera preparation of internalin a from *Listeria Monocytogenes*[J]. **Chinese Journal of Microecology**, 2009, 21(12): 1073—1076. (in Chinese)