

鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因的克隆、序列分析及表达载体构建

孙 凯^{1,2}, 李新生^{1,2}, 崔保安^{1,2}, 陈红英^{1,2}, 魏战勇^{1,2}, 张 蕾^{1,2},
宋亚鹏^{1,2}, 阮武营^{1,2}

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002)

【摘 要】【目的】克隆鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因 cDNA 序列, 构建并鉴定其原核表达质粒 pET/Du MHC- I。【方法】依据 GenBank/DDBJ/EMBL 基因库中公布的鸭 MHC- I 基因序列设计 1 对引物, 采用 RT-PCR 技术从鸳鸯鸭脾脏组织中扩增 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因 cDNA, T-A 克隆到 pGEM-T Easy 载体中, 并进行测序。通过 PCR 和酶切的方法, 将鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因亚克隆入 pET-28a(+) 载体, 构建重组表达质粒 pET/Du MHC- I, 并进行 PCR、Nco I 和 Not I 双酶切及测序鉴定。【结果】测序结果表明, 获得了 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因, 其长度为 813 bp, 编码 271 个氨基酸。MHC- I α 链胞外区成熟肽基因与 GenBank 中登录的鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因序列的同源性为 89.4%~91.7%, 氨基酸同源性为 78.2%~83.7%; 与鸡、鹅、鹌鹑、草鱼、狗、猪、鼠和人的 MHC- I α 链胞外区成熟肽氨基酸序列的同源性分别为 64.6%, 79.3%, 59.4%, 41.0%, 26.6%, 45.0%, 12.5% 和 22.1%, 这表明 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因存在着种属多样性, 且亲缘关系越近, 同源性越高。所获重组表达质粒 pET/Du MHC- I 经 PCR、酶切、测序鉴定, 证实鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因 cDNA 已正确克隆入 pET-28a(+) 表达载体。【结论】成功克隆出鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因, 并构建了重组表达质粒 pET/Du MHC- I。

【关键词】 鸭; MHC- I α 链; 胞外区成熟肽基因; 原核表达载体

【中图分类号】 S858.32

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)02-0057-06

Gene cloning, sequence analysis and prokaryotic expression vector construction of duck MHC- I α chain mature peptide of the extracellular domain

SUN Kai^{1,2}, LI Xin-sheng^{1,2}, CUI Bao-an^{1,2}, CHEN Hong-ying^{1,2},
WEI Zhan-yong¹, ZHANG Lei^{1,2}, SONG Ya-peng^{1,2}, RUAN Wu-ying^{1,2}

(1 College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, He'nan Agriculture University, Zhengzhou, He'nan 450002, China;

2 He'nan Animal Food Safety Key Laboratory, Zhengzhou, He'nan 450002, China)

Abstract: 【Objective】The study was done to clone duck MHC- I α chain mature peptide gene cDNA sequence of the extracellular domain and construct a prokaryotic expression plasmid. 【Method】The cDNA of duck MHC- I α chain extracellular domain of mature peptide gene amplified with RT-PCR from healthy duck spleen tissue was cloned into pGEM-T Easy vector by T/A Ligation. After double digestion, MHC- I α chain extracellular domain of mature peptide cDNA fragment was subcloned into pET-28a(+) vector to construct a prokaryotic expression plasmid. Restriction endonucleases analysis and sequencing were used to

* [收稿日期] 2009-06-28

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划专项(2006BAD06A08)

[作者简介] 孙 凯(1982—), 男, 河南郑州人, 在读硕士, 主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。

[通信作者] 崔保安(1948—), 男, 河南南阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

conform the recombinant plasmid. 【Result】 The duck MHC- I α chain mature peptide gene of the extracellular domain is 813 bp in length encoding 200 amino acids. The gene shared 89.4%—91.7% nucleotide homology and 78.2%—83.7% amino acid homology with other duck MHC- I α chain mature peptide gene of the extracellular domain. Phylogenetic tree analysis indicated that the duck MHC- I α chain mature peptide gene sequence variation was related to genus, the nearer relationship, the higher homology. The duck MHC- I α chain mature peptide gene of the extracellular domain was correctly inserted into prokaryotic expression vector. 【Conclusion】 The result showed that the recombinant plasmid pET/Du MHC- I was constructed correctly, which paved the way for further studies on the MHC- I protein expression and its biological activities.

Key words: duck; MHC- I α chain; mature peptide of the extracellular domain; prokaryotic expression vector

主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC) 是免疫系统中最复杂、最具多态性的一类分子^[1]。MHC 基因是彼此连锁在一起的高度多态的基因群, 具有调控同种移植排斥反应、免疫应答和某些补体组分生成等复杂的功能。MHC 包括 MHC- I、MHC- II 和 MHC- III 3 类分子, MHC- I 由一条 α 链(重链)和 β_2 微球蛋白(轻链, β_2 m)组成, 其中 α 链由 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 3 个胞外区(功能区)、跨膜区和胞内区组成。 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 区域形成一个由 8 个 β 折叠和 2 个 α 螺旋组成的两端闭合的深槽, 能与大约 8~10 个氨基酸多肽结合。 α 链在内质网与 β_2 m 及抗原多肽形成复合体后被递呈到细胞表面, 从而诱导机体产生特异性的细胞毒性 T 细胞(CTL)免疫应答^[2]。

近年来爆发的全球性禽流感 (Avian influenza, AI), 给世界经济带来了巨大的损失, 同时也引起了一系列公共卫生问题, 而水禽是流感病毒 (Avian influenza virus, AIVs) 的重要储存宿主, 且在流感病毒的进化和生态分布中具有重要作用^[3-4]。仇保丰等^[5]对 2002~2006 年华东地区家鸭中不同亚型 AIVs 的血凝素 (Hem agglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA) 组成情况进行了调查, 结果表明该地区至少存在 9 种 HA 亚型和 6 种 NA 亚型组成的 13 种 AIVs 亚型。研究发现, 水禽不但是 AIVs 的巨大贮存库, 而且已成为自然感染、高度易感和死亡率高的禽类, 从家鸭体内分离的 H5N1 型 AIVs 毒力正在增强, 而且有引起家鸭发病的报道^[6-7]。MHC- I 是重要的免疫分子, 能够稳定地遗传, 并且与疾病有明显的相关性。研究鸭 MHC- I 结构是阐明其分子免疫系统的重要环节。

鸭是我国养殖量最大的水禽, 但对其基础免疫学方面的研究甚少, 空白点比较多, AIVs 对鸭是否

存在免疫逃逸以及如何提高鸭对 AIVs 的免疫应答, 目前尚不清楚。为了进一步探讨 MHC- I 的生物学功能, 本研究应用基因工程技术, 从健康鸭脾脏中提取总 RNA, 用 RT-PCR 方法克隆鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因, 并将其亚克隆入原核表达载体 pET-28a (+), 构建重组表达质粒 pET/Du MHC- I, 以期为进一步研究鸭 MHC- I 蛋白表达、重组蛋白活性及其在抗原识别和免疫应答中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

成年健康鸳鸯鸭, 购自河南郑州某鸭场; 高纯度总 RNA 快速提取试剂盒 (Trizol-离心柱型), 购自上海捷瑞生物工程有限公司; RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit, 购自 MBI 公司; Premix Ex Taq DNA 聚合酶, 限制性内切酶 *Eco*R I、*Nco* I 和 *Not* I 等, 均购自宝生物工程(大连)有限公司; B 型小量 DNA 片段快速回收试剂盒、B 型质粒小量快速提取试剂盒、DNA marker DL 2000, 为北京博大泰克生物基因技术有限公司产品; *E. coli* DH5 α 感受态细胞、pGEM-T Easy Vector、T4-DNA Ligase, 购自 Promega 公司; 原核表达载体 pET-28a(+) 和表达宿主菌 BL21(DE3), 由河南省农业科学院惠赠。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 上登录鸭 MHC- I mRNA 序列 (GI: AY294419), 运用 Olig 6.0 软件设计 1 对引物, 用于扩增鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因。上下游引物序列分别为: Du-m1: 5'-CTA CCA TGG GCG AGG CCC ACT CCC TGC-3'; Du-m2: 5'-AAT AAT GCG GCC GCT

CAC CAC GAG AAG AG-3'。上下游引物序列中下划线部分分别为 *Nco* I 和 *Not* I 酶切位点。引物由上海生物工程有限公司合成。该对引物理论跨幅为 832 bp,跨越鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因(813 bp)。

1.2.2 鸳鸯鸭脾脏组织总 RNA 的提取 将鸳鸯鸭颈静脉放血处死,无菌取脾脏组织,用灭菌生理盐水冲洗 2 次,置研磨器中,每克加 10 mL Trizol 裂解液进行匀浆后,直接用于总 RNA 提取或 -80 °C 保存备用。按高纯度总 RNA 快速提取试剂盒(Trizol-离心柱型)说明书,提取脾脏组织总 RNA,将 RNA -70 °C 保存或直接用于第一链 cDNA 的合成。

1.2.3 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因的 RT-PCR 扩增 取 RNA 1 μ g,采用 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA。以此 cDNA 为模板进行 PCR 反应,反应体系为:cDNA 4 μ L、上游引物(50 μ mol/L) 0.5 μ L、下游引物(50 μ mol/L) 0.5 μ L、Premix *Taq* 预混酶 10 μ L,补充灭菌去离子水至 25 μ L。反应条件:95 °C 5 min;94 °C 45 s,59 °C 45 s,72 °C 45 s,35 个循环;72 °C 10 min。然后用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)对 PCR 产物进行电泳检测。

1.2.4 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因的克隆与鉴定 回收 PCR 产物,将其克隆到 pGEM-T Easy Vector 中,构建重组质粒 pGEM/Du MHC- I,按如下反应体系进行克隆:纯化的 PCR 产物 4 μ L、pGEM-T Easy Vector 1 μ L、Ligation Solution I 5 μ L,16 °C 过夜。将得到的重组质粒 pGEM/Du MHC- I 转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂布于含 60 μ g/mL 氨苄青霉素(Amp)、20 mg/mL X-gal、24 mg/mL IPTG 的 LB 平板培养基上,37 °C 培养过夜,进行蓝白斑筛选。随机挑取白斑菌落接种于含 60 μ g/mL Amp 的 LB 肉汤培养基中,37 °C 振荡培养 12~16 h。抽提质粒,PCR 法初筛阳性重组质粒 pGEM/Du MHC- I,用 *Eco*R I 对重组质粒进行酶切鉴定。将经 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组菌送上海生物工程有限公司进行测序。

1.2.5 重组表达质粒 pET/Du MHC- I 的构建与鉴定 用 *Nco*I 和 *Not*I 双酶切重组质粒 pGEM/Du MHC-I,电泳、分离并回收 MHC-I α 基因,将其定向插入到经同样双酶切处理的原核表达载体 pET-28a(+)中,构建重组表达质粒 pET/Du MHC-I。目的基因与空载体 pET-28a(+)按 4 : 1 的比例混

合进行连接反应,加入 T4 连接酶 1 μ L,反应体积为 10 μ L,16 °C 连接过夜。取连接反应产物 5 μ L 转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素(Kan)的 LB 平板培养基上,37 °C 培养过夜。随机挑取单菌落,接种于含有 Kan 50 μ g/mL 的 LB 肉汤培养基中,37 °C 振荡培养 12~16 h,抽提质粒,PCR 初筛阳性重组表达质粒 pET/Du MHC-I,用 *Nco*I 和 *Not*I 进行酶切鉴定。将经 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组菌送上海生物工程有限公司进行测序,以验证重组质粒读码框的正确性。

2 结果与分析

2.1 鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因的扩增

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果获得了长度约为 830 bp 的特异性条带(图 1),与预期结果相符。

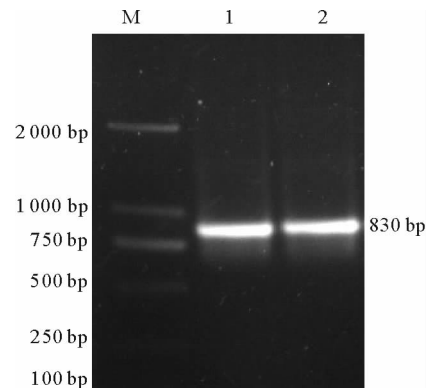


图 1 鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因的 RT-PCR 扩增
M, DNA Marker DL2000;1~2. RT-PCR 产物

Fig. 1 RT-PCR result of MHC- I α chain mature peptide gene of the extracellular domain

M, DNA Marker DL2000;1~2. RT-PCR of duck MHC class I gene segment

2.2 重组质粒 pGEM/Du MHC- I 的酶切鉴定

提取 PCR 鉴定为阳性重组菌的质粒 pGEM/Du MHC- I,用 *Eco*R I 进行酶切鉴定。pGEM-T Easy Vector 的长度为 3 015 bp,并有 2 个 *Eco*R I 酶切位点。重组质粒经 *Eco*R I 酶切后,电泳出现 2 条带,其中一条带为载体质粒,约 3 015 bp;另一条带为所克隆的鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因片段,约 830 bp(图 2),与预期结果相符。

2.3 鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因的测序与序列分析

测序结果(图 3)表明,本试验所扩增的鸭 MHC- I α 链核苷酸序列长度为 832 bp, G+C 含量为 60.5%。采用丹麦科技大学生物序列分析中心

提供的蛋白信号肽在线预测软件 Signal P 3.0 分析,结果显示,所获得的 832 bp 核苷酸序列中包含 1 个完整的鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因序列,共 813 bp。鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因与 GenBank 上已登录的鸭 MHC- I mRNA 序列同源 性为 89.4%~91.7%,氨基酸同源性为 78.2%~83.7%;与鸡、鹅、鹌鹑、草鱼、狗、猪、鼠和人的 MHC- I α 链胞外区成熟肽氨基酸序列的同源性分别为 64.6%,79.3%,59.4%,41.0%,26.6%,45.0%,12.5%和 22.1%,表明 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因存在种属多样性,且亲缘关系越近,同源性越高。将该成熟肽序列输入 DDBJ/MBL/GenBank 进行 Blast 同源分析,结果显示,排列在前 40 位的基因均为 MHC- I 类基因,且前 18 个均为已登 陆 GenBank 的鸭 MHC- I 序列,说明本试验所克隆 的基因具备鸭 MHC- I 的分子特征。pGEM/Du MHC- I 5' 端起始密码子(ATG)和 3' 端终止子 (TGA)及两侧 *Nco* I 和 *Not* I 限制性内切酶的识别 序列均完整。鸭 MHC- I α 链胞外区长度为 271 个

氨基酸,包括含 92 个氨基酸的 α 1 链、89 个氨基酸 的 α 2 链和 90 个氨基酸的 α 3 链。在 α 2、 α 3 区域分 别存在 2 个半胱氨酸和 1 个潜在的 N-糖基化位点。

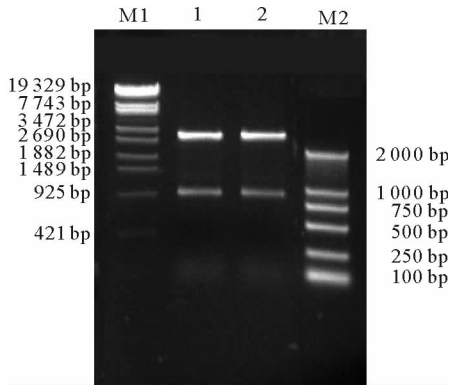


图 2 重组质粒 pGEM/Du MHC- I 的酶切鉴定

M1. λ -EcoT 14 I digest;1~2. *Eco*R I 酶切
重组质粒;M2. DNA Marker DL2000

Fig. 2 Identification by endonucleases analysis
of pGEM/Du MHC- I plasmid

M1. λ -EcoT 14 I digest;1~2. Recombinant plasmid
digestion by *Eco*R I ;M2. DNA Marker DL2000

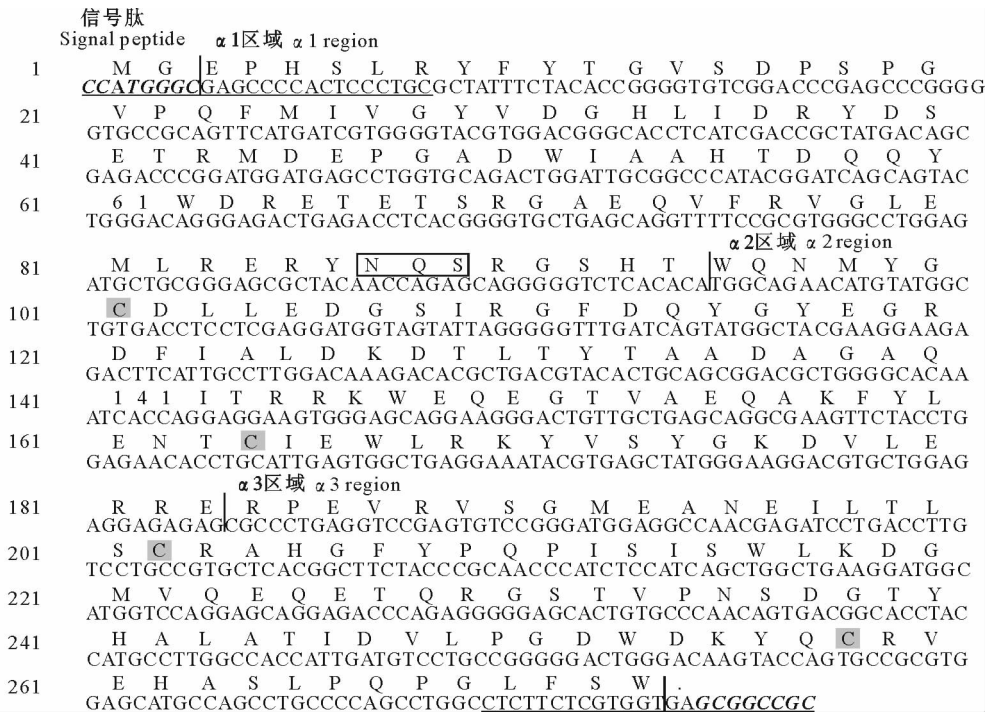


图 3 鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因的核苷酸序列

下划线部分代表引物序列;黑斜体部分代表酶切位点;方框内氨基酸为糖基化位点;阴影部分为半胱氨酸

Fig. 3 Duck MHC- I α chain mature peptide of the extracellular domain gene nucleotide and amino acids sequence

The underlined nucleotide sequence represent primer sequence;The bold italic represents restricti on sites.

The framed residues represent potential N-glycosalation sites;The shaded amino acids represent cysteine

2.4 重组表达质粒 pET/Du MHC- I 的鉴定

由图 4 可看出,重组质粒 pET/Du MHC- I 经 PCR 扩增,获得了 1 条 830 bp 左右的 目的条带;

pET/Du MHC- I 经 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切,出现了 2 条带,其中一条带为载体条带(长度约为 5 369 bp),另一条为插入的目的条带(长度约为 830 bp);

空载体 pET-28 a(+)经 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切,结果只有 1 条约 5 369 bp 的条带,试验结果均与预期结果相符。对经 PCR 和酶切鉴定为阳性的重组质粒进行测序,结果显示,所测序列与鸭 MHC- I α 链胞外区成熟肽基因的测序结果完全一致, pET/Du

MHC- I 5' 端起始密码子 (ATG) 和 3' 端终止子 (TGA) 及两侧 *Nco* I 和 *Not* I 限制性内切酶的识别序列均完整,且读码框正确。上述结果表明,重组表达质粒 pET/Du MHC- I 构建成功。

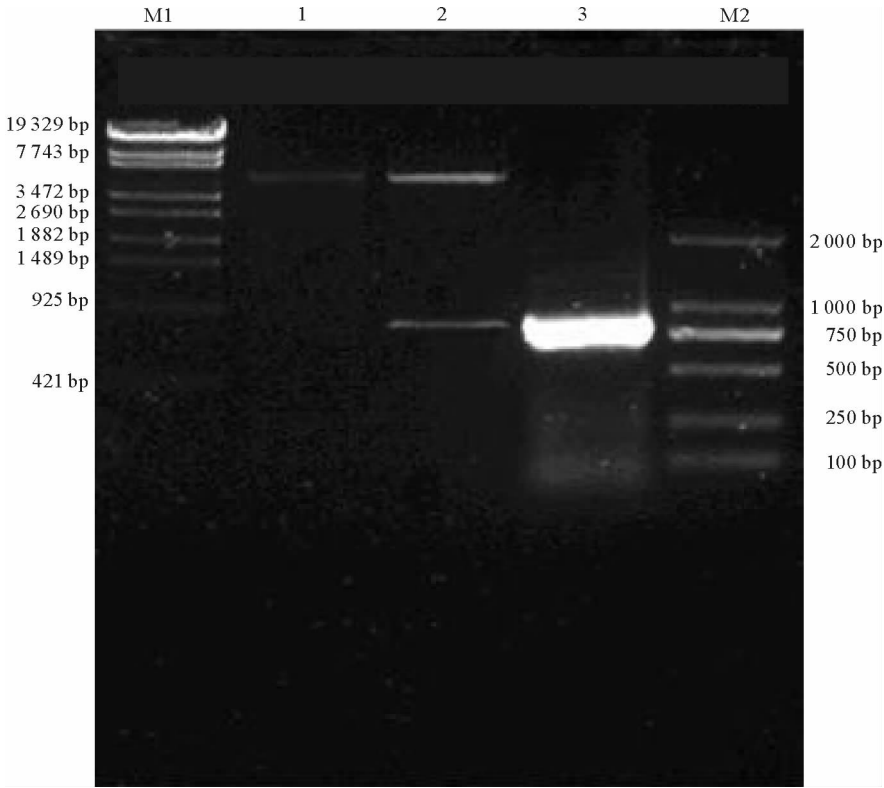


图 4 重组表达质粒 pET/Du MHC- I 的 PCR 和酶切鉴定
M1. λ -EcoT 14 I digest; 1. pET-28 α (+)空载体 *Nco* I 和 *Not* I 酶切产物; 2. 重组质粒 *Nco* I 和 *Not* I 酶切产物;
3. 重组质粒 PCR 产物; M2. DNA Marker DL2000

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid by digestion (by *Nco* I + *Not* I) and PCR
M1. λ -EcoT 14 I digest; 1. pET-28 α (+) digestion by *Nco* I + *Not* I ; 2. pET/Du MHC- I digestion
by *Nco* I + *Not* I ; 3. PCR product of recombinant plasmid; M2. DNA Marker DL2000

3 讨 论

据联合国粮农组织 (FAO) 的统计,自 20 世纪中期以来,世界鸭的总存栏量一直处于上升趋势。中国是世界上鸭存栏量最多的国家,约占世界总量的 70%,2005 年的鸭存栏量达 7.25 亿只,并且每年以 10%~15% 的速度增长。我国也是世界上鸭消费量最大的国家,鸭肉、蛋及鸭绒等产品给养殖户带来了巨大的经济效益。但随着养殖量的增加,鸭的疾病逐渐增多,并日趋复杂,而对于鸭疾病、病原和免疫学的研究远远落后于生产。

研究表明,鸭可能是 H5N1 禽流感病毒的隐性储存宿主,其在 H5N1 禽流感病毒感染其他家禽和人的过程中可能起着重要作用^[8]。目前,对鸭基础

免疫学的研究报道相对于鸡来说甚少,空白点比较多,尚需深入研究。MHC- I 是重要的免疫分子,能够稳定地遗传,并且与疾病有明显的相关性。研究鸭 MHC- I 结构是阐明其分子免疫系统的重要环节^[9-11]。

表位疫苗是用抗原表位制备的疫苗,该类疫苗安全、无毒、稳定,由于其分子结构小而简单,能够非常安全地促使动物抵抗病毒感染。目前设计多肽疫苗的关键,就是从动物传染病的病原中鉴定出合适的 T 或 B 细胞表位^[12]。因此,我们可以通过体外构建鸳鸯鸭 MHC- I - β 2m 复合物及其病毒多肽鉴定系统^[13-14],进行禽流感病毒抗原多肽测定,筛选出合适的表位。同时,这也可为进一步分析病毒跨物种感染提供资料。本研究将 MHC- I α 链胞外区成熟

肽基因片段亚克隆入原核表达载体 pET-28a(+), 为研究鸭 MHC- I α 链的表达、纯化以及体外构建鸳鸯鸭 MHC- I - β 2m 复合物奠定了基础,也为动物重大病原表位多肽鉴定平台的建立,提供了必要材料和支撑。

[参考文献]

[1] Bjorkman P J, Saper M A, Samraoui B, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2 [J]. Nature, 1987, 329(6139): 506-512.

[2] Gao G F, Tormo J, Gerth U C, et al. Crystal structure of the complex between human CD8 alpha and HLA-A2 [J]. Nature, 1997, 387: 630-634.

[3] Sturm-Ramirez K M, Ellis T, Bousfield B, et al. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks [J]. Journal of Virology, 2004, 78(9): 4892-4901.

[4] Takada A, Kuboki N, Okazaki K, et al. A virulent avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic [J]. Journal of Virology, 1999, 73(10): 8303-8307.

[5] 仇保丰, 刘武杰, 刘秀梵, 等. 近年来华东地区家鸭中流感病毒的亚型分布 [J]. 微生物学报, 2008, 48(10): 1290-1294.

Qiu B F, Liu W J, Liu X F, et al. Distribution of avian influenza virus subtypes among domestic duck in Eastern China [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(10): 1290-1294. (in Chinese)

[6] Chen H, Deng G, Li Z, et al. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in Southern China [J]. PNAS, 2004, 101(28): 10452-10457.

[7] Li K S, Xu K M, Peiris J S, et al. Characterization of H9 subtype influenza viruses from the Ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans [J]. Journal of Virology, 2003, 77(12): 6988-6994.

[8] 刘秀梵. 家鸭可能带来禽流感的新威胁-FAO、OIE 和 WHO 发出联合警报 [J]. 中国家禽, 2004, 26(22): 50.

Liu X F. FAO, OIE and WHO issued a joint warning-domestic ducks may have a new threat of avian influenza [J]. China Poultry, 2004, 26(22): 50. (in Chinese)

[9] 阮小飞, 闫若潜, 夏春, 等. 鸭 MHC- I 轻链 cDNA 克隆及其蛋白的二级结构分析 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 41-45.

Ruan X F, Yan R Q, Xia C, et al. cDNA cloning and protein structure analysis of duck MHC class I light chain (Anp1- β 2m) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2007, 15(1): 41-45. (in Chinese)

[10] Xia C, Lin C Y, Xu G X, et al. cDNA cloning and genomic structure of the duck (Anas platyrhynchos) MHC class I gene [J]. Immunogenetics, 2004, 56: 304-309.

[11] Mesa C M, Thulien K J, Moon D A, et al. The dominant MHC class I gene is adjacent to the polymorphic TAP2 gene in the duck, anas platyrhynchos [J]. Immunogenetics, 2004, 56: 192-203.

[12] Maeurer M J, Storkus W J, Kirkwood J M, et al. New treatment options for patients with melanoma: review of melanoma-derived T-cell epitope-based peptide vaccines [J]. Melanoma Res, 1996, 6(1): 11-24.

[13] 李新生, 陈红英, 夏春, 等. 禽流感病毒 T 细胞表位与体外重建鸡 MHC- I 类分子结合试验 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(12): 1335-1340.

Li X S, Chen H Y, Xia C, et al. Study on Avian Influenza Virus T cell epitopes binding with reconstructed chicken MHC- I molecules *in vitro* [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica 2007, 38(12): 1335-1340. (in Chinese)

[14] 李新生, 闫若潜, 夏春, 等. 珍珠鸡 MHC- I 轻链基因的克隆、可溶性表达与纯化 [J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(9): 47-50.

Li X S, Yan R Q, Xia C, et al. Cloning, expression and Soluble purification of the MHC- I light chain from chicken breed (numida meleagris) [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2006, 33(9): 47-50. (in Chinese)