

DOI:CNKI:61-1390/S.20110810.1021.012

网络出版时间:2011-08-10 10:21:00

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20110810.1021.012.html>

人 *XIAP* 基因多克隆抗体的快速制备方法研究

张婷婷,周光现,王 昕,张智英

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】探索快速制备高品质 X 连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)多克隆抗体的方法,为研究 *XIAP* 基因的功能及 *XIAP* 蛋白在肿瘤组织中的表达量检测提供参考。**【方法】**通过 RT-PCR 方法获得人 *XIAP* 基因的 CDs 区序列,与 pET151/D-TOPO 载体连接,构建 *XIAP* 基因的原核表达载体;考察细胞密度(OD_{600})、IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间对 *XIAP* 重组蛋白表达量的影响,以确定 *XIAP* 重组蛋白的最佳诱导条件,并用 Ni-NTA 亲和层析柱法纯化 *XIAP* 重组蛋白;用纯化的 *XIAP* 重组蛋白对 2 只成年新西兰白兔进行常规免疫后,再对其中 1 只进行耳静脉注射加强免疫,连续 3 d,每天免疫 1 次,用 ELISA 检测抗体效价,Western blot 检测抗体特异性。**【结果】**①通过 RT-PCR 方法获得人 *XIAP* 基因的 CDs 区序列,与 pET151/D-TOPO 载体连接,构建 *XIAP* 基因的原核表达载体,测序后,与 GenBank 中序列的的相似度为 97%。② *XIAP* 重组蛋白的最佳诱导条件为:温度 30 °C,初始诱导细胞密度(OD_{600})为 0.6, IPTG 浓度 0.5 mmol/L,诱导时间 4 h。在此条件下,*XIAP* 重组蛋白多以包涵体的形式存在于细胞沉淀中。③利用 Ni-NTA 亲和层析柱法,在 pH 为 5.9 和 4.5 的洗脱液中均可获得质量浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$ 的 *XIAP* 重组蛋白。④耳静脉连续加强免疫是刺激动物机体快速产生抗体的有效方法(31 d)。ELISA 和 Western blot 检测结果表明,耳静脉连续加强免疫产生的 *XIAP* 抗体的效价和特异性均明显高于常规免疫所产生的抗体。**【结论】**耳静脉连续加强免疫能够显著提高 *XIAP* 抗体的效价,且能有效缩短多克隆抗体的制备时间。

【关键词】 重组蛋白表达;多克隆抗体;*XIAP* 基因;耳静脉连续加强免疫

【中图分类号】 Q785;R392.11

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)09-0007-06

Study on a rapid method for preparation of human *XIAP* polyclonal antibody

ZHANG Ting-ting, ZHOU Guang-xian, WANG Xin, ZHANG Zhi-ying

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This paper aimed to explore the rapid preparation of high-quality *XIAP* polyclonal antibodies to provide a support for *XIAP* detection in early diagnosis of tumors. **【Method】** In the present study, we cloned the CDs fragment of human *XIAP* gene using RT-PCR technique, ligated with pET151/D-TOPO and constructed the vector pET151-*XIAP* for prokaryotic expression. Then we systematically investigated the conditions for the high level of the recombinant protein expression in prokaryotic system by testing cell density (OD_{600}), concentration of IPTG, inducing temperature and inducing time. Then we purified the *XIAP* protein by Ni-NTA kit and immunized rabbit by conventional immunization method coupled with ear vein immunization boosting. Finally, we developed a rapid method for preparation of *XIAP* polyclonal antibody. **【Result】** ① The CDs fragment of human *XIAP* gene using RT-PCR tech-

* [收稿日期] 2011-03-18

[基金项目] 西北农林科技大学引进人才启动基金项目(2111020821)

[作者简介] 张婷婷(1986—),女,山西寿阳人,在读博士,主要从事抗体制备及转基因动物研究。

[通信作者] 张智英(1958—),男,陕西兴平人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物基因组学、动物病毒及其在癌症治疗中的应用研究。

nique, ligated with pET151/D-TOPO and constructed the vector pET151-XIAP for prokaryotic expression was cloned. The similarity was 97% by sequencing detected. ② The optimized expression conditions of XIAP gene were obtained as follows: growth temperature 30 °C; the initial cell density for induction (OD_{600}) 0.6; IPTG concentration 0.5 mmol/L; induction time 4 h. In this situation, XIAP proteins were in the cell lysis as the Inclusion bodies. ③ 600 $\mu\text{g/mL}$ XIAP protein was obtained by Ni-NTA kit. ④ Conventional immunization method coupled with era vein immunization boosting for 3 days is an effective way to stimulate animal immune system to produce antibodies. ELISA and Western blot analysis showed that the titre and specificity of serum antibody from optimized immunization method is better than that from conventional immunization method. 【Conclusion】 Conventional immunization method coupled with era vein immunization boosting could dramatically increase the antibody titres and specificity and significantly shorten the antibody production time.

Key words: prokaryotic expression; polyclonal antibody; XIAP gene; immune boosting via era vein injection

X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)属于细胞内源性凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族中的一员,是 IAP 家族中作用最强的半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶抑制蛋白,主要由 3 个杆状病毒 IAP 重复序列区(Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat, BIR)和 1 个 RING 锌指结构域组成^[1]。XIAP 基因是一种具有潜在价值的肿瘤标志物。研究表明,骨肉瘤^[2]、前列腺癌^[3]、胰腺癌^[4]、肝癌^[5]、白血病^[6]等疾病与 XIAP 的过表达有密切关系。陈辉辉等^[7]研究表明,高表达 XIAP 蛋白的肿瘤组织对化疗药物的敏感性下降,是导致肿瘤对化疗药物产生耐药性的一个重要原因。关芳灵等^[8]研究表明, XIAP 表达下调可使细胞的增殖与凋亡达到相对平衡,并能使异常细胞及时得以清除,从而避免其向恶性肿瘤方向转化。据此推测, XIAP 可能在肿瘤的发生和发展中起着重要作用。快速制备效价高、特异性强的 XIAP 抗体,对于肿瘤的早期诊断和预防具有重要意义。为此,本试验应用 RT-PCR 技术和 TOPO 克隆方法,成功构建了 XIAP 基因的原核表达载体 pET151-XIAP,并系统研究了其原核表达的最优条件以及 Ni-NTA 亲和层析柱纯化方法;同时,采用常规免疫和耳静脉连续加强免疫方法在 31 d 内获得了 XIAP 多克隆抗体,为 XIAP 抗体的应用提供了原料,并且提供了一种快速制备多克隆抗体的免疫方法。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Trizol, 购自 Invitrogen 公司; Taq

DNA 聚合酶、MMLV 逆转录酶, 购自 TaKaRa 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体、TMB、ECL 显色液, 均购自上海普飞生物技术有限公司; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂, 购自 Sigma 公司; Ni-NTA 亲和层析柱, 购自北京百泰中原公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG), 购自 Promega 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.1.2 菌种及质粒 293T 人胚肾细胞、大肠杆菌 Rosseta(DE3)、JM109, 由西北农林科技大学动物基因组学实验室保存; 试验用质粒 pET151/D-TOPO, 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 试验动物 免疫用成年新西兰白兔, 购自西北农林科技大学种兔场。

1.2 pET151-XIAP 原核表达载体的构建^[9]

按照 Invitrogen 说明书提取 293T 人胚肾细胞系的 mRNA, 并按照 TaRaKa 公司 MMLV 逆转录酶说明书进行 RT-PCR 反应。利用 Clone ManagerV7 软件, 设计 XIAP 基因的特异性扩增引物, 上游引物为: 5'-CACCACCTTTTAACAGTTTT-GAAGGATCT-3', 下游引物为: 5'-TTAAGACATAAAAATTTGTGGCTG-3'。利用此引物, 以 293T 细胞 cDNA 为模板, 采用降落式 PCR 进行扩增。反应体系为: cDNA 1 μL , 10 $\times$ Taq Buffer 5 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL , 上、下游引物各 1 μL , Taq 酶 0.5 μL 。反应条件为: 首先 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 1 min, 64 °C 2 min, 72 °C 2 min, 15 个循环, 每个循环退火温度降低 1 °C; 然后再 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, 20 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min^[10]。PCR 产物经 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测, 进行胶纯化回收, 按 Invitrogen 说

说明书将回收目的片段与 pET151/D-TOPO 载体连接,构建 pET151-XIAP 原核表达载体,转化到大肠杆菌 JM109 进行扩增,对扩增后的质粒进行测序分析。引物合成及测序由金思特公司完成。

1.3 XIAP 重组蛋白诱导条件的优化^[11]

用 pET151-XIAP 载体转化大肠杆菌 Rosseta (DE3) 感受态细胞,涂布于含有 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h。挑取单克隆在 2 mL 液体 LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,第 2 天再将 2 mL 菌液接种到 50 mL 含有 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 LB 培养液中,分别检测细胞密度(OD_{600} 为 0.1,0.2,0.4,0.5,0.6,0.8 和 1.0)、IPTG 浓度(0,0.1,0.2,0.4,0.5,0.6,0.8 和 1.0 mmol/L)、诱导温度(18,25,30 和 37 $^{\circ}\text{C}$)和诱导时间(2,4,6 和 8 h)对 XIAP 重组蛋白表达的影响,以确定 XIAP 重组蛋白的最佳诱导条件,最后利用 12% SDS-PAGE 进行检测。

1.4 XIAP 重组蛋白的纯化

在最佳诱导条件下,将培养物接种到 200 mL 含有 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 LB 液体培养基中进行扩大培养。4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 15 min,收集诱导培养后的细胞沉淀,用 10 mL 8 mol/L 尿素裂解液重悬沉淀,并在冰上超声波破碎,然后再于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。按照 Ni-NTA 亲和层析柱说明书对重组 XIAP 蛋白进行纯化,然后利用 12% SDS-PAGE 进行检测。并用核酸蛋白检测仪对蛋白的表达量进行分析,最后用透析袋法对蛋白进行复性并冷冻干燥,于-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 XIAP 多克隆抗体的快速制备

1.5.1 动物免疫 将纯化后的 XIAP 重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂混合,充分进行乳化^[12],使其终质量浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$;然后按 1 mL/只的剂量皮下多点注射免疫成年新西兰白兔 2 只。初次免疫后,将 XIAP 重组蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂混合乳化后进行加强免疫,每 2 周 1 次,共免疫 2 次,每次免疫剂量为 300 μg 。末次免疫 3 d 后,经耳静脉采血并分离上清液,用 ELISA 法测定抗体血清的效价。免疫 31 d 后,对其中 1 只试验兔进行耳静脉注射加强免疫,连续免疫 3 d,每次用量为 600 μg 重组蛋白,再用 ELISA 法测定抗体血清效价;待获得满意效价后,心脏采血分离抗体血清。

1.5.2 XIAP 抗体效价的 ELISA 检测^[13] 用 0.05 mol/L 碳酸盐 (pH 9.6) 包被缓冲液将抗原蛋白 XIAP 稀释至含量为 10 $\mu\text{g/mL}$ 后,包被于聚苯乙烯

板的反应孔中,并用含 0.05 g/mL 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 进行封闭,所用一抗为梯度稀释的兔抗 XIAP 血清,二抗为羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体 (1 : 1 000)。再用 TMB 进行显色反应,酶标仪检测 OD_{450} 值,当试验孔 OD_{450} 值为阴性对照孔 OD_{450} 值的 2.1 倍以上时,即可判定为阳性。

1.5.3 XIAP 抗体特异性的 Western blot 检测^[14]

取重组 XIAP 蛋白 10 μg ,利用 12% SDS-PAGE 电泳检测,然后进行转膜 (60 V,1 h),再以含 0.05 g/mL 脱脂奶粉的 TBS 封闭 PVDF 膜,以 1 : 100 稀释的兔抗 XIAP 血清作为一抗,以 1 : 5 000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 作为二抗,最后用 ECL 法进行曝光。

2 结果与分析

2.1 XIAP 基因原核表达载体 (pET151-XIAP) 的构建

根据 Invitrogen Trizol 试剂操作说明,从 293T 人胚肾细胞中成功分离出了 RNA。经分光光度计检测, $A_{260}/A_{280}=2.0$,表明总 RNA 纯度满足 RT-PCR 的要求。为了降低非特异性扩增,采用降落式 PCR 扩增,获得 XIAP 的 CDs 区序列,经胶纯化回收后与 pET151/D-TOPO 载体连接,构建 pET151-XIAP 重组载体 (图 1),经测序后与 GenBank 中的序列进行比对,相似度为 97%。

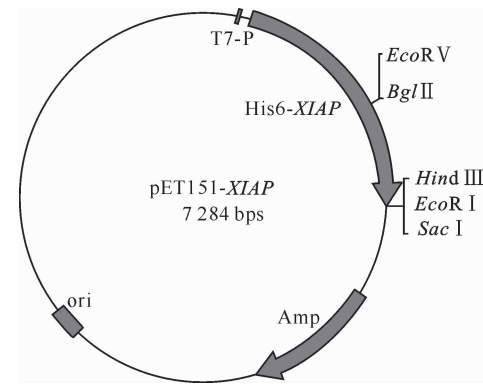


图 1 pET151-XIAP 载体的构建图谱

Fig. 1 Map of vector pET151-XIAP

2.2 XIAP 重组蛋白诱导条件的优化及蛋白纯化

由图 2 和图 3 可以看出,温度和 IPTG 浓度对 XIAP 重组蛋白的表达影响较大。其中诱导温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 时,XIAP 重组蛋白的表达量明显高于 25 和 37 $^{\circ}\text{C}$,而在 18 $^{\circ}\text{C}$ 时基本不表达;在不同温度下,XIAP 蛋白大部分存在于细胞沉淀中,说明诱导温度并未影响细胞质中 XIAP 重组蛋白的含量,XIAP

重组蛋白始终以包涵体的形式存在。IPTG 浓度为 0.5~0.6 mmol/L 时,XIAP 重组蛋白的表达量最

高;当 IPTG 浓度增加到 1 mmol/L 时,XIAP 重组蛋白的表达量并没有明显增加。

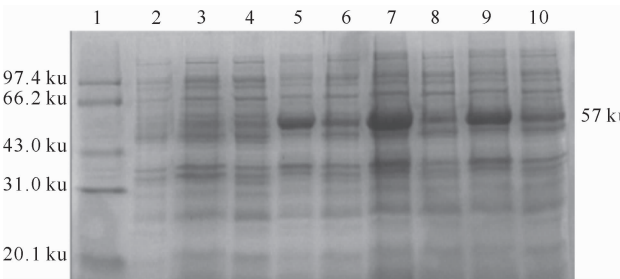


图 2 诱导温度对 XIAP 重组蛋白表达量的影响
1. 蛋白 Marker;2. 阴性对照;3,5,7,9. 分别为 18,25,30 和 37 °C 时沉淀中 XIAP 的表达量;
4,6,8,10. 分别为 18,25,30,37 °C 时上清液中 XIAP 的表达量

Fig. 2 Effect of the different induction temperatures on XIAP recombinant protein expression
1. Protein Marker;2. Negative control;
3,5,7,9. XIAP expression in precipitate at 18,25,30,37 °C ;
4,6,8,10. XIAP expression in supernatant at 18,25,30,37 °C

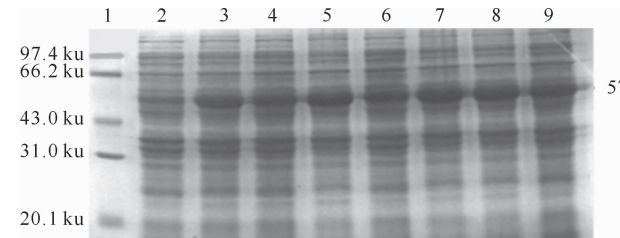


图 4 细胞密度对 XIAP 重组蛋白表达量的影响
1. 蛋白 Marker;2. 阴性对照;3~9. 细胞密度(OD_{600})分别为 0.1,0.2,0.4,0.5,0.6,0.8 和 1.0 时 XIAP 蛋白的表达量

Fig. 4 Effect of the different cell densities(OD_{600}) on XIAP recombinant protein expression
1. Protein Marker;2. Negative control;3~9. XIAP expression when cell density is 0.1,0.2,0.4,0.5,0.6,0.8 and 1.0

图 4 和图 5 显示,细胞密度和诱导时间对 XIAP 重组蛋白的表达量无明显影响。细胞密度(OD_{600})为 0.6 和诱导时间为 4 h 时,XIAP 重组蛋白的表达量分别达到最高。随着诱导时间的逐渐延长时,XIAP 重组蛋白的表达量不断减小,其原因可能与 XIAP 重组蛋白表达后对细胞产生了毒性有关。

由此确定,XIAP 重组蛋白表达的最佳条件为:诱导温度 30 °C ,初始诱导细胞密度(OD_{600})为 0.6 ,IPTG 浓度 0.5 mmol/L ,诱导时间 4 h。在此条件下,将 200 mL 菌液进行诱导培养后用于后续试验。

由于在克隆 XIAP 基因时其 5' 端连接有一个 His 标签,故用 Ni-NTA 亲和层析柱对 XIAP 重组蛋白进行纯化。由图 6 可知,在 pH 为 5.9 和 4.5 的洗脱液中均可得到表达量较高的 XIAP 重组蛋

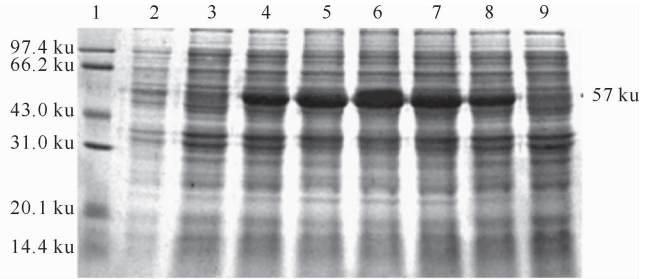


图 3 IPTG 浓度对 XIAP 重组蛋白表达量的影响
1. 蛋白 Marker;2. 阴性对照;3~9. IPTG 浓度分别为 0.1,0.2,0.4,0.5,0.6,0.8 和 1.0 mmol/L 时 XIAP 蛋白的表达量

Fig. 3 Effect of the different concentrations of IPTG on XIAP recombinant protein expression
1. Protein Marker;2. Negative control;3~9. XIAP expression when the concentration of IPTG is 0.1,0.2,0.4,0.5,0.6,0.8 and 1.0 mmol/L

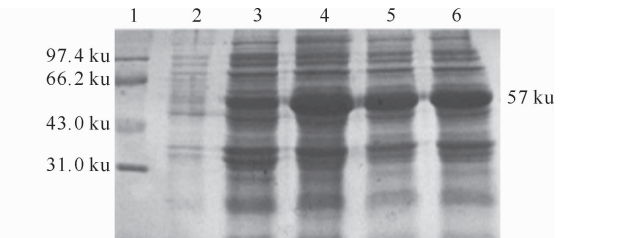


图 5 诱导时间对 XIAP 重组蛋白表达量的影响
1. 蛋白 Marker;2. 阴性对照;3~6. 诱导时间分别为 2,4,6 和 8 h 时 XIAP 蛋白的表达量

Fig. 5 Effect of the different induction time on XIAP recombinant protein expression
1. Protein Marker;2. Negative control;3~6. XIAP expression when induction time is 2,4,6 and 8 h

白。采用核酸蛋白检测仪分析,其蛋白质量浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$ 。

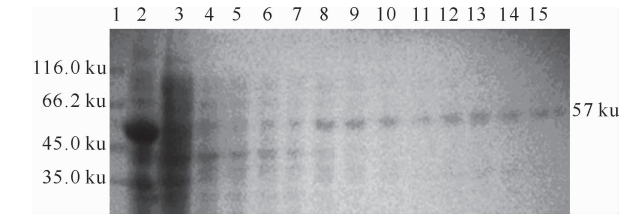


图 6 XIAP 纯化蛋白的 SDS-PAGE 检测
1. 蛋白 Marker;2. 破碎后细胞;3. 未结合的蛋白;4~7. 洗脱缓冲液洗脱;8~11. pH 5.9 溶解缓冲液洗脱;12~15. pH 4.5 溶解缓冲液洗脱
Fig. 6 Detection of SDS-PAGE for the purification of XIAP
1. Protein Marker;2. Cell lysate;3. Non-binding protein;
4~7. Washed by wash buffer;8~11. Washed by elution buffer(pH 5.9);12~15. Washed by elution buffer (pH 4.5)

2.3 XIAP 多克隆抗体的快速制备

表 1 显示,对 2 只成年新西兰白兔进行常规免疫 28 d 后,ELISA 检测结果显示,此时抗体效价为 1 : 5 000。对其中 1 只供试兔进行耳静脉加强免疫

3 次后,抗体效价达到了 1 : 25 000,比常规免疫提高了 4 倍(表 2),表明耳静脉连续加强免疫可以快速刺激机体产生抗体。本试验在 31 d 内可获得高效价的 XIAP 多克隆抗体。

表 1 常规免疫后 XIAP 多克隆抗体效价的的 ELISA 检测

Table 1 Determination of XIAP antibody obtained from routine immunization titer by ELISA

稀释倍数 Diluted multiple	阴性血清(OD ₄₅₀) Negative serum(OD ₄₅₀)	常规免疫兔血清(OD ₄₅₀) Positive serum(OD ₄₅₀)	试验值/阴性值 Ratio
1 : 1 000	0.030±0.005	0.163±0.034	5.43
1 : 3 000	0.021±0.008	0.182±0.024	8.67
1 : 5 000	0.014±0.002	0.097±0.041	6.93
1 : 8 000	0.012±0.003	0.026±0.006	2.00
1 : 10 000	0.002±0.001	0.003±0.077	1.50

表 2 加强免疫后 XIAP 多克隆抗体效价的 ELISA 检测

Table 2 Determination of XIAP antibody titer after boosting immunization by ELISA

稀释倍数 Diluted multiple	阴性血清(OD ₄₅₀) Negative serum(OD ₄₅₀)	加强免疫兔血清(OD ₄₅₀) Positive serum(OD ₄₅₀)	试验值/阴性值 Ratio
1 : 8 000	0.040±0.005	0.373±0.035	9.33
1 : 10 000	0.023±0.002	0.275±0.013	11.96
1 : 15 000	0.027±0.001	0.178±0.003	6.59
1 : 20 000	0.026±0.003	0.139±0.008	5.35
1 : 25 000	0.011±0.003	0.136±0.010	12.36

采用 Western blot 方法对 XIAP 多克隆抗体的特异性进行检测,结果(图 7)显示,在常规免疫和耳静脉连续加强免疫获得的抗体血清中,均检测到了分子质量约为 57 ku 的 XIAP 重组蛋白的特异性杂交条带,后者的反应强度明显高于前者,这与 ELISA 检测结果相符。

高质量浓度的 XIAP 重组蛋白,并建立了快速制备 XIAP 多克隆抗体的方法。

多克隆抗体具有特异性强、亲合力大、滴度高等特点,能够满足 ELISA、Western blot、免疫组化试验等对抗体的要求。高效、快速制备多克隆抗体在生命科学研究中具有重要意义。传统的兔多克隆抗体制备周期一般为 2~3 个月,本试验通过耳静脉连续加强免疫方法,将制备 XIAP 多克隆抗体的时间缩短至 31 d,且抗体效价(1 : 25 000)是常规免疫(1 : 5 000)的 5 倍。这表明耳静脉连续加强免疫不仅能够有效地刺激机体产生免疫反应,提高抗体效价,还能缩短抗体制备时间。但有研究表明,静脉免疫方法可能会增加动物体的免疫耐受力^[15],这也是影响静脉免疫方法广泛使用的重要原因之一。但本研究中未发现免疫耐受现象,而且耳静脉连续加强免疫方法可以提高抗体效价、缩短抗体制备时间。

XIAP 重组蛋白的原核表达和纯化条件的优化及其多克隆抗体快速制备方法的建立,为进一步研究 XIAP 基因的功能以及检测 XIAP 蛋白在肿瘤组织中的表达情况奠定了基础,同时,耳静脉连续注射加强免疫方法的建立,也为其他多克隆抗体的快速制备提供了参考依据。

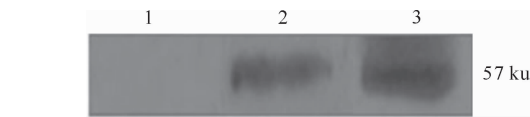


图 7 XIAP 多克隆抗体特异性的 Western blot 检测
1. 阴性对照;2. 常规免疫兔血清;3. 耳静脉连续加强免疫兔血清
Fig. 7 Western blot examination of antibody specificity
1. Negative control;2. Anti-serum from the conventional immunized rabbit;3. Serum from the boosting immunized rabbit

ELISA 和 Western blot 检测结果均表明,耳静脉连续加强免疫后产生的 XIAP 抗体效价和特异性均远远优于常规免疫产生的抗体。而且采用耳静脉连续加强免疫的方法能实现短时间内抗体效价的显著提高,是快速制备多克隆抗体的有效方法。

3 讨论

XIAP 是与肿瘤的发生和发展密切相关的基因之一。本研究通过克隆 XIAP 基因,成功构建了 XIAP 的原核表达载体;系统研究其原核表达的最优条件以及 Ni-NTA 亲和层析柱纯化方法,获得了

[参考文献]
[1] 张亚雷,张世能.凋亡抑制蛋白 XIAP 与消化系统肿瘤关系的研究进展 [J]. 国际内科学杂志,2007,34(11):657-659.

- Zhang Y L, Zhang S N. Advances in the research of the relation between XIAP and the gastrointestinal cancer [J]. International Journal of Internal Medicine, 2007, 34(11): 657-659. (in Chinese)
- [2] 杨运发, 杜 洪, 王建炜, 等. 凋亡抑制蛋白 XIAP 在骨肉瘤组织中的表达及意义 [J]. 中国骨肿瘤骨病, 2008, 7(3): 146-148. Yang Y F, Du H, Wang J W, et al. The expression of XIAP in osteosarcoma and its significance [J]. Chin J Bone Tumor & Bone Disease, 2008, 7(3): 146-148. (in Chinese)
- [3] 刘建河, 李 鸣, 夏术阶. 凋亡抑制基因 XIAP 在前列腺癌细胞中的表达及与临床病理特征的关系 [J]. 中华男科学杂志, 2004, 10(11): 832-836. Liu J H, Li M, Xia S J. Expression and clinical significance of antiapoptosis gene XIAP in prostate cancer [J]. National Journal of Andrology, 2004, 10(11): 832-836. (in Chinese)
- [4] 菅志远, 李宜雄, 李小刚, 等. XIAP 在胰腺癌组织中的表达及其意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(5): 385-387. Jian Z Y, Li Y X, Li X G, et al. Expression and significance of XIAP in pancreatic carcinoma tissues [J]. Chinese Journal of General Surgery, 2005, 14(5): 385-387. (in Chinese)
- [5] 陶璐薇, 林菊生, 陈孝平, 等. 肝细胞癌中 XIAP mRNA 及蛋白表达的意义 [J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(12): 2788-2791. Tao L W, Lin J S, Chen X P, et al. Expression of XIAP mRNA and protein in human hepatocellular carcinoma [J]. World Chin J Digestol, 2004, 12(12): 2788-2791. (in Chinese)
- [6] 张艳萍, 石太新. 凋亡抑制蛋白 XIAP、Survivin 与白血病 [J]. 白血病·淋巴瘤, 2009, 18(2): 117-119. Zhang Y P, Shi T X. Inhibitor of apoptosis proteins XIAP, survivin and leukemia [J]. Journal of Leukemia & Lymphoma, 2009, 18(2): 117-119. (in Chinese)
- [7] 陈复辉, 曲宏岩, 隋广杰. 凋亡抑制蛋白 XIAP 基因对 A549 细胞凋亡和化疗敏感性的影响 [J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11(3): 368-372. Chen F H, Qu H Y, Sui G J. Effects of apoptosis protein XIAP inhibitor on the apoptosis and sensitivity of chemotherapy in A549 cell [J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2008, 11(3): 368-372. (in Chinese)
- [8] 关芳灵, 马 敏, 尚丽芳, 等. X 连锁凋亡抑制蛋白在胆脂瘤中的表达及其与细胞凋亡的关系 [J]. 山西医药杂志, 2008, 37(6): 492-494. Guan F L, Ma M, Shang L F, et al. The expression of XIAP in middle ear cholesteatoma and the relationship with apoptosis [J]. Shanxi Medical Journal, 2008, 37(6): 492-494. (in Chinese)
- nese)
- [9] 田 宇, 潘玉琢, 高宇飞, 等. 逆转录 PCR 方法检测 *HoxA* 族基因在胶质瘤细胞 C6 中的表达 [J]. 中国神经肿瘤杂志, 2005(3): 200-203. Tian Y, Pan Y Z, Gao Y F, et al. Expression of mRNA for *HoxA* group genes in Glioma cell line C6 determined by reverse transcription-PCR [J]. Chinese Journal of Neuro-Oncology, 2005(3): 200-203. (in Chinese)
- [10] Barbro S, Wilfried K, Uwe T. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces [J]. Journal of Virological Methods, 1995, 55(3): 427-433.
- [11] 樊永峰, 吕传真, 赵延欣, 等. 融合蛋白 PTD-XIAP 的原核表达、纯化及其血脑屏障穿透能的初步鉴定 [J]. 中国临床神经科学, 2003, 11(4): 397-399. Fan Y F, Lü C Z, Zhao Y X, et al. Expression and purification of PTD-XIAP fusion protein and verification of the penetrability across the blood brain barrier [J]. Chinese Journal of Clinical Neurosciences, 2003, 11(4): 397-399. (in Chinese)
- [12] 万亚坤. 兔抗 hEra 多克隆抗体的纯化及其初步应用 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2001. Wan Y K. The purification and primary application of rabbit anti-hEra polyclonal antibody [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2001. (in Chinese)
- [13] 唐 艳, 李 慧, 张培因, 等. MUC1 核心肽多克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 中国生物制品学杂志, 2005, 18(2): 135-137. Tang Y, Li H, Zhang P Y, et al. Preparation and identification of polyclonal antibody against MUC1 core peptide [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2005, 18(2): 135-137. (in Chinese)
- [14] 张俊杰, 吴元明, 刘慧萍, 等. 兔抗人 ERA 抗血清的制备 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(1): 73-75. Zhang J J, Wu Y M, Liu H P, et al. Preparation of rabbit-anti human ERA serum [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2001, 17(1): 73-75. (in Chinese)
- [15] 李永柏, 易岂建, 李 秋, 等. 优选静脉免疫球蛋白剂量治疗川崎病临床与免疫学效应研究 [J]. 中华儿科杂志, 1999, 37(2): 97-100. Li Y B, Yi Q J, Li Q, et al. Which is the best dosage of intravenous immunoglobulin for treatment of Kawasaki disease: A comparative investigation on clinical and immunologic effects [J]. Chinese Journal of Pediatrics, 1999, 37(2): 97-100. (in Chinese)