

人胱抑素 C 的原核表达及活性鉴定^{*}

李 原¹, 刘如石², 蒋 琰¹, 李 桑³, 郑 姣³, 何 赛³, 吴 意^{1△} (1. 湖南师范大学第一附属医院
检验科, 长沙 410005; 2. 湖南师范大学医学院医学分子与免疫诊断实验室, 长沙 410013;
3. 湖南师范大学生命科学院, 长沙 410081)

【摘要】 目的 建立胱抑素 C 蛋白(Cys C)原核表达系统, 表达、纯化并鉴定重组的人 Cys C。**方法** 在不改变氨基酸序列的前提下, 对 Cys C 的编码基因进行大肠杆菌同义密码子偏好性优化后, 人工合成其序列, PCR 扩增 Cys C 基因, 在原核系统中表达重组人 Cys C。纯化表达的 Cys C 重组蛋白, 采用间接 ELISA 法测定其反应灵敏度及免疫原性。**结果** 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定可知, 重组基因在大肠杆菌中获得了有效表达, 相对分子质量约为 35×10^3 , Western blot 结果进一步说明重组蛋白为 Cys C 蛋白, 间接 ELISA 结果显示, 在包被浓度为 0.5 mg/L 时便产生了阳性值。**结论** 成功建立了 Cys C 原核表达系统, Cys C 蛋白作为抗原具有良好的免疫反应性与免疫原性, 为制备相应的抗原诊断单克隆抗体打下了基础, 同时也为开发 Cys C 快速诊断 ELISA 试剂盒提供了可选原料。

【关键词】 人胱抑素 C; 酶联免疫吸附试验; 免疫反应性; 免疫原性

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 06. 004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)06-0730-04

Prokaryotic expression and activity identification of human cystatin C* LI Yuan¹, LIU Ru-shi², JIANG Yan¹, LI Sang³, ZHENG Jiao³, HE Sai³, WU Yi^{1△} (1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410005, China; 2. Diagnostic Laboratory of Medical Molecule and Immunity, Medical College of Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410013, China; 3. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410081, China)

【Abstract】 Objective To establish a prokaryotic expression system of cystatin C (Cys C) protein for expressing, purifying and identifying recombinant human Cys C protein. **Methods** Under the premise of unchanging amino acid sequence, the Cys C coding gene was performed the Escherichia (E.) coli synonym codon bias optimization and its sequence was artificially synthesized. The Cys C gene was amplified by PCR. The human recombinant Cys C protein was expressed in the prokaryotic system. The expressed Cys C recombinant protein was purified. Its reaction sensitivity and immunogenicity were assayed by indirect ELISA. **Results** The SDS-PAGE identification indicated the recombinant gene gained the effective expression in E. coli, the molecular weight of recombinant Cys C protein was 35×10^3 . The Western blot results further revealed that the recombinant protein was Cys C protein, the indirect ELISA results displayed that when the coating concentration was 0.5 mg/L, the positive value would be produced. **Conclusion** The prokaryotic expression system is successfully established, Cys C protein as antigen has better immunoreactivity and immunogenicity, which lays a foundation for preparing corresponding antigen diagnostic monoclonal antibody, meanwhile also provides the optional raw material for developing Cys C rapid diagnosis ELISA reagent kit.

【Key words】 human cystatin C; enzyme linked immunosorbent assay; immunoreactivity; immunogenicity

胱抑素 C 蛋白(Cys C)相对分子质量为 13.3×10^3 , 由 122 个氨基酸残基组成, 它是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 是一种低相对分子质量、碱性非糖化蛋白质^[1]。Cys C 在血清中的浓度不受外界其他因素, 如体质量、年龄、性别等的影响, 其血清水平是由肾小球滤过率(GFR)决定的, 且 Cys C 的个体间变异非常小^[2]。Cys C 在体内的唯一排泄途径是通过肾脏排泄, 且在肾小管上皮细胞内完全降解, 这些特点使其能够更好地反映肾小球滤过屏障通透性的早期变化^[3]。相对于尿素、肌酐等传统肾功能指标, 血清中 Cys C 浓度的测定更符合理想的内源性 GFR 标志物的要求, 因而被作为评价 GFR 的新的敏感指标^[4-7]。Cys C 能及早发现肾脏功能的损害, 对糖尿病肾病、高

血压肾损伤和 HIV 时的肾脏功能受损的早期诊断都有很高的灵敏性, 而慢性肾脏疾病已经成为威胁各国人民健康的主要疾病, GFR 的早期诊断具有重要的临床意义, 因而, 建立快速检测 Cys C 的方法显得十分必要^[8-11]。

本研究拟采用大肠杆菌同义密码子偏好性优化来提高重组 Cys C 蛋白的表达产量, 使用基因重组策略制备重组人 Cys C 蛋白抗原, 用 Western Blot 和间接 ELISA 对重组人 Cys C 蛋白的免疫反应性及免疫原性进行检测。

1 材料与方法

1.1 实验材料 Cys C 基因经大肠杆菌同义密码子偏好性优化后, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成; BALB/C 小鼠由

* 基金项目: 湖南省科技计划项目(2014SK3100)。

作者简介: 李原, 女, 硕士, 初级检验师, 主要从事抗体及临床检验方面的研究。△ 通讯作者, E-mail: wuyi19701210@sina.com。

湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供;大肠杆菌 Top10F'、ER2566 菌株由本实验室保存。

1.2 主要试剂 HRP-羊抗兔由厦门大学夏宁绍教授惠赠;兔抗人 Cys C 多克隆抗体(北京安百胜生物科技有限公司);pET-32a(上海生物风公司);pMD18-T、dNTPs、rTaq 酶、T4DNA 连接酶、限制性内切酶 BamH I、Xho I(日本 TAKARA 公司);DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、Ni-IDA 柱(上海生工生物工程公司);HRP-DAB 底物显色试剂盒(北京康为世纪生物科技公司);弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司)。

1.3 方法

1.3.1 扩增 Cys C 基因 合成:查询到 GeneBank 中人 Cys C 功能区的氨基酸序列(NM-000099.3),将基因密码子置换为大肠杆菌偏爱的密码子,使其更加容易在大肠杆菌中表达。扩增:利用 Oligo6.0 软件,在上游引物引入 BamH I 位点(5'-GGATCCGCTGGTCCGCTGCGTG-3'),下游引物引入 Xho I 位点(RP5'-CTCGAGAGCGTCTTGACACGTTGATTT-3'),PCR 扩增 Cys C 基因。测序:将 PCR 产物回收并与 pMD18-T 扩增载体连接,转化至感受态细胞大肠杆菌 Top10F',提取质粒并送上海生工生物工程公司测序。

1.3.2 构建表达载体 测定序列无误后再酶切、回收脱抑素基因,与 pET-32a 表达载体连接,转化至 ER2566,并涂布于氨苄西林平板,37℃倒置培养 12 h。

1.3.3 Cys C 的小量诱导表达 选择氨苄西林平板上的单个菌落,接种到含氨苄西林的 LB 液体培养基中,37℃培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.6,加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)进行诱导表达,同时以转化重组 pET-32a-CysC 质粒的菌株不加 IPTG 作为阴性对照,37℃培养同样时间后,收集菌体,制备成蛋白样品,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

1.3.4 Cys C 活性鉴定 将 1.3.3 步骤制备的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后转膜,以免抗人 Cys C 多克隆抗体为一抗,HRP 标记的羊抗兔为二抗进行 Western Blot 检验。

1.3.5 目的片段的大量表达 将保存的重组 Cys C 表达菌株扩大培养,IPTG 37℃诱导 4 h 后收集菌体,加入细胞裂解液充分悬浮菌体后用超声仪破碎细胞。

1.3.6 表达方式鉴定 制样电泳:分别收集混合液、上清和沉淀制成蛋白样品,通过 12%SDS-PAGE 鉴定 Cys C 重组蛋白的表达形式。

1.3.7 纯化目的蛋白 确定表达方式为沉淀表达后,用 buffer I 和 TritonX-100 buffer I 依次洗涤包涵体共 4 次,再用 4 mol 尿素溶解包涵体,10 000 r/min 离心 10 min 后上清装入透析袋中,梯度透析复性后,10 000 r/min 离心 10 min,将上清转入镍层析柱内,依次加入 buffer 0、20、50、800 mmol/L 咪唑,收集 800 mmol/L 咪唑洗脱蛋白,在 20 倍体积的 PBS 溶液中透析过夜。收集透析后蛋白用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白含量,12% SDS-PAGE 检测目的蛋白纯化情况。

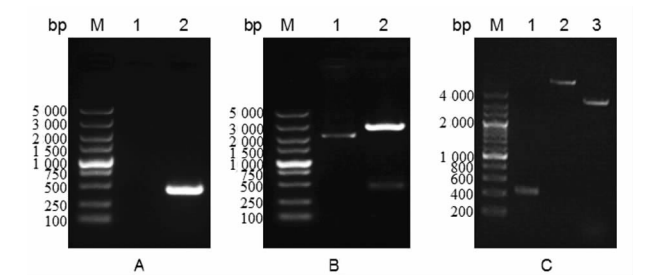
1.3.8 重组蛋白的抗原反应性检测 将纯化后的 Cys C 重组蛋白用 CB 稀释液稀释至 0.5 mg/L,包被 96 孔板,兔抗人 Cys C 多克隆抗体为一抗,HRP-羊抗兔为二抗,进行间接 ELISA。

1.3.9 Cys C 重组蛋白的免疫原性检测 用纯化后的 Cys C 蛋白混以佐剂免疫小鼠,在每次免疫的前 1 d 采集小鼠眼角血

进行间接 ELISA,以检测 Cys C 重组蛋白的免疫原性及血清抗体效价。

2 结果

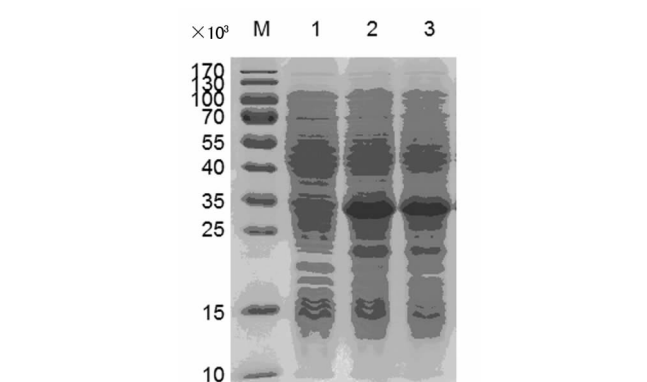
2.1 扩增 Cys C 基因及构建表达载体 以合成的 Cys C 基因为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经凝胶电泳鉴定,在约 450 bp 处有一条带,与预期大小相符,见图 1A。目的片段经切胶回收后与克隆载体 pMD18-T 连接,新的质粒命名为 pMD18-T-CysC,将 pMD18-T-CysC 转入大肠杆菌 Top10F'中,经过培养、提取质粒及 BamH I 和 Xho I 双酶切后得到的 DNA 片段进行琼脂糖凝胶电泳,可见约 450 bp 处的条带,与预期结果相符,测序结果证明为优化后的 Cys C 编码序列,见图 1B。将测序正确的重组质粒 pMD18-T-CysC 和表达载体 pET-32a 分别采用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切,然后将二者连接,连接质粒 pET-32a-CysC 转入到大肠杆菌 ER2566。表达质粒 pET-32a 经 BamH I 和 Xho I 酶切和电泳检测后,在大于 4 000 bp 位置有一条带,说明表达质粒 pET-32a 已成功被切开,见图 1C。



注: A 为 Cys C 基因 PCR 扩增电泳图谱,其中 M 为 DNA 相对分子质量标准;1 为阴性对照;2 为 Cys C 基因。B 为重组质粒 pMD18-T-Cys C 酶切鉴定电泳图谱,其中 M 为 DNA 相对分子质量标准;1 为重组质粒 pMD18-T-Cys C;2 为重组质粒 pMD18-T-Cys C 经 BamH I 和 Xho I 酶切后。C 为表达载体 pET-32a 酶切鉴定电泳图谱,其中 M 为 DNA 相对分子质量标准;1 为 Cys C 基因;2 为 pET-32a 经 BamH I 和 Xho I 酶切后;3 为 pET-32a 质粒。

图 1 重组质粒 pET-32a-Cys C 的构建过程与酶切鉴定

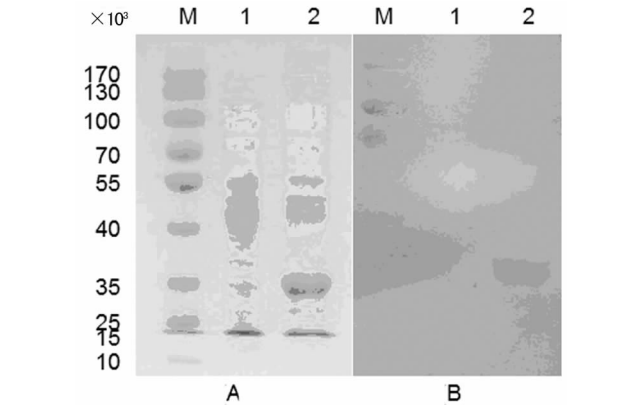
2.2 Cys C 的小量诱导表达 含有重组质粒 pET-32a-CysC 的大肠杆菌 ER2566 经 IPTG 诱导,制备成蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分析,由电泳图可知未用 IPTG 诱导的大肠杆菌未产生 Cys C,诱导后的菌株表达了一个相对分子质量约为 35×10³ 的蛋白,与预期目的蛋白大小相符(Cys C 相对分子质量约 13×10³,载体自带硫氧还蛋白相对分子质量 22×10³)。见图 2。



注: M 为蛋白质相对分子质量标准;1 为不加 IPTG 诱导的重组菌株表达的总蛋白;2~3 为重组菌株经 IPTG 诱导后表达的总蛋白。

图 2 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白

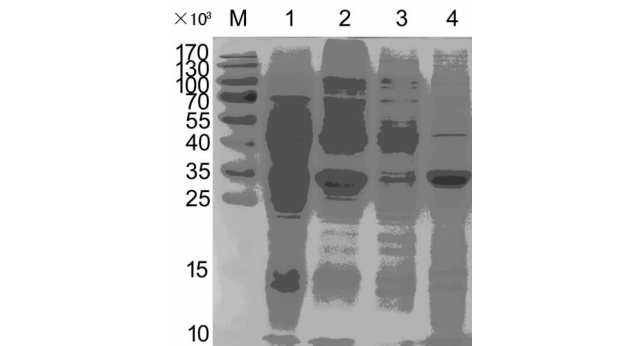
2.3 Cys C 的 Western Blot 鉴定 经 Western Blot 鉴定显示,重组表达产物与兔抗人 Cys C 抗体结合,在 35×10^3 处出现了反应条带,说明该重组表达产物即为目的蛋白。见图 3。



注:A 为 SDS-PAGE 鉴定结果图;B 为 Western Blot 鉴定结果图。其中 M 为蛋白质相对分子质量标准;1 为不加 IPTG 诱导的重组菌株表达的总蛋白;2 为重组菌株经 IPTG 诱导后表达的总蛋白。

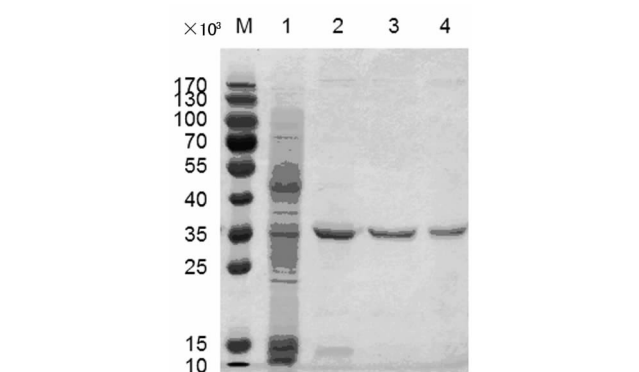
图 3 重组蛋白 Cys C 在大肠杆菌中的表达鉴定

2.4 目的片段的大量表达、表达方式鉴定及纯化 收集菌体,进行裂解,超声破碎后 SDS-PAGE 电泳,发现绝大多数 Cys C 出现在沉淀中,说明目的蛋白是以包涵体的形式表达。见图 4。用 Ni-IDA 柱子按说明书进行纯化,将纯化后的 Cys C 样品进行 PBS 透析。见图 5。



注:M 为蛋白质相对分子质量标准;1 为阴性对照;2 为细胞破碎后悬液;3 为细胞破碎离心后上清总蛋白;4 为细胞破碎离心后沉淀总蛋白。

图 4 重组蛋白 Cys C 在大肠杆菌中的表达形式鉴定



注:M 为蛋白质相对分子质量标准;1 为阴性对照;2 为纯化前的重组蛋白;3 为镍离子亲和层析纯化后的蛋白;4 为透析后的重组蛋白。

图 5 Cys C 蛋白纯化后鉴定

2.5 间接 ELISA 检测重组蛋白的抗原反应性 为检测所纯

化蛋白的抗原反应性,用羊抗人 Cys C 多克隆抗体进行 ELISA 反应,所纯化蛋白在低浓度时(0.5 mg/L)就能与多抗发生特异性结合,产生阳性结果,说明该重组蛋白具有极高的反应灵敏度。见表 1。

表 1 间接 ELISA 检测 Cys C 重组蛋白免疫反应性

抗原浓度($\mu\text{g/mL}$)		OD 值			
0		0.027 4	0.028 5	0.034 5	0.033 6
0.5		2.040 3	2.108 3	1.949 2	2.117 1

2.6 间接 ELISA 检测 Cys C 重组蛋白的免疫原性 以重组人 Cys C 作为抗原,免疫小鼠 3 次后,十万倍稀释后血清中 IgG 效价已达 1 以上,此时已满足研究需要,说明重组人 Cys C 作为抗原具有非常好的免疫原性。见表 2。

表 2 间接 ELISA 检测小鼠血清中抗体效价

小鼠编号	免疫前	第 1 次免疫后	第 2 次免疫后	第 3 次免疫后
1	0.050 0	0.272 3	0.679 9	1.657 2
2	0.043 2	0.228 7	0.778 0	1.256 9
3	0.058 3	0.402 1	0.976 9	1.001 8

3 讨 论

本研究根据 GeneBank 中人 Cys C 功能区的氨基酸序列,选择大肠杆菌喜好的编码密码子设计编码基因序列,交由生物公司合成。在前期预实验中发现:63℃时,可看出在 250~500 bp 之间发现唯一一条清晰的、大小约为 450 bp 的 DNA 条带,说明退火温度 63℃是本实验 PCR 扩增 Cys C 目的基因体系的最适温度。

临床上常用的检测 Cys C 方法为免疫浊度法,其检测 Cys C 的首要条件是 Cys C 蛋白抗原的制备和纯化。蛋白抗原一般有 3 种来源,一是从人或动物的组织、细胞、体液和组织间液中分离纯化,二是利用基因工程进行克隆和表达,三是通过人工合成的方法获得。而其中基因工程重组策略制备又分两种表达方式:原核和真核。真核表达成本高、制备工序也较复杂,国内有相关文献报道过,在巴斯德毕赤酵母中表达 Cys C,其表达量不高且培养周期长,操作过程比较繁琐、复杂,不适合大批量的 Cys C 重组蛋白的表达^[12]。相比较而言,原核表达成本低,制备过程也较真核表达简单。大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚、目的基因表达水平高、培养方法简单、生长周期短、成本低和抗污染能力强等优点,是表达多种蛋白质的理想工具。Cys C 蛋白作为一种非糖基化蛋白,对翻译后修饰要求不高;作为一种免疫原蛋白,对生物活性要求也不高,而且已经有国外学者通过原核表达获得了 CysC 融合蛋白^[13]。故本研究采用了原核表达制备 CysC 蛋白抗原,选取了 PET-32(a)原核表达系统,pET-32(a)是一种强有力的原核表达载体,目的蛋白产量高,它还是一种融合表达载体,自身携带编码一个相对分子质量约为 22×10^3 的硫氧还蛋白(Trx),而目的蛋白与 Trx 的融合表达,可以提高表达产物的稳定性。Trx 抗原性很小,表达后可不经蛋白酶切割去除而直接用于免疫动物,同时在目的蛋白的 N 端加上了 6 个组氨酸尾,可作为目的蛋白纯化的标签^[14]。

本研究构建了 pET-32a-CysC 表达载体,第一次利用大肠杆菌 ER2566 作为表达菌株进行了原核表达,结果证明这个表

达系统的表达周期短,37℃诱导4h即可在大肠杆菌中大量而高效的表达,这与国内的相关方面的研究结果基本上是一致的^[15-16]。经 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定,重组 Cys C 蛋白主要以包涵体的形式大量表达于沉淀中,包涵体的产生可能有两个方面的原因:(1)重组蛋白在生成过程中由于缺少某种协作因子;(2)环境因素导致重组蛋白难以连续形成次级键,导致中间产物相互凝集而形成包涵体。因为其空间构成的不正确,包涵体是不具备生物活性的。对于包涵体的纯化,传统方法就是利用重组蛋白理化性质的差异即分子性状、溶解度、等电点、亲疏水性及与其他分子的亲和性的不同的基础上进行纯化的;传统纯化包涵体首先要进行的步骤是利用变性试剂如尿素、盐酸胍等溶解包涵体,这种方法虽可得到较高产量的重组蛋白,但却可破坏蛋白的二级机构,影响重组蛋白的活性^[15]。为避免这种现象,本研究对重组 Cys C 蛋白的纯化采用了镍柱亲和层析的方法,镍柱亲和层析是一种金属螯合亲和色谱柱,其分离纯化的原理是利用蛋白质表面的某些氨基酸如组氨酸能与 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 等多种过渡金属离子发生特殊的相互作用,可以将富含这种氨基酸的蛋白质吸附从而达到分离纯化的目的。而本研究采用了 pET-32(a)作为表达载体,其可在表达的蛋白质 N 端加上了 6 个组氨酸尾,这样就可使镍柱亲和层析柱中的 Ni^{2+} 发生相互作用从而将重组的 Cys C 蛋白分离纯化出来。首先将包涵体用 buffer I 和 2% TritonX-100 buffer I 分别洗涤 2 次,SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定显示,洗涤后的包涵体已除掉了许多杂蛋白,重组 Cys C 蛋白已得到了初步纯化,采用镍柱亲和层析的方法对重组 Cys C 蛋白进行再次纯化,SDS-PAGE 蛋白电泳结果表明镍柱亲和层析纯化效果较好,经软件对纯化后的 Cys C 纯度分析,其纯度超过了 99%,说明镍柱亲和层析对重组 Cys C 蛋白的纯化效果很好,而且纯化前后重组 Cys C 蛋白的含量变化并不是很明显,说明在纯化的过程中重组蛋白并没有损失很多,这减少了大量制备重组 Cys C 蛋白的成本。将纯化后的洗脱液运用 BSA 试剂盒对重组人 Cys C 蛋白进行浓度测定,计算所得 Cys C 浓度为 0.5 g/L,与国内同期研究相比,用 pET-32a-CysC 表达载体在大肠杆菌 ER2566 中表达的重组人 Cys C 蛋白浓度更高,且纯度更好,更有益于人 Cys C 体外表达下一步的进行^[16-17]。

国内有研究制备了人 Cys C 的多克隆抗体,与单克隆抗体相比,多克隆抗体虽然制备成本较低,但它没有单克隆抗体的高特异性、高均一性和高重复性,并不适于某些临床疾病的诊断^[18-19]。用 pET-32a 表达载体在大肠杆菌 ER2566 中表达重组人 Cys C 蛋白为下一步制备高效价的 Cys C 单克隆抗体、获得 Cys C 单克隆抗体细胞株,并为建立定量检测人 Cys C 的乳胶颗粒增强免疫浊度法方法奠定了必要的基础。

参考文献

[1] Wasen E, Suominen P, Isoaho R, et al. Serum cystatin C as a marker of kidney dysfunction in an elderly population [J]. Clin Chem, 2002, 48(7): 1138-1140.

[2] 向礼贤. 血清胱抑素 C 检测与疾病[J]. Sichuan Med J, 2004, 25(11): 1258-1259.

[3] Cochran M, St Jone A. A comparison between estimates of GFR using DTPA clearance and the appuoximation of cock-croft and gault[J]. J Med, 1993, 23(5): 494-497.

[4] Delanaye P, Nellessen E, Cavalier E, et al. Is cystatin C

useful for the detection and the estimation of low glomerular filtration rate in heart transplant patients[J]. Transplantation, 2007, 83(5): 641-644.

[5] Séronie-Vivien S, Delanaye P, Piéroni L, et al. Cystatin C: current position and future prospects[J]. Clin Chem Lab Med, 2008, 46(12): 1664-1686.

[6] Brguljan PM, Cimerman N. Human Cystatin C[J]. Turkish J Biochem, 2007, 32(3): 95-103.

[7] Pucci L, Triscornia S, Lucchesi D, et al. Cystatin C and estimates of renal function: searching for a better measure of kidney function in diabetic patients[J]. Clin Chem, 2007, 53(3): 480-488.

[8] 何淑霞. 血清胱抑素 C 在糖尿病肾功能检测中的意义探讨[J]. 当代医学, 2011, 17(11): 47-48.

[9] Bhavsar NA, Appel LJ, Kusek JW, et al. Comparison of measured GFR, serum creatinine, cystatin C, and beta-trace protein to predict ESRD in African Americans with hypertensive CKD[J]. Am J Kidney Dis, 2011, 58(6): 886-893.

[10] Abiodun MT, Iduoriyekemwen NJ, Abiodun PO. Cystatin C-based evaluation of kidney function of hiv-infected children in Benin City, Southern Nigeria[J]. Int J Nephrol, 2012: 861296.

[11] Bevc S, Hojs R, Ekart R, et al. Simple cystatin C formula for estimation of glomerular filtration rate in overweight patients with diabetes mellitus type 2 and chronic kidney disease[J]. Exp Diabetes Res, 2012: 179849.

[12] 王清, 葛莹, 宋广辉, 等. 胱抑素 C 在巴斯德毕赤酵母的高效分泌表达及免疫原性分析[J]. 齐鲁医学杂志, 2013, 28(6): 493-500.

[13] Berti PJ, Ekiel I, Lindahl P, et al. Affinity purification and elimination of methionine oxidation in recombinant human cystatin C[J]. Protein Expr Purif, 1997, 11(1): 111-118.

[14] 陈婷梅, 俸家富, 曹炬, 等. 人胱抑素 C 的原核表达纯化鉴定及抗血清的制备[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 938-940.

[15] 杨霄鹏, 吕同德, 刘斌, 等. 重组人脂联素融合蛋白在大肠埃希菌 BL21 中的表达[J]. 兰州大学学报, 2011, 37(1): 6-10.

[16] 唐红卫, 刘一凡, 孙禅, 等. 胱抑素 C 原核表达载体的构建、表达及蛋白纯化[J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(10): 1055-1058.

[17] 周齐洋, 张小燕. 人胱抑素 C 的克隆和原核表达[J]. 放射免疫学杂志, 2013, 26(6): 766-769.

[18] 陈特, 黄美容, 王鹏, 等. 人胱抑素 C 的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(4): 473-476.

[19] 张宏斌, 武婕, 王雅丽, 等. 重组人胱抑素 C 及其多克隆抗体的制备[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(10): 1233-1235.