

H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 蛋白表达影响因素分析

李观强¹, 张志珍^{2*}, 李国明³

摘要 目的 优化高表达禽流感病毒 NS1 蛋白的实验方法。方法 将基因工程菌接种 LB 培养基, 设定 IPTG 终浓度为 0.3mmol/L, 诱导温度为 37℃, 诱导表达 6.0h, SDS-PAGE 分析融合蛋白表达情况, 确定最佳诱导时间。以 0.1mmol/L 为梯度, 设置不同 IPTG 诱导浓度, 37℃ 诱导 4.0h, 分析融合蛋白表达, 确定最佳 IPTG 诱导浓度。设定 IPTG 至终浓度为 0.6mmol/L, 分别于 24℃、28℃、32℃、37℃ 和 42℃ 下诱导表达 4.0h, 分析融合蛋白表达, 确定最适诱导温度。采用最优表达条件, 超声裂菌后 SDS-PAGE 分析融合蛋白, Western blotting 对融合蛋白进行鉴定。结果 当培养温度为 37℃, IPTG 浓度为 0.3mmol/L 时, 融合蛋白 GST-NS1 在 IPTG 诱导 5.0h 时的表达量最高, 达 28.5%; 当 IPTG 诱导浓度为 0.6mmol/L, 在 37℃ 诱导表达 4.0h 时, 融合蛋白的表达量可达 27.9%。选用优化的表达条件, IPTG 0.6mmol/L, 37℃ 诱导表达 4.0h, 融合蛋白的表达量最高可达 33.2%。进一步分析显示, 融合蛋白大部分以可溶形式表达, 其表达量可占菌体总蛋白的 25.1%。经 SDS-PAGE 电泳、电转移后, 用小鼠抗 GST 单克隆抗体进行免疫印迹分析, 出现一条阳性反应带。结论 通过实验优化了工程菌诱导表达的最佳 IPTG 浓度、最适时间和培养温度, 实现了融合蛋白的可溶性高表达。

关键词 禽流感; H5N1; NS1 融合蛋白; 原核表达

中图分类号 R511.7 **文献标识码** A **文章编号** 1009-9727(2012)1-1-05

Factors influencing the expression of NS1 protein from avian influenza virus H5N1 subtype. LI Guan-qiang, ZHANG Zhi-zhen, LI Guo-ming (1. Longgang District People's Hospital, Shenzhen 518172, Guangdong P. R. China; Corresponding author: ZHANG Zhi-zhen, E-mail: zzzhang@gdmc.edu.cn)

Abstract Objective To optimize the culture conditions for the high expression of NS1 protein. Methods Engineering bacteria were inoculated into LB medium and incubated with shaking. The IPTG concentration and culture temperature were set for 0.3mmol/L and 37℃ respectively, then the duration of induction were optimized. Inductions were initiated in turn at 0.5h intervals from 0.5h to 6.0h. The expression of fusion protein were assessed by SDS-PAGE using 12% acrylamide. The culture temperature and the duration of induction were set for 37℃ and 4.0h respectively, then the amount of IPTG were added from 0.1mmol/L to 1.0mmol/L final concentration, and the expression of fusion protein were assessed by SDS-PAGE. The IPTG concentration and the duration of induction were set for 0.6mmol/L and 4.0h respectively, then the optimal temperature was investigated by testing 24℃, 28℃, 32℃, 37℃, 42℃. The culture conditions were optimized, and bacteria were pelleted by centrifugation and disrupted by sonication, then the expression of fusion protein were assessed by SDS-PAGE and identified using Western blotting. Results The expression level of GST-NS1 fusion protein was 28.5% by using the induce temperature at 37℃, the IPTG concentration of 0.3mmol/L for 5.0h induction. The expression amount of fusion protein was also 27.9%, when the IPTG concentration was 0.6mmol/L and the induce temperature was 37℃ for 4.0h induction and the expression level was 33.2%. The recombinant fusion protein GST-NS1 was expressed in a soluble form by SDS-PAGE. Analysis and the expression amount of soluble GST-NS1 was 25.1% using 0.6mmol/L IPTG concentration and 37℃ for 4.0h induction. Separated proteins on SDS-PAGE gel were transferred electrophoretically onto PVDF membrane, then the membrane incubated with anti-GST mouse monoclonal antibody, finally the expected band was shown. Conclusion Conditions for induction were optimized resulting in high expression of fusion protein GST-NS1 in soluble form.

Key words: Avian influenza; H5N1; NS1 fusion protein; Prokaryotic expression

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)在许多家禽和野禽、尤其是自迁栖水禽中广泛分布, 而其在家禽中造成的危害最为严重。AIV 可以通过呼吸道、消化道、血液、皮肤损伤等途径进行传播引起禽类急性呼吸道传染病, 其发病率居传染病首位, 发病快, 传播迅速, 容易引起世界范围的大流行^[1]。之前曾认为禽

流感和人流感之间存在明显的宿主界限, AIV 需在猪体内与人流感病毒的基因片段重组后, 才能在人类中传播^[2-3]。但通过对 1997 年香港禽流感毒株的研究, 发现 H5N1 亚型流感病毒可以不需要中间媒介、在人体内重组或适应后直接感染人^[2-4]。自 2003 年 8 月~2011 年 4 月, H5N1 禽流感共造成 549 人感染, 320 人死亡,

基金项目: 东莞市高等院校科研机构科技计划重点项目经费资助(No.201108101007)

作者单位: 1. 深圳市龙岗区人民医院检验科, 广东 深圳 518172; 2. 广东医学院生物化学与分子生物学教研室, 广东 东莞 523808;

3. 广东医学院微生物与免疫学教研室, 广东 湛江 524023

作者简介: 李观强(1979~), 男, 汉族, 本科, 主管技师, 主要从事病原微生物学研究

* 通讯作者 E-mail: zzzhang@gdmc.edu.cn

其中我国 40 例感染 26 例死亡^[5]。基因组分析表明, AIV 的致病性除了与两种已知的病毒编码蛋白(血凝素 HA 和聚合酶 PB2)有关外, 还与病毒的非结构蛋白(Nonstructural protein 1, NS1)有关^[6,7]。AIV 的 NS1 蛋白在抑制宿主细胞蛋白质合成^[8]、下调细胞凋亡^[9]、拮抗干扰素产生^[10,11]等方面起着重要作用。在禽流感的防控方面, NS1 蛋白亦有广阔的应用前景^[12]。随着 H5N1 高致病力禽流感病毒 NS1 蛋白研究的深入和临床应用的日趋广泛, 无论科研或是工业生产均需要大量的 NS1 蛋白, 通过基因工程获得蛋白是最常采用的方式, 本文旨在探索一种高效获取 NS1 蛋白的实验方法, 为规模生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 含 pGEX-4T-3/ns1 重组质粒的 BL21 (DE3)工程菌由广东医学院生物化学与分子生物学教研室保存。胰蛋白酶、酵母提取物、琼脂粉购自 BBI 公司, 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、考马斯亮兰 -R250、TEMED、Triton X-100、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、氨苄青霉素 (Amp) 均购自 Amersco 公司, 鼠抗 GST 单克隆抗体、羊抗小鼠 IgG 购自 Santa Cruz 公司, ECL 发光试剂购自碧云天生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 IPTG 诱导融合蛋白表达的时间优化 将构建的 BL21(DE3)工程菌 50μl 接种于 5ml 含 Amp 的 LB 液体培养基振荡培养, 次日以 1:100 转接 LB 培养基, 37℃ 剧烈振荡, 待 A₆₀₀ 值达到 0.8~1.0 时, 在菌液中加入 IPTG 至终浓度为 0.3mmol/L, 37℃ 诱导表达 6.0h, 每 0.5h 收集 1ml 菌液。以 12% 的 SDS-PAGE 分析融合蛋白表达。

1.2.2 IPTG 诱导融合蛋白表达的浓度优化 将工程菌 50μl 接种于 5ml 含 Amp 的 LB 培养基中振荡培养, 次日以 1:100 转接 LB 培养基, 37℃ 剧烈振荡, 待 A₆₀₀ 值达到 0.8~1.0 时, 从 0.1mmol/L 至 1.0mmol/L 设置 10 个终浓度点加入 IPTG, 37℃ 诱导表达 4h。取菌液 1ml, 以 12% 的 SDS-PAGE 分析融合蛋白的表达。

1.2.3 IPTG 诱导融合蛋白表达的温度优化 将工程菌 50μl 接种于 5ml 含 Amp 的 LB 培养基中振荡培养, 次日以 1:100 转接 LB 培养基, 37℃ 剧烈振荡, 待 A₆₀₀ 值达到 0.8~1.0 时, 在菌液中加入 IPTG 至终浓度为 0.6mmol/L, 分别于 24℃、28℃、32℃、37℃、42℃ 条件下诱导表达 4h。取菌液 1ml, 以 12% 的 SDS-PAGE 分析融合蛋白的表达。

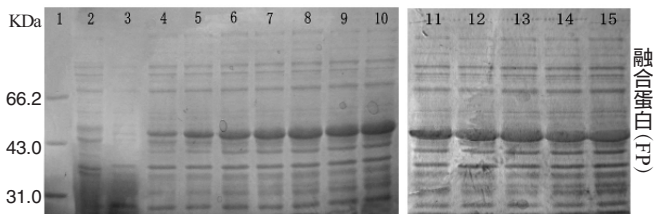
1.2.4 融合蛋白的优化表达及可溶性分析 采用上述优化的实验条件, 取 50μl 工程菌接种于 5ml 含

Amp 的 LB 培养基中, 37℃ 过夜培养。次日以 1:100 转接 LB 培养基, 37℃ 振荡培养, 待 A₆₀₀ 值达到 0.8~1.0 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.6mmol/L, 37℃ 诱导 4h。取 1ml 菌液, 10 000rpm 离心 2min 收集菌体。其中 1 管加入 200μl PBS 重悬菌体后, 冰浴中超声破碎(超声 5s, 间隔 5s, 功率为 400 W, 重复 80 次), 加入 20% Triton X-100 至终浓度为 1%, 4℃ 静置 30min, 12 000rpm 离心 10min, 收集上清, 沉淀再用 200μl PBS 重悬。另 1 管加入 200μl PBS 重悬菌体, 将准备好的 3 管样品加入上样缓冲液, 于 100℃ 水浴 5min, 12 000rpm 离心 2min, 取上清液以 12% 的 SDS-PAGE 分析融合蛋白的表达。

1.2.5 融合蛋白 GST-NS1 的 Western blotting 分析 离心后的上清液经 12% 的 SDS-PAGE 电泳后, 蛋白转移至 PVDF。PVDF 膜用 TBS 洗两遍, 移至含有封闭液的平皿中, 室温封闭 2h。将膜放入稀释好的含 GST 单抗的溶液中, 室温孵育 2h, 用 TBST 漂洗 4 次。二抗用 TBST 按 1:5 000 的比例稀释, 将膜放入, 室温下孵育 1h, 用 TBST 漂洗 4 次, 用 ECL 进行化学发光。

2 结果

2.1 IPTG 诱导时间对融合蛋白表达的影响 工程菌在 IPTG 浓度为 0.3mmol/L、37℃ 培养条件下, 从诱导开始至 6.0h, 每间隔 0.5h 收集 1ml 菌液, SDS-PAGE 分析融合蛋白表达。结果显示(图 1), 在相对分子量约 50.0KDa 处出现明显的诱导蛋白条带, 其大小与预期相一致。随着诱导时间的延长, 融合蛋白 GST-NS1 的表达量逐渐增加, 诱导至 5.0h 表达量不再增加。用凝胶分析软件 BandsScan5.0 分析, 各时间点融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的百分含量见图 2。融合蛋白在 IPTG 诱导 5.0h 的表达量占菌体总蛋白的 28.5%。



注: 1. 蛋白质分子量标准; 2. IPTG 诱导前的工程菌; 3. 宿主菌; 4~15: IPTG 诱导 0.5~6.0h 的工程菌

1. Molecular standard of protein; 2. Engineering bacterium before IPTG induction; 3. Host bacterium; 4~15: Engineering bacterium after induced 0.5~6.0 hour

图 1 IPTG 诱导时间对融合蛋白表达的影响

Fig1 Impact of IPTG induction time on expression of fusion protein

2.2 IPTG 浓度对融合蛋白表达的影响 采用不同浓度 IPTG (0.1~1.0mmol/L) 对工程菌进行诱导, 37℃ 培养 4.0h, 收集 1ml 菌液进行 SDS-PAGE 分析。在相对分子量约 50.0KDa 处出现预期的诱导蛋白条带(图 3)。

Bandscan5.0 软件分析显示,随着 IPTG 浓度从 0.1 mmol/L 逐渐递增,融合蛋白的表达量从 10.6%逐渐增加,当 IPTG 浓度达 0.6mmol/L 时,融合蛋白的表达量达到最高,为 27.9%,之后随着 IPTG 浓度的增加,融合蛋白的表达量降低(见图 4)。

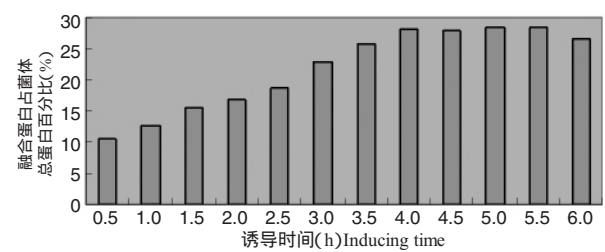
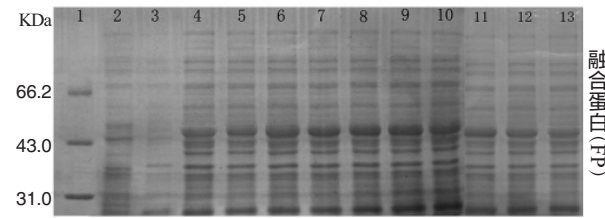


图 2 IPTG 不同诱导时间的融合蛋白表达量

Fig 2 Amount of fusion protein induced by IPTG at varying time



1:蛋白质分子量标准;2:IPTG 诱导前的工程菌;3:宿主菌;4~13:0.1mmol/L~1.0mmol/L IPTG 诱导的工程菌

1.Molecular standard of protein 2.Engineering bacterium before IPTG induction 3.Host bacterium 4~13 Engineering bacterium induced by 0.1 mmol/L~1.0mmol/L IPTG

图 3 IPTG 浓度对融合蛋白表达的影响

Fig 3 Impact of IPTG concentration on expression of fusion protein

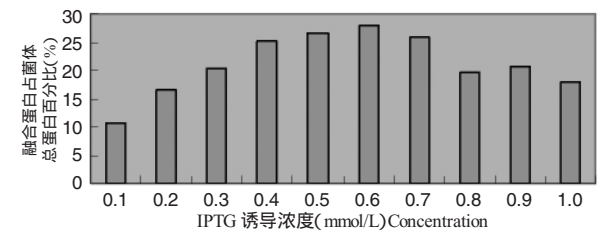


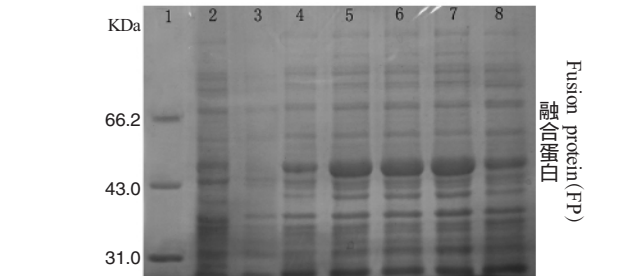
图 4 不同 IPTG 浓度诱导时融合蛋白的表达量

Fig 4 Amount of fusion protein expressed after induced by IPTG at different concentrations

2.3 诱导温度对融合蛋白表达的影响 工程菌分别在 24℃、28℃、32℃、37℃、42℃ 条件下用 0.6mmol/L IPTG 诱导表达 4.0h, SDS- PAGE 分析显示,在相对分子量约 50.0kDa 处出现明显的诱导蛋白条带,分子质量大小与预期相一致(图 5)。Bandscan5.0 软件分析显示,融合蛋白最高表达量的诱导温度为 37℃,融合蛋白表达量占菌体总蛋白的 32.5%(图 6)。

2.4 融合蛋白的优化表达及可溶性分析 工程菌在最佳条件下诱导表达,采用煮沸和超声破菌方式提取菌体总蛋白,以 SDS- PAGE 分析融合蛋白 GST- NS1 的表达结果见图 7,在分子质量约 50.0kDa 处出现预期诱导蛋白条带,而且融合蛋白主要以可溶形式表达。经 Bandscan5.0 软件分析显示,可溶性融合蛋白的

表达量占菌体总蛋白的 25.1%(表 1)。单因素优化表达与多因素优化表达对融合蛋白的表达量占菌体总蛋白百分比的影响见表 2。



1:蛋白质分子量标准;2:IPTG 诱导前的工程菌;3:宿主菌;4~8:24℃、28℃、32℃、37℃和 42℃诱导下的工程菌

1.Molecular standard of protein 2.Engineering bacterium before IPTG induction 3.Host bacterium 4~8 Engineering bacterium induced at 24℃, 28℃, 32℃, 37℃ and 42℃

图 5 不同诱导温度对融合蛋白表达的影响

Fig 5 Impact of different induction time on expression of fusion protein

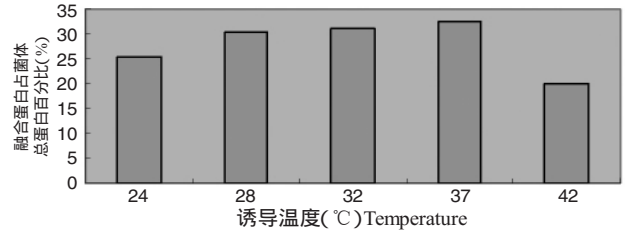
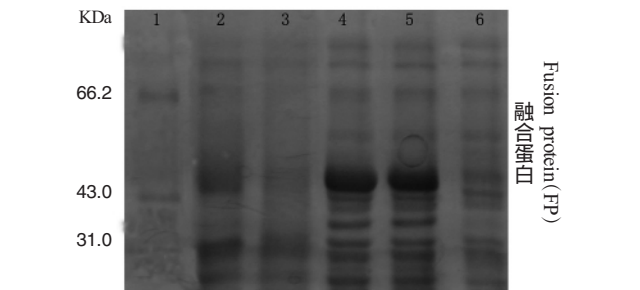


图 6 不同诱导温度下融合蛋白的表达量

Fig 6 Amount of fusion protein expressed after induced at different temperature



注:1:蛋白质分子量标准;2:IPTG 诱导前的工程菌;3:宿主菌;4:煮沸的工程菌;5:超声裂解的工程菌(上清液);6:超声裂解的工程菌(沉淀)

1.Molecular standard of protein 2.Engineering bacterium before induction by IPTG 3.Host bacterium 4.Boiled bacterium 5.Sonicated bacterium (supernatant) 6.Sonicated bacterium(sediment).

图 7 融合蛋白 GST- NS1 的表达分析

Fig 7 Expression of fusion protein GST- NS1

表 1 煮沸裂菌与超声裂菌分析融合蛋白的表达

Table 1 Expression of fusion protein of boiling splitting and sonicated bacteria

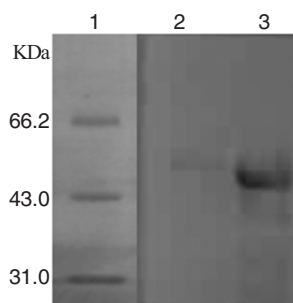
裂菌提蛋白方式 Splitting ways	融合蛋白占菌体总蛋白百分比 (%) Proportion of fusion protein to total protein
煮沸裂菌 Boiling	33.2
超声裂菌 (上清) Sonicated (supernatant)	25.1
超声裂菌 (沉淀) Sonicated (sediment)	2.5

2.5 融合蛋白 GST- NS1 的 Western blotting 分析 将 IPTG 诱导 4.0h 后的菌体超声裂解, 经 SDS- PAGE 分离、电转移后, 用小鼠抗 GST 单克隆抗体作一抗, 羊抗小鼠 IgG 作二抗进行免疫印迹分析, 出现明显的阳性反应条带(图 8)。

表 2 优化因素对融合蛋白表达量的影响

Table 2 Impact of optimized factors on expression of fusion protein

优化因素 Factor	融合蛋白占菌体总蛋白百分比 (%) Proportion of fusion protein to total protein
诱导时间 (4 h) Induction (4 h)	28.1
IPTG 诱导浓度 (0.6 mmol/L) Induction concentration of IPTG	27.9
诱导温度 (37℃) Induction temperature	32.5
诱导时间、IPTG 浓度、温度 Induction time, IPTG concentration and temperature	33.2



1: 蛋白质分子量标准 2: 阴性对照 3: 融合蛋白表达

1. Molecular standard of protein 2. Negative control 3. Expression of fusion protein

图 8 融合蛋白 GST- NS1 的 Western blotting 分析

Fig 8 Western blotting analysis of fusion protein GST- NS1

3 讨论

目前, 多采用大肠杆菌原核系统表达目的蛋白, 表达载体多选用 pET 系列, 但表达的蛋白多以包涵体形式存在, 这就增加了后续对包涵体的变、复性处理, 过程较为烦琐。丁细霞^[13]等采用 pET- 28(+)/ns1 重组质粒转化的阳性克隆菌(大肠杆菌 BL21), 通过优化表达条件, 在 1mmol/L IPTG、37℃ 诱导条件下, 5.0h 时目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 30%。进一步分离证实, 表达产物以包涵体形式存在。而 pGEX 系列载体带有 GST 标签, 可以增加目的蛋白的溶解度, 故本实验选用 pGEX- 4T- 3 作为表达载体。

影响原核表达的因素众多, 但诱导时间、诱导剂浓度和培养温度等影响较为显著, 本实验参考已有的资料, 将诱导表达温度控制在 37℃, IPTG 诱导浓度选用 0.3mmol/L, 表达时间以 0.5h 为间隔诱导 6.0h。实验结果表明, 在所设置的表达条件下, 含有 pGEX- 4T- 3/ns1 重组质粒的工程菌成功表达融合蛋白, 经凝胶

软件分析, 从 IPTG 诱导 0.5h 起, 融合蛋白的表达量随诱导时间逐渐增加, 诱导表达 4h 后, 融合蛋白的表达量达 28.1%, 而持续诱导 5.0h 后, 融合蛋白表达量达 28.5%, 但其表达增加不明显。因此, 从实验效率出发, 我们将 IPTG 的诱导表达时间设定为 4.0h。

在摸索最佳 IPTG 诱导浓度时, 采用已通过实验确定的最佳表达时间 4.0h, 把诱导温度控制在 37℃, IPTG 诱导浓度以 0.1mmol/L 为单位, 从 0.1mmol/L 递增至 1.0mmol/L, 共设置 10 个浓度梯度。所设置的表达条件下, 工程菌成功表达融合蛋白, 融合蛋白的表达量随 IPTG 浓度的增加逐渐增多, IPTG 诱导浓度从 0.6mmol/L 始, 融合蛋白的表达量逐渐减少。IPTG 作为实验室常用的乳糖操纵子诱导剂, 是一种十分有效的诱导剂。可特异性结合 lac 编码的阻遏蛋白, 改变阻遏蛋白的构象, 从而诱导 T7 启动子启动重组基因的转录和表达^[14]。Fass 等^[15]研究表明, IPTG 的剂量有一定范围, 浓度过低影响目的蛋白的表达, 浓度过高则抑制细菌的生长。从规模化生产的角度考虑, 本实验中工程菌用 IPTG 诱导表达时, 其最佳浓度选用 0.6mmol/L。

采用通过实验确定的最佳表达时间 4.0h, 最佳 IPTG 诱导浓度 0.6mmol/L, 我们设置了 24℃、28℃、32℃、37℃、42℃ 5 个不同诱导温度。在所设置的表达条件下, 工程菌成功表达融合蛋白, 融合蛋白的表达量随温度从 24℃ 至 37℃ 逐渐增加, 当诱导温度为 37℃, 融合蛋白的表达量最高, 为 32.5%(见图 6), 而当诱导温度升高至 42℃ 时, 融合蛋白的表达量只有 20%。为此, 本研究中, 诱导表达的温度选用 37℃, 这一温度与大肠杆菌最佳生长温度一致。

综合上述实验得出的最佳表达条件, 对工程菌进行 IPTG 诱导表达。从表 1 可知, 综合最佳条件时融合蛋白的表达量比单一最佳条件的表达量要高, 因最佳诱导温度是在最佳诱导时间和最佳 IPTG 诱导浓度的基础上进行的, 所以, 其在 37℃ 诱导表达融合蛋白的结果应该与综合最佳因素表达的结果相近。通过本研究, 含 pGEX- 4T- 3/ns1 的工程菌高表达融合蛋白的条件为 0.6mmol/L 的 IPTG 浓度下, 37℃ 诱导表达 4.0h。工程菌诱导表达后, 若采用煮沸方法收集上清, SDS- PAGE 分析显示, 融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 32.2%。若采用超声方法破菌收集上清, SDS- PAGE 分析, 融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 25.1%, 而超声方法离心得到的沉淀中, 融合蛋白的表达量仅占菌体总蛋白的 2.5%。结果提示, 在优化的条件下采用 IPTG 诱导, 融合蛋白主要以可溶形式表达, 说明本研究构建的基因工程菌和优化的诱导表达条

件可用于大规模表达重组蛋白 NS1。pGEX- 4T- 3 表达载体上带有 GST 标签,若采用亲和层析纯化,即可得到重组蛋白 NS1。下一步可在本研究的基础上对表达的融合蛋白 GST- NS1 提纯后进行生物活性或免疫活性研究。

参考文献:

- [1] Liu JH ,Tian KG . High attention to the public health significance form of the highly pathogenic avian influenza[J] . Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica 2004 ,12(4) :193-196.(In Chinese)
(刘金化,田克恭.高度重视高致病性禽流感病毒的公共卫生学意义[J].中国实验动物学报,2004,12(4):193-196.)
- [2] Horimoto T ,Kawaola Y . Pandemic threat posed by avian influenza A viruses[J] . Clin Microbiol Rev 2001 ,14(1) :129-149.
- [3] Alexander DJ ,Brown I H . Recent zoonoses caused by influenza A viruses[J] . Rev Sci Tech 2000 ,19(1) :197-225.
- [4] Subbarao K ,Katz J . Avian influenza viruses infecting humans [J] . Cell Mol Life Sci 2000 ,57(12) :1770-1784.
- [5] http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_08_19/en/index.html[OL].
- [6] Krug RM . Clues to the Virulence of H5N1 Viruses in Humans [J] . Science 2006 ,311(5767) :1562-1563.
- [7] LI Z ,Jiang Y ,Jiao P et al . The NS1 Gene Contributes to the Virulence of H5N1 Avian Influenza Viruses [J] . J Virol 2006 ,80(22) :11115-11123.
- [8] Abraham NDF ,Stojdl PI ,Duncan N et al . Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double- stranded RNA- dependent protein kinase ,PKR [J] . J Biol Chem ,1999 ,274 :5953.
- [9] Zhironov OP ,Konakova TE ,Wolff T et al . NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis [J] . J Virol 2002 ,76 (4) :1617-1625.
- [10] Chen Z ,Li Y ,Krug RM . Influenza A virus NS1 protein targets poly (A)-binding protein II of the cellular 5'-end processing machinery [J] . Embo J ,1999 ,18(8) :2273-2283.
- [11] Twu KY ,Noah DL ,Rao P et al . The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target[J] . J Virol 2006 ,80(8) :3957-3965.
- [12] Li GQ ,Li GM ,Zhang ZZ . NS1 protein of H5N1 research progress of highly pathogenic avian influenza [J] . 2007 ,27 (6) :493-498.(In Chinese)
(李观强,李国明,张志珍. H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 蛋白研究进展[J]. 医学检验与临床,2011,22(3):56-57.)
- [13] Ding XX ,Hoi-wah Tsoi ,Chen WJ et al . Preparation of monoclonal antibody against non-structural protein-1 of avian influenza virus H5N1 and analysis of its specificity [J] . Current Immunology , 2009 ,27(6) :493-498.(In Chinese)
(丁细霞,HOI-WAH TSOI,陈伟俊,等. 禽流感病毒非结构蛋白 1 单克隆抗体的制备及其特异性分析 [J]. 现代免疫学,2007,27(6):493-498.)
- [14] Yang SH ,Zhao SJ ,Liu J et al . Expression of Plant Monellin in Escherichia coli Induced by Lactose [J] . China Biotechnology , 2008 ,28(3) :53-58.(In Chinese)
(杨书慧,赵胜军,刘军,等. 乳糖诱导甜蛋白 Monellin 在大肠杆菌中的表达[J]. 中国生物工程杂志,2008,28(3):53-58.)
- [15] Fass R ,Van De Walle M ,Shiloach A et al . Use of high density cultures of Escherichia coli for high level production of recombinant Pseudomonas aeruginosa exotoxin A[J] . Appl Microbiol Biotechnol , 1991 ,36(1) :85-91.

收稿日期:2011-10-17 编辑:谢永慧

关于本刊启用“科技期刊学术不端检测系统(AMLC)”的通知

近年来,抄袭、伪造、剽窃、不当署名、一稿多投等学术不端事件时有发生,已引起社会各界的广泛关注。为规范学术行为,维护学术道德,保证稿件质量,净化学术研究环境,本刊编辑部已同意《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社提供的科技期刊学术不端检测系统(AMLC)对本刊已发表文献实行删除学术不端文献的办法,对疑似学术不端文献的论文在数据库中删除。另本刊也将使用 AMLC 系统对来稿加强初审,对检测出严重问题的稿件记录在案,并记入黑名单,望广大作者及读者照知,共同维护良好学术环境。

AMLC 系统经国家新闻出版总署、国家科技部、全国科研诚信管理委员会等单位指导,由《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社与清华同方知网(北京)技术有限公司共同研制开发。到目前为止,国家知识基础设施(National Knowledge Infrastructure, CNKI)通过网络正式出版期刊 9135 种,其中学术期刊 7460 种,期刊全文数据库 2480 万篇,优秀硕士学位论文 63 万篇,博士学位论文 8.7 万篇,重要会议论文 94.7 万篇,重要报纸 462 万篇,重要年鉴 787 万篇,学术引文索引数据 600 多万条,可有效检测来稿学术不端行为。

本刊编辑部