

# 抗 SARS 人源单链抗体 H12 的表达及复性 Expression and Renaturation of a Novel Human Single-chain Fv Antibody Against SARS-CoV

段金柱<sup>1,2</sup>, 齐 财<sup>3</sup>, 韩 伟<sup>2</sup>, 王战会<sup>3</sup>, 靳 刚<sup>2,3</sup>, 阎锡蕴<sup>2\*</sup>

DUAN Jin-Zhu<sup>1,2</sup>, QI Cai<sup>3</sup>, HAN Wei<sup>2</sup>, WANG Zhan-Hui<sup>3</sup>, JIN Gang<sup>2,3</sup> and YAN Xi-Yun<sup>2\*</sup>

1. 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100080

2. 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101

3. 中国科学院力学研究所微重力国家实验室, 北京 100080

1. *State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing 100080, China*

2. *National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101, China*

3. *National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, CAS, Beijing 100080, China*

**摘 要** 从 SARS 免疫抗体库获得的一株抗 SARS-CoV 人源单链抗体 H12, 亟待鉴定。为了快速制备大量具有生物活性的单链抗体 H12, 构建了 pET28a-H12 原核高表达载体, 表达量占菌体总蛋白质 30% 以上。采用稀释复性和分子筛柱复性两种方法对包涵体蛋白进行复性与纯化, 结果显示两种方法都能使得单链抗体复性。与稀释复性法相比, 柱复性效果更好, 其抗原结合活性是稀释复性法的 1.51 倍。柱复性后的单链抗体亲和力测定的解离常数  $K_d$  为 73.5 nmol/mL。为进一步研究单链抗体 H12 的功能奠定了基础。

**关键词** 单链抗体, 原核表达, 包涵体, 复性, SARS-CoV

中图分类号 Q786, R373 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0692-06

**Abstract** A novel human ScFv H12 against SARS-CoV has been selected from a SARS immune library. In order to produce a large amount of ScFv H12, pET28a-H12 expression vector was constructed and ScFv H12 was expressed at yield about 30% of total proteins in *E. coli*. Here two different refolding procedures were used to refold ScFv H12 from inclusion body: gel filtration chromatography and dilution. The results showed that ScFv H12 could be efficiently refolded by both procedures. However, the refolding via gel filtration was 1.5 time more effective than that of dilution. The affinity of ScFv H12 to SARS-CoV virion was detected as  $K_d = 73.5 \text{ nmol/mL}$ .

**Key words** single-chain Fv antibody, refolding, SARS-CoV

随着抗体工程技术的发展, 人源抗体越来越多的用于疾病的治疗。单链抗体 (Single chain Fv, ScFv) 是由抗体重链可变区 ( $V_H$ ) 和轻链可变区 ( $V_L$ )

经连接肽拼接后形成的小分子抗体。这种新的抗体片段在保持原有抗体结合特异性的基础上, 由于分子量小, 易于原核表达、快速大量制备, 对于新抗体

Received: March 29, 2005; Accepted: May 13, 2005.

This work was supported by a grant from the National Basic Research Program of China (973) Specific for SARS Prevention and Therapy (No. 2003CB514114).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-64888583; E-mail: yanxy@sun5.ibp.ac.cn

国家“973”重点基础研究发展规划项目 SARS 治疗专项基金资助 (No. 2003CB514114)。

相关性质的快速鉴定及疾病的治疗具有重要意义。

SARS 是一种由 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)引起的严重传染性疾病<sup>[1-3]</sup>,尚无有效的治疗药物。尽管 SARS 的大规模流行已经得到控制,然而加强 SARS 预防和治疗试剂的研制不仅可以对 SARS 的复燃进行有效的技术和物质储备,而且对 SARS-CoV 致病机理的研究以及预防其他突发事件的发生具有重要意义<sup>[4-6]</sup>。本室利用噬菌体展示技术构建了 SARS 免疫抗体库,成功筛到多株单链抗体,其中一株单链抗体 H12 显示了更高的特异性和亲和力,为了大量获得有活性的单链抗体 H12,我们对其进行了表达及纯化。

由于重组蛋白在大肠杆菌中的高水平表达经常导致无活性的蛋白聚集体——包涵体。包涵体蛋白需经过一个适合的复性过程才能成为具有天然构象的活性蛋白。尽管国内外对于融合蛋白的复性已取得了许多经验<sup>[7-9]</sup>,但是由于蛋白质的个体差异较大,使得每种蛋白质适用的复性方法不同。本实验采用两种复性方法对 SARS 免疫抗体库获得的一株单链抗体 H12 进行了复性研究,我们筛到的 H12 这株单链抗体与传统单链抗体不同,为  $V_L$ -Linker- $V_H$  形式,并且 Linker 区采用了特殊设计的 21 肽(SGGSTITSYNYVYTKLSSSGT),对于这种形式的单链抗体表达、复性国内外少有报道,因此,研究单链抗体 H12 复性,增加个案分析,对于促进单链抗体的复性研究具有重要启示意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒与菌种:** pET28a(+) 表达载体及表达菌株 BL21(DE3) 购自 Novagen 公司;含有单链抗体 H12 基因的载体 pDNA5<sup>[10]</sup> 由本室从 SARS 免疫抗体库筛选得到。

**1.1.2 试剂与仪器:** 限制酶与 T4 连接酶(NEB); DNA 凝胶纯化试剂盒(QIAGEN);抗 His-Tag 抗体、凝胶 Sephacryl S-200HR 和 Chelating Sepharose™ Fast Flow His 亲和柱(Pharmacia);HRP 标记的羊抗鼠(Pierce);Bio-Rad 液相层析系统 Biologic LP 及酶联免疫检测仪 Model 550 Microplate Reader;变角度光谱椭圆仪 Variable Angle Spectroscopic Ellipsometers (J. A. Woollam Co. Inc.)。

### 1.2 方法

**1.2.1 单链抗体的表达载体构建:** 根据 H12 序列,设计了一对带有酶切位点的引物:5'-GGT CGC GGA

TCC GAC ATC CGG GTG ACC CAG TCT CC-3';5'-TGC GGC CGC AAG CTT TGA GGA GAC AGT GAC CGT TG-3'。PCR 扩增获得带有酶切位点 BamH I 和 HindIII 的单链抗体基因片段,酶切插入表达载体 pET28a(+) 相应酶切位点,重组 pET28a(+) 转化表达菌 BL21(DE3),挑取单克隆 PCR 鉴定,并测序,命名为 pET28a-H12。

**1.2.2 单链抗体的表达:** pET28a-H12 单克隆 37℃ 过夜培养,次日 10% 接种新鲜 LB 培养基,37℃ 生长至  $OD_{600}$  约 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L,诱导表达 4h,离心收集菌体,超声破碎菌体,分别收集可溶及不溶部分,SDS-PAGE 分析表达形式。

**1.2.3 包涵体纯化:** 超声破碎后,离心收集包涵体沉淀,分别用含 2.5mol/L NaCl,0.5% Triton X-100 和 2mol/L 尿素的 50mmol/L Tris-HCl, pH8.7, 2mmol/L EDTA 溶液洗涤,最后离心沉淀即为纯化后的包涵体。

**1.2.4 单链抗体的复性:** A. 稀释复性:将洗涤纯化后的包涵体 13000g 离心 30min,称取沉淀重量,用变性液(6mol/L 盐酸胍,25mmol/L Tris-HCl, pH8.7, 10mmol/L EDTA, 10mmol/L DTT)溶解变性,为保证盐酸胍 6mol/L 浓度,加入与沉淀同重量的固体盐酸胍,复性前离心去除不溶物。取 1mL 溶解变性液,逐滴加入 300mL 复性液(3mol/L 尿素,25 mmol/L Tris-HCl, pH8.1, 0.1mmol/L 还原型谷胱甘肽, 1mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 0.4mol/L L-精氨酸)至终浓度 0.1 mg/mL, 4℃ 放置 24h,先对 0.25mmol/L 尿素, 25mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.15mol/L NaCl 溶液缓慢透析,然后以 25mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.15mol/L NaCl 溶液透析,除去 L-精氨酸及残余 DTT,复性产物过 His 亲和柱纯化浓缩。

B. 柱复性:将洗涤纯化后的包涵体 13000g 离心 30min,沉淀用 8mol/L 尿素, 50mmol/L Tris-HCl, pH8.7, 2mmol/L EDTA, 10mmol/L DTT 变性液溶解过夜,离心过 0.45 $\mu$ m 膜。凝胶柱采用 Sephacryl S-200HR 层析柱(10mm × 1000mm),复性平衡液为 50mmol/L Tris-HCl, pH8.3, 0.15mol/L NaCl, 0.4mol/L L-精氨酸, 2mmol/L EDTA, 0.1mol/L 尿素, 0.4mmol/L 还原型谷胱甘肽, 1mmol/L 氧化型谷胱甘肽,流速 0.2mL/min,收集单链抗体目标峰。

**1.2.5 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 检测:** SDS-PAGE 电泳,用 12% 分离胶;Western blot 分析:SDS-PAGE 电泳后的凝胶于电转印装置中 70V 转 3h,取出转有蛋白质的硝酸纤维膜,5% 脱脂奶粉封闭,分

别用鼠抗 His6-Tag 抗体为二抗,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗鼠为三抗,加入 HRP 发光底物, X 光片曝光分析结果。

**1.2.6 ELISA 鉴定活性:**用纯化的灭活 SARS 病毒颗粒<sup>[11]</sup> (包被液 1:50 稀释)包被 96 孔酶联板,4℃ 过夜。封闭液 (1% BSA 溶于 PBS 中) 37℃ 封闭 2h, 把抗体加入到包被的酶联板中, 37℃ 温育 1h。用 PBST 及 PBS 分别洗板 4 次。分别加鼠抗 His6-Tag 抗体为二抗, HRP-羊抗鼠为三抗, OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色, 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 在 490 nm 处检测每孔的 OD 值 (光吸收值)。

**1.2.7 单链抗体的亲和力测定:**单链抗体 H12 亲和力采用变角度光谱偏振仪 Variable Angle Spectroscopic Ellipsometers (J. A. Woollam Co. Inc.) 测定。首先将纯化的灭活 SARS 病毒颗粒共价结合在蛋白芯片上的特定区域, 牛血清封闭后, 蛋白芯片放入含有 PBS 的小槽里, 迅速加入等体积抗体溶液, 抗体特异结合后, 待测区域的表面蛋白灰度随之增加, 通过仪器实时监测待测区域的表面蛋白灰度变化, 绘制出抗体实时结合曲线, 从而计算出亲和力<sup>[12-14]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 构建 SARS 单链抗体高效表达载体

基于 Bradbury 等<sup>[10]</sup> 构建的体内重组载体 pDNA5, 我们构建了 SARS 免疫抗体库, 并从中筛选出 SARS 特异单链抗体 H12。单链抗体 H12 的轻链和重链可变区的连接肽 (linker) 是为了适应 pDNA5 重组载体而特殊设计的 21 肽 (SGGSITTSYNNVYYTKLSSSGT)。这种 ScFv H12 / pDNA5 重组载体能够在大肠杆菌 HB2151 中可溶表达, 但是表达量较低, 不能满足该单链抗体的功能实验。因此, 为了大量获得有活性的单链抗体 H12, 我们将单链抗体 H12 基因克隆到表达载体 pET28a (+) 上, 构建 pET28a-H12 表达质粒 (图 1)。重组载体经 PCR (图 2) 和测序鉴定, 证明 H12 基因序列正确。

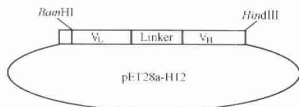


图 1 pET28a-H12 重组表达载体示意图

Fig. 1 Schematic diagram of pET28a-H12 expression vector

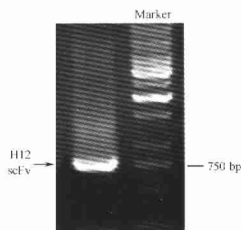


图 2 PCR 鉴定重组质粒中的 ScFv H12 基因  
Fig. 2 PCR identification of ScFv H12 gene in the pET28a-H12 expression vector

### 2.2 单链抗体 H12 的诱导表达

将 pET28a-H12 基因导入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达。经 IPTG 诱导 4h 后, 对菌体超声破碎。用 SDS-PAGE 电泳分析表达产物。结果表明, 在大约 29kD 出现一条明显增粗的蛋白带, 即为单链抗体 H12 表达产物, 表达量占总蛋白的 30% 以上, 且主要表达形式为包涵体 (图 3)。通过进一步降低诱导温度, 包涵体表达形式未获得明显改变。

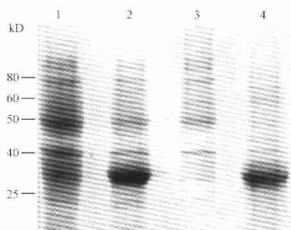


图 3 SDS-PAGE 电泳分析单链抗体 H12 的诱导表达  
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of ScFv H12 in *E. coli*

1: non-IPTG induced cell lysate; 2-4: IPTG-induced cell lysate (2) supernatant (3) and inclusion body (4).

### 2.3 包涵体纯化

根据文献报道 pH 值偏碱的变性液有利于复性<sup>[15]</sup>, 我们采用了 pH 8.7 变性缓冲液对单链抗体 H12 包涵体进行洗涤纯化。SDS-PAGE 分析显示, 洗涤后包涵体纯度可达 90% 以上, 这为复性奠定了基础。

### 2.4 稀释法复性单链抗体 H12

传统复性通常采用两种方式, 稀释复性或缓慢透析复性, 但效果通常不好。为了研究单链抗体

H12 传统复性效果,为将来生产应用提供依据,我们通过对传统复性方法改进,尝试了单链抗体 H12 稀释、透析复性的效果。由于 ScFv 含有链内二硫键,二硫键的正确形成对于单链抗体复性至关重要<sup>[16-17]</sup>,因此,我们应优先考虑二硫键的正确形成。由于随盐酸胍浓度下降到 0.5mol/L 以下,折叠迅速发生并完成,这易造成错误的折叠,而随尿素浓度减少,折叠发生较缓慢,在 3~3.5mol/L 时处于 50% 折叠与非折叠的动态中间过程<sup>[18]</sup>。利用单链抗体随盐酸胍与尿素浓度减少的蛋白质折叠动力学差异,结合稀释复性和缓慢透析复性二者优缺点,我们将包涵体盐酸胍变性后先缓慢稀释到 3mol/L 尿素复性液,使蛋白终浓度为 0.1mg/mL,低温放置,利用 GSH/GSSG 氧化,使链内二硫键易于正确形成。此外,为了更有效地防止中间态聚集,使分子内二硫键正确形成,加入了 0.4mol/L 精氨酸。透析时先利用含 0.25mol/L 尿素缓冲液缓慢透析过渡,然后利用 His 亲和柱结合缓冲液快速透析,并直接用 His 亲和柱浓缩纯化,获得高浓度单链抗体,经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析纯度 >95%,且没有多聚体产生(图 4),以复性后 ScFv 蛋白量与复性前包涵体蛋白量之比计算回收率为 11.1%。

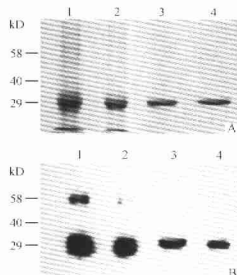


图 4 单链抗体 H12 表达与纯化分析

Fig. 4 Analysis of ScFv H12 before and after refolding

A: SDS-PAGE; B: Western blot; 1: inclusion body; 2: purified inclusion body; 3: H12 refolded by dilution; 4: H12 refolded by gel filtration on a column.

## 2.5 柱复性

柱复性近几年来被尝试用于包涵体蛋白的体外复性<sup>[19]</sup>,可以在高蛋白浓度下实现复性,且操作简便,复性率高,因此,我们也尝试了单链抗体 H12 的柱复性。用复性缓冲液平衡好 Sephacryl S-200HR 凝胶层析柱,将 4mL 变性蛋白(浓度 2mg/mL)上样,流速 0.2mL/min 进行洗脱,洗脱图谱见图 5,峰 1 为复

性蛋白,峰 2 及峰 3 分别为 DTT 及尿素,收集峰 1。先用 50mmol/L Tris·HCl, pH8.3, 0.15mol/L NaCl, 2mmol/L EDTA 缓冲液缓慢透析,然后用 PBS 透析,取透析后的蛋白 SDS-PAGE 及 Western blot 检测,证明复性后蛋白为 29kD 唯一一条带(图 4)。透析后以复性后单链抗体蛋白量与复性前包涵体蛋白量之比计算回收率,最高可达 70.5%。

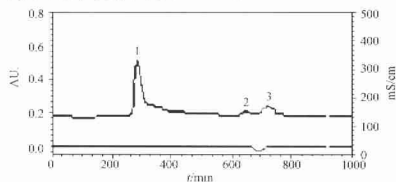


图 5 Sephacryl S-200HR 凝胶层析柱对单链抗体 H12 复性的洗脱图谱

Fig. 5 The refolding of ScFv H12 with Sephacryl S-200HR  
1: ScFv H12; 2: DTT; 3: urea; - UV; -- conductivity.

## 2.6 ELISA 检测复性的单链抗体活性

不同的复性方法,由于复性率不同使得蛋白活性都有差别,为了选择活性最好的用于进一步的功能实验,我们检测了两种复性方法获得的单链抗体 H12 抗原结合活性。两种抗体均以 30 $\mu$ g/mL 作为起始浓度,10 倍系列稀释两个梯度进行检测(如图 6 所示),在高浓度时,由于抗体结合抗原处于饱和状态,二者 ELISA 的 OD 值区别不大;然而随着单链抗体浓度的稀释,两种复性方法获得的单链抗体抗原结合活性表现出差异,柱复性获得的单链抗体 H12 抗原结合活性约为稀释复性的 1.06~1.51 倍,显示二者蛋白浓度虽然相同,但复性率不同,即有活性的单链抗体 H12 的浓度不同,柱复性具有更高的复性

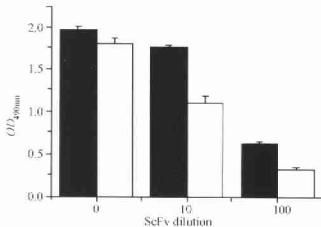


图 6 ELISA 检测单链抗体 H12 的活性

Fig. 6 ELISA analysis the activity of ScFv H12  
■ H12 refolded by gel filtration on a column; □ H12 refolded by dilution.

率,这使得 ELISA 实验中,柱复性获得的单链抗体 H12 需稀释更多倍数,与抗原结合反应才进入对数下降期,从而表现为柱复性获得的单链抗体 H12 随

抗体的稀释,抗原结合活性变化相对小一些。总结两种复性结果如表 1。

表 1 两种复性方法的复性效果

Table 1 The comparison of ScFv H12 with two refolding methods

Refolding method	Protein recovery	Purity	Activity ratio $OD_{\text{refolding by gel filtration}} / OD_{\text{refolding by dilution}}$
Refolded by dilution	11.1%	> 95%	1
Refolded by gel filtration	70.5%	> 95%	1.06 ~ 1.51

Note: Protein recovery is the ratio of the quantity of the refolded ScFv protein per quantity of inclusion body before refolding; activity ratio is the ratio of ELISA OD value of ScFv refolded by two different procedures in the same protein concentration.

### 2.7 单链抗体亲和力测定

利用柱复性获得的单链抗体,我们进一步测定了对灭活 SARS 病毒颗粒的亲和力。椭扁仪是利用椭扁光学成像技术研究生物分子之间相互作用的一种新型的光学检测技术,可以像表面等离子波共振 (SPR) 传感器技术一样实时检测蛋白分子间结合作用,获得抗体对抗原的实时结合曲线,从而计算出分子间亲和力的大小。利用该技术测定单链抗体 H12 具有高亲和力,  $K_d$  为 73.5nmol/L (表 2)。

表 2 柱复性单链抗体 H12 动力学参数及结合亲和力

Table 2 Kinetic rates and binding affinity of ScFv H12

$K_{on} / [(\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	$K_{off} / \text{s}^{-1}$	$K_d / (\text{L/mol})$	$K_d / (\text{mol/L})$
$7.5 \times 10^3$	$6.6 \times 10^{-4}$	$1.36 \times 10^7$	$7.35 \times 10^{-8}$

## 3 讨论

噬菌体抗体库技术的快速发展,使得利用基因工程获得的治疗性人源抗体越来越多。面对 SARS 对人类的威胁,快速获得治疗性抗体在临床上非常迫切。本文研究的单链抗体 H12 是一株对 SARS 病毒特异的单链抗体,在临床上具有潜在的应用价值。

单链抗体的原核表达多以包涵体形式表达,它的复性研究虽已有报道,然而融合蛋白复性的复杂性使得我们必须对每一种蛋白特殊对待。H12 在单链抗体的形式上与传统的单链抗体有极大的区别,除了  $V_L$ -Linker- $V_H$  取向  $V_L$  在前  $V_H$  在后,与通常单链抗体不同,特殊设计的 Linker 区必然影响到单链抗体的折叠特性,因此,研究单链抗体 H12 复性特点十分必要,不仅有利于单链抗体 H12 的大量生产,而且对于其它类似单链抗体的复性也有启示作用。

稀释复性与透析复性是两种最简便的复性方法,但通常难以成功,复性率低,为 5% ~ 20%<sup>[20]</sup>。通过对稀释复性有效的修饰,虽然获得了 11.1% 的蛋白回收率,但是活性的回收率却不及柱复性的单

链抗体 H12,更重要的是,柱复性可以在高蛋白浓度下实现复性与纯化一步完成,且操作简便,复性率高,如本文试验所示,正是由于柱复性较高的复性率,使得柱复性纯化的单链抗体 H12 与抗原的结合活性相应的高于稀释复性,因此,对于单链抗体 H12 柱复性依然是优先于稀释透析复性的选择,柱复性获得单链抗体 H12 不仅具有对灭活 SARS 病毒颗粒的特异性,而且具有 73.5nmol/L 高亲和力(单链抗体通常的  $K_d$  值 1000 ~ 1nmol/L,  $K_d$  值越低,亲和力越高),这对于抗病毒研究与应用将具有重要意义。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Peiris JS, Lai ST, Poon LL *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, **361**: 1319 - 1325
- [2] Drosten C, Gunther S, Preiser W *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 2003, **348**: 1967 - 1976
- [3] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 2003, **348**: 1953 - 1966
- [4] Holmes KV. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, **111**: 1605 - 1609
- [5] Pearson H, Clarke T, Abbott A, Knight J & Cyranoski D. SARS: what have we learned? *Nature*, 2003, **424**: 121 - 126
- [6] Yan XY (阎锡蕴), Zhang JB (张锦彬). Severe acute respiratory syndrome. *Acta Biophysica Sinica*, 2003, **19**(2): 120 - 124
- [7] Fang M (方敏), Huang HL (黄华樑). The development of inclusion body refolding *in vitro*. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2001, **17**(6): 608 - 612
- [8] Luo YM (罗元明), Mou Y (牟颖), Wei JY (魏景艳) *et al.* Studies on the optimal expression condition, purification and its characterization of ScFv-2F3. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2002, **18**(1): 74 - 78
- [9] Feng XL (冯小黎). Refolding of recombinant inclusion body proteins. *Progress in Biochemistry and Biophysics (生物化学与生物物理进展)*, 2001, **28**(4): 482 - 485

- [10] Sblattero D, Bradbury A. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nature Biotechnology*, 2000, **18**: 75 - 80
- [11] Lin Y, Yan X, Cao W *et al.* Probing the structure of the SARS coronavirus using scanning electron microscopy. *Antiviral Therapy*, 2004, **9**: 287 - 289
- [12] Elwing H. Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research. *Biomaterial*, 1998, **19**: 397 - 406
- [13] Wang ZH, Jin G. A label-free multisensing immunosensor based on imaging ellipsometry. *Analytical Chemistry*, 2003, **75**: 6119 - 6123
- [14] Malmberg AC, Michaelsson A, Ohlin M *et al.* Real time analysis of antibody-antigen reaction kinetics. *Scand. Journal of Immunology*, 1992, **35**: 643 - 650
- [15] Zhu H(朱慧), Liu W(刘伟), Shi W(史蔚) *et al.* Research on renaturation of recombinant human pro-urokinase expressed from *E. coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**(2): 150 - 154
- [16] Middelberg AP. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* 2002, **20**(10): 437 - 443
- [17] Wang X(王雪), Song C(宋长征). Impact factor and condition of protein refolding. *Foreign Medicine Molecular Biology Fascicule* (国外医学分子生物学分册), 2003, **25**(6): 358 - 360
- [18] Carl AK, Borrebaeck. *Antibody Engineering*. New York: Oxford University Press. 1995
- [19] Batas B, Chaudhuri JB. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **50**(1): 16 - 23
- [20] Marston FAO. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1986, **240**(1): 1 - 12

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《生物工程学报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,国内外公开发行的学术期刊。本刊已被美国(CA), (BA), (MEDLINE), (俄罗斯文摘)及中国生物学文摘、中国科学引文数据库、万方数据库、中国科技期刊光盘版等检索系统收录,是中国自然科学核心期刊。主要报道生物工程研究的新发展、新成果、新技术。刊登的内容包括:基因工程、细胞工程、酶工程、生化工程、组织工程、生物信息、生物芯片等。栏目设有:综述、研究报告、研究简报、技术与方法等。本刊中英文兼收,目前发表周期平均6个月。

### 2 投稿要求

#### 2.1 投稿方式

请将电子版以 word 文档(.doc)的附件形式发到我刊信箱(cjb@sun.im.ac.cn),图表请与正文同一邮件发来,切勿分发2次。邮件主题请注明第一作者姓名及投稿字样(如:张明投稿)。另将打印稿一份寄到编辑部,如有彩图,请附原照片。

#### 2.2 投稿手续

2.2.1 证明信:是否涉及保密,署名是否无误,务请出示第一作者所在单位的证明信。国外作者需提供所有作者签名。本刊收到 E-mail 投稿后,会立即回复发出收稿通知,告知稿号及后续事宜,并寄上空白介绍信模板,作者打印盖章后寄回即可。

2.2.2 审稿费:投稿时请随寄 100 元审稿费(汇款单附言栏上请注明作者姓名)。收到后,编辑部将尽快寄上发票。

2.2.3 注明联系地址:投稿时请注明通讯联系人、详细地址、邮编及 E-mail 地址,以便编辑部及时告知稿件编号供您查询稿件审理情况。

### 3 写作要求

来稿要论点明确,数据可靠,简明通顺,突出重点。

#### 3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述最好在 3 页以内,简报不超过

4 页,研究报告 5~7 页(以上均包括图表)。英文稿请附中文题目及中文摘要。

#### 3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。黑白及彩色图片均须提供原版照片及电子版图片。所有小图的宽度应小于 8cm(占半栏),大图的宽度应小于 17cm(通栏)。图上、表内文字及图表释注一律用英文,图表题应中英对照。

#### 3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后排序,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(列出 3 人)、文题、刊名、年卷期及页码,全部文献以英文列出。其中中文文献的刊名、人名用括弧列出对照,请严格按下列格式整理文献。关于论文、专著及专利等的引用格式举例如下:

- [1] Wen Y(文莹), Song Y(宋渊), Li JL(李季伦) *et al.* The effects of *Vitreoscilla* hemoglobin expression on growth and antibiotic production in *Streptomyces cinnamonensis*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, **17**(1): 30 - 35
- [2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [3] Fleming GL, Martin RT. Ger Par. US patent, C08g, 139291. 1972-02-07

脚注(正文首页下方):

Received: May 24, 2004; Accepted: June 18, 2004.

This work was supported by Grant from...

\* Corresponding author. Tel: 86- ; E-mail:

基金项目(中文书写):

(下转 712 页)