

脲酶 B 亚单位疫苗免疫对奶牛血清蛋白质组分的影响

袁廷杰^{1,2}, 王加启², 杨永新², 卜登攀², 章玉涛², 赵圣国², 周凌云², 李发弟¹

(1. 甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070;

2. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:为探讨脲酶 B(Ure B)亚单位疫苗免疫后奶牛血清蛋白质组分的表达变化。选用 8 头健康的泌乳荷斯坦奶牛,分为免疫处理组和空白对照组,分别于臀部两侧肌肉注射 Ure B 亚单位疫苗(含抗原蛋白 0.2 mg)和生理盐水,每隔 2 周进行加强免疫,并于免疫后第 56 天采集奶牛血样,用间接 ELISA 法测定血清中特异性 IgG、IgM 和 IgA 效价,用二维凝胶电泳(2-DE)结合 MALDI-TOF-TOF 质谱技术研究血清蛋白质组表达变化。免疫处理组奶牛血清中特异性 IgG 效价显著高于对照组($P < 0.05$),但 Ure B 免疫对奶牛血清中特异性 IgM 和 IgA 效价无显著影响($P > 0.05$)。血清蛋白质组分析发现 6 个差异表达蛋白点,其中 3 个蛋白点得到有效鉴定。结合珠蛋白前体和其他 3 个蛋白点在免疫 Ure B 亚单位疫苗奶牛血清中表达量增加,而 Kakapo 蛋白的表达量降低。Ure B 亚单位疫苗免疫引起奶牛血清中结合珠蛋白和 Kakapo 等蛋白表达发生变化,为进一步研究脲酶 B 亚单位疫苗免疫对奶牛机体的影响提供了依据。

关键词:脲酶 B 亚单位疫苗; 奶牛; 血清; 蛋白质组

中图分类号:S823 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)05-0198-04

Effect of Ure B Subunit Vaccine Immunization on Serum Proteins in Dairy Cows

YUAN Ting-jie^{1,2}, WANG Jia-qi², YANG Yong-xin², BU Deng-pan²,
ZHANG Yu-tao², ZHAO Sheng-guo², ZHOU Ling-yun², LI Fa-di¹

(1. Faculty of Animal Science & Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: This study was to investigate the changes of serum proteins in dairy cows immunized with Ure B subunit vaccine. Eight healthy cows were divided into 2 groups and immunized with 0.2 mg antigen protein or saline by intramuscular injection on both sides of the hip, once every two weeks, and total 4 times for immunization. Serum samples were collected on 56 d after immunization with Ure B subunit vaccine. Specific antibody in blood samples were determined by ELISA methods. Serum proteomic analysis were performed using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) coupled with MALDI-TOF-TOF mass spectrometer. Specific IgG were significantly higher after the cows immunized with Ure B subunit vaccine than control groups ($P < 0.05$), whereas IgM and IgA was not significant ($P > 0.05$). Proteomic analysis revealed 6 protein spots were differentially expressed, and 3 spots were successfully identified. Haptoglobin precursor and 3 unknown spots were up-regulated in cows immunized with Ure B subunit vaccine, while Kakapo was down-regulated. The current study showed that cows injection with Ure B subunit vaccine can result in the change of haptoglobin, Kakapo and other proteins, which provide the basis for further research of the physiology effects of Ure B subunit vaccine on dairy cows.

Key words: Ure B subunit vaccine; Dairy cow; Serum; Proteome

收稿日期:2012-07-25

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(6092017)

作者简介:袁廷杰(1986-),男,河北曲周人,硕士研究生,主要从事反刍动物营养研究。

通讯作者:王加启(1967-),男,安徽宿州人,研究员,博士生导师,主要从事反刍动物营养与牛奶质量改良研究。

幽门螺旋杆菌 (*H. pylori*) 感染是多种胃肠道疾病发生的主要诱因^[1-3], 然而由于其耐药性, 利用抗生素治疗幽门螺旋杆菌感染的效果并不理想^[4]。牛奶中免疫球蛋白在调理作用、补体结合、阻止致病菌粘附到内皮细胞、抑制细菌代谢、凝集细菌以及中和毒素和病毒等方面具有重要作用^[5]。通过对奶牛进行免疫, 产生含有抑制幽门螺旋杆菌定植和预防感染的特异性多克隆抗体的免疫乳, 为防治这一疾病提供了一种新的途径。采用体外和体内方法对其抑制幽门螺旋杆菌功效的研究表明, 除 den Hoed 等^[6]的研究结果不显著外, 含有幽门螺旋杆菌特异抗体的免疫乳及其制品均具有良好的抑菌效果^[7-10]。

脲酶 B (Ure B) 在幽门螺旋杆菌增殖和定植中具有重要作用, 是较为理想的抗原蛋白^[1], 用其免疫小鼠引起明显的免疫应答^[11-12]。最近已构建了 *H. pylori* Ure B 表达载体, 诱导表达和纯化后制备成 Ure B 亚单位疫苗, 并通过 Ure B 亚单位疫苗免疫奶牛可显著提高乳清中特异性 IgG 和 IgM 效价, 为通过奶牛免疫制备具有抗 *H. pylori* Ure B 蛋白的功能性牛奶提供基础^[13]。但在 Ure B 亚单位疫苗对奶牛健康方面尚缺乏系统的深入研究, 其中也仅测定了乳成分和部分血清生化指标的变化, 尚未有关于 Ure B 亚单位疫苗免疫对奶牛血清蛋白组分表达影响的相关报道。因此, 本试验利用蛋白质组学技术, 以揭示免疫接种 Ure B 亚单位疫苗后奶牛血清蛋白组分及含量变化, 从而为进一步研究脲酶 B 亚单位疫苗免疫对奶牛机体的影响奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司; 17 cm pH 值 4~7 的 IPG 胶条、CHAPS 购自 Bio-Rad 公司; IPG Buffer pH 值 4~7 购自 GE Healthcare 公司; ELISA 间接测定试剂盒购自 Bethyl 公司。

乳化器 (Homogenizer workcenter 美国); 96 孔酶标板 (Coster 美国); 酶标仪 (Infinite F200, TECAN, 瑞士); PROTEAN IEF Cell、PROTEAN® II Xi Cell 和 Mini-PROTEAN 3 Cell 小型垂直电泳 (Bio-Rad, 美国); MALDI-TOF-TOF 质谱仪 (Bruker, 德国)。

1.2 UreB 亚单位疫苗

利用幽门螺旋杆菌 *Ure B* 基因克隆菌重组表达 Ure B 蛋白, 将 Ure B 蛋白溶解液分别与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂 (Sigma, 美国) 等体积混合, 乳化器进行乳化, 制成弗氏完全佐剂疫苗和弗氏不完

全佐剂疫苗。

1.3 奶牛免疫及样品采集

8 头健康的泌乳荷斯坦奶牛 (泌乳日龄: (152 ± 45) d; 产奶量: (23.2 ± 5.4) kg/d) 随机分为 2 组, 每组 4 头, 一组为对照组, 一组为试验组。所有奶牛饲喂全混合日粮, 自由采食和饮水。在 7 d 的预试期后, 试验组奶牛胯部两侧肌肉注射弗氏完全佐剂疫苗进行免疫, 注射剂量为 1 mL, Ure B 蛋白浓度为 0.2 mg/mL, 对照组奶牛注射等剂量的生理盐水。试验组奶牛每隔 14 d 利用弗氏不完全佐剂疫苗进行加强免疫, 共免疫 4 次。于免疫后第 56 天以真空采血管经尾动脉采集血样。血样经室温放置 4 h, 凝血后 $3\ 000 \times g$ 离心 15 min 分离血清。考马斯亮蓝法测定血清蛋白浓度, 分装后于 -75°C 保存备用。

1.4 血清中抗体效价测定

采用间接 ELISA 检测血清中特异性 IgG、IgA 和 IgM 效价。将纯化后的 Ure B 蛋白利用 PBST 缓冲液 ($14.03\text{ mmol/L KHPO}_4$, 1.3 mol/L NaCl , $43.00\text{ mmol/L Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 26.83 mmol/L KCl , 0.05% 吐温 20, pH 值 7.4) 稀释, 包被酶标板捕获待检样品中的特异性抗体, 以 1% 鸡血清封闭液封闭进行封闭 ELISA 板, 以辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗兔 IgG 作为二抗, TMB 显色, 在酶标仪 (Infinite F200, TECAN, 瑞士) 450 nm 波长测定 OD 值。利用胎牛血清作为阴性对照, PBS 为空白对照。以 (样品 OD 值 - 空白 OD 值) / (阴性对照 OD 值 - 空白 OD 值) ≥ 2 时最小稀释倍数为血清中该特异性抗体效价 (U), 然后依据 $\lg(U+1)$ 转化后进行统计分析^[14]。

1.5 二维凝胶电泳 (2-DE)

第一向等电聚焦电泳采用固相 pH 梯度预制胶条 - 除盐体系, 选用 pH 值 4~7、长度为 17 cm 的 IPG 胶条; 第二向 SDS-PAGE 电泳采用 12% 的凝胶进行。血清蛋白上样量为 600 μg 。电泳后的凝胶经考马斯亮蓝染色后, GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, 美国) 扫描图像。用 PDQuest 8.0.1 软件进行背景消减、斑点检测和自动匹配等处理。

1.6 质谱鉴定

手工切离凝胶上差异表达的蛋白斑点, 放入 EP 管中用 MillQ 水洗涤; 使用 50 mmol/L NH_4HCO_3 / 乙腈 (1:1) 溶液进行脱色, 乙腈脱水后加入胰蛋白酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化过夜, 然后进行 MALDI-TOF-TOF 质谱 (Ultraflex TOF/TOF, Bruker, Germany) 分析。分析结果利用 Mascot 软件搜索 NCBI 非冗余蛋白质数据库。

1.7 Western Blotting 分析

将稀释后的血清加入 $5 \times$ 上样缓冲液 (1.0

mmol/L Tris (pH 值 6.8), 50% 甘油, 10% SDS), 95℃ 水浴 5 min, 然后选用 12% 的凝胶进行 SDS-PAGE 电泳。将蛋白转移到 PVDF 膜上, 3% 马血清封闭 1.5 h, 分别用兔抗牛结合珠蛋白 (一抗, 1:1 000) 和 HRP-羊抗兔 IgG (二抗, 1:10 000) 孵育 1.5 h, DAB 显色试剂盒进行显色。GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad 美国) 扫描图像。

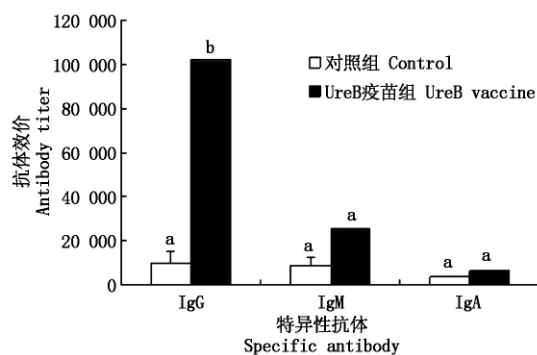
1.8 统计分析

采用 SAS 8.2 软件进行分析分析和显著性检验 $P < 0.05$ 为差异显著。Quantity One 4.6.2 软件对凝胶图谱中蛋白染色密度用进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 血清抗体效价检测

生理盐水和 Ure B 亚单位疫苗处理对奶牛血清中的特异性 IgG、IgM 和 IgA 效价的影响见图 1。由图 1 可以看出, 免疫 Ure B 亚单位疫苗后奶牛血清中 IgG 效价显著高于未免疫奶牛 ($P < 0.05$), 而 IgM 和 IgA 效价呈升高趋势, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。



不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 3 同。

Different letter indicate significantly different at 5%. The same as Fig. 3.

图 1 血清中特异性抗体 IgG、IgM 和 IgA 效价

Fig. 1 Specific antibody IgG, IgM and IgA titer in serum

2.2 血清蛋白质组分析

选用 17 cm、pH 值 4~7 线性 IPG 胶条, 12% SDS-PAGE 对试验组和对照组奶牛血清进行 2-DE 电泳

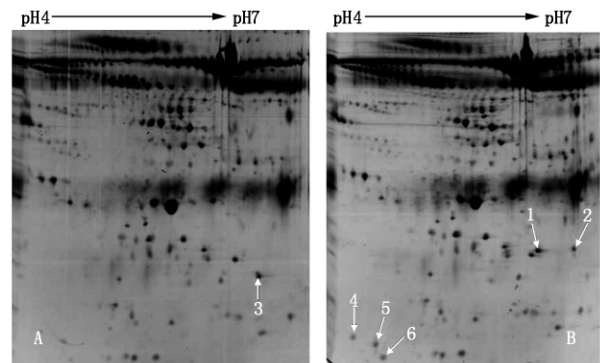
表 1 差异蛋白点的 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定结果

Tab. 1 Identification of differential expression protein spots by MALDI-TOF-TOF

蛋白点 Spot	蛋白名称 Protein name	登录号 Accession No.	分子质量/Da Molecular weight	等电点 Isoelectric point	覆盖率/% Coverage
1	结合珠蛋白前体 Haptoglobin	gi: 94966763	44 859	7.83	15.21
2	结合珠蛋白前体 Haptoglobin	gi: 94966763	44 859	7.83	15.21
3	Kakapo	gi: 157132356	820 415	5.39	8.00

经 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定结果表明, 3 个蛋白点得到成功鉴定 (表 1)。蛋白点 1 和 2 同为结合珠蛋白前体, 蛋白点 3 为 Kakapo。结合珠蛋白主要由肝脏合成, 其主要功能是与游离血红蛋白结合成稳定的复合物。Kakapo 蛋白是一种细胞骨架蛋白,

分离经考马斯亮蓝染色后的血清蛋白凝胶图谱见图 2。利用 PD Quest 双向电泳凝胶图像分析软件比对分析对照组和 Ure B 免疫奶牛的血清凝胶图谱发现 6 个蛋白点表达丰度发生变化 (图 3), 其中 5 个蛋白点 (蛋白点 1、2、4、5、6) 在奶牛免疫 Ure B 亚单位疫苗后表达量增加, 而 1 个蛋白点 (蛋白点 3) 表达量降低。



A. 对照组奶牛血清蛋白凝胶图谱; B. Ure B 亚单位疫苗免疫奶牛血清蛋白凝胶图谱。蛋白点 1~6 为 Ure B 亚单位疫苗免疫奶牛血清中差异表达的蛋白点。

A. Show 2-DE maps of serum protein from control dairy cows; B. Show 2-DE maps of serum protein from dairy cows inoculating Ure B subunit vaccine. Spots 1 to 6 show differentially expressed spots in serum from dairy cows inoculating vaccine.

图 2 对照组和免疫 Ure B 疫苗奶牛血清蛋白 2-DE 电泳图谱

Fig. 2 2-DE maps of serum protein from control and inoculated Ure B vaccine dairy cows

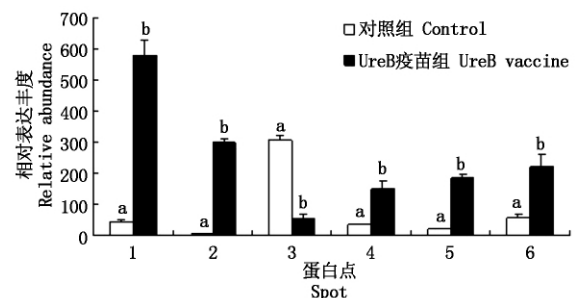


图 3 差异蛋白点的表达丰度变化

Fig. 3 Changes of expressive abundance of differential protein spots

含有肌动蛋白和微管 2 个结合域。

采用 Western blotting 对血清中结合珠蛋白表达的验证结果表明, Ure B 亚单位疫苗免疫奶牛血清中结合珠蛋白表达量显著高于未免疫奶牛, 与 2-DE 结果相符 (图 4)。

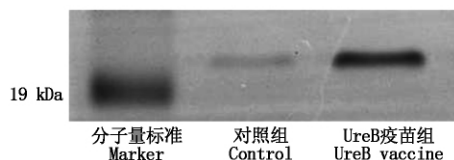


图 4 对照组和 Ure B 疫苗免疫奶牛血清结合珠蛋白的 Western Blotting 验证

Fig. 4 Western Blotting analysis of serum haptoglobin from control cows and dairy cows immunized with Ure B vaccine

3 讨论

3.1 Ure B 免疫对血清特异性抗体的影响

乳中 IgG 主要来源于血液, IgM 和 IgA 部分来自血液。维持血清中高水平的特异性抗体效价将有助于乳中特异性抗体的产生^[15]。免疫球蛋白分子是由 4 条多肽链组成的对称性结构, 由于分离成多个蛋白点, 其浓度变化在二维凝胶图谱上无法精确体现, 因此, 本试验采用间接 ELISA 法检测血清中免疫球蛋白的变化。血清中 IgG 效价在奶牛免疫 Ure B 亚单位疫苗后显著升高, 从 1:9 600 增加至 1:102 400。IgG 由淋巴腺中的 B 淋巴细胞在受到免疫刺激后增殖分化为浆细胞产生^[16], 进行系统免疫 (如肌肉接种) 有利于 IgG 的产生^[17]。本试验结果与幽门螺杆菌免疫奶羊引起血清中 IgG 浓度增加结论相一致^[18]。奶牛胯部两侧肌肉注射 Ure B 亚单位疫苗后血清中 IgM 和 IgA 效价呈升高趋势, 但与对照组差异不显著。IgM 主要在免疫应答初期产生^[19], 免疫 Ure B 疫苗后血清中升高的 IgM 可通过提高机体吞噬能力或刺激补体途径参与调节机体免疫反应。IgA 主要由粘膜免疫相关细胞产生, 经乳腺多聚免疫球蛋白受体 (p-IgR) 介导分泌进入乳汁^[20], 而肌肉注射后 IgA 效价升高可能是淋巴细胞 B 在免疫刺激活化后发生归巢导致其他粘膜部位相关免疫细胞分泌产生^[21]。本研究结果表明, 胯部两侧肌肉接种 Ure B 疫苗激活了机体免疫系统, 引起机体分泌特异性抗体进入血清。

3.2 Ure B 免疫对血清蛋白质组分的影响

本试验采用蛋白质组学技术分析发现免疫接种 UreB 亚单位疫苗后奶牛血清中结合珠蛋白和 3 个未知蛋白点表达量升高, Kakapo 蛋白表达量降低。结合珠蛋白是由肝脏合成的一种糖蛋白, 主要功能是结合血红蛋白, 从而防止肾脏损伤和铁的损失, 并且可以阻止致病菌对铁的利用^[22]。采用蛋白质组学技术对患有乳腺炎、分支杆菌感染和围产期奶牛等的研究表明, 结合珠蛋白表达量上调^[23-25]。此外, 当奶牛发生腹膜炎、子宫内膜炎、脂肪肝、饥饿和运输应激时这一蛋白表达也增加, 是一种急性期蛋

白^[26]。本研究结果表明, 接种 Ure B 亚单位疫苗导致奶牛血清结合珠蛋白表达量增加, 其表达上调可能是奶牛机体对接种疫苗的一种应激反应。可溶性纯化蛋白质疫苗的免疫原性较弱, 在疫苗中加入弗氏佐剂虽然可有效刺激抗体的产生, 但是它可能存在副作用^[27]。此外, 在免疫乳制备过程中, 抗原注射剂量大、免疫次数多, 对乳牛造成的应激反应也大^[28]。

Kakapo 是一种细胞骨架蛋白, 含有一个保守的微管结合域, 在整合微管网络和肌动蛋白细胞骨架中具有重要作用^[29]。对果蝇的研究表明, Kakapo 参与了轴突延伸、树突形成、肌肉接头轴突末梢分枝、腱细胞发育, 以及翼上皮细胞粘附等一系列生物过程^[30]。基于 Kakapo 突变体的形态学研究表明, Kakapo 被建议为是一种微管肌动蛋白组织者^[31]。Gregory 等报道, Kakapo 蛋白形成了整合蛋白、肌动蛋白和微管间的必要连接, 通过细胞骨架的作用组织膜结合受体进入功能信号复合物而潜在影响信号转导^[32]。因此, 血清 Kakapo 表达量降低表明免疫接种 Ure B 亚单位疫苗可能对奶牛机体信号转导产生一定影响。

4 结论

本试验采用蛋白质组学方法和技术分析了 Ure B 亚单位疫苗免疫后奶牛血清蛋白质的表达变化, 发现 Ure B 亚单位疫苗免疫引起奶牛血清中结合珠蛋白和 3 个未知蛋白点的表达量增加, 而 Kakapo 蛋白表达量降低。

参考文献:

- [1] 汤艳超, 胡 巍. 幽门螺杆菌相关保护性抗原 [J]. 微生物学免疫学进展, 2010, 38(2): 62-65.
- [2] Everhart J E. Recent developments in epidemiology of *Helicobacter pylori* [J]. *Gastroenterol Clin North Am* 2000, 29: 559-578.
- [3] Costa F, Delios M M. Management of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010, 8(8): 887-892.
- [4] Selgrad M, Malfertheiner P. Treatment of *Helicobacter pylori* [J]. *Curr Opin Gastroenterol* 2011, 27(6): 565-570.
- [5] Liu G L, Wang J Q, Bu D P *et al.* Specific immune milk production of cows implanted with antigen-release devices [J]. *J Dairy Sci* 2009, 92(1): 100-108.
- [6] den Hoed C M, de Vries A C, Mensink P B *et al.* Bovine antibody-based oral immunotherapy for reduction of intra-gastric *Helicobacter pylori* colonization: a randomized clinical trial [J]. *Can J Gastroenterol*, 2011, 25(4):

- 207–213.
- [7] Gorrell R J ,Robins-Browne R M. Antibody-mediated protection against infection with *Helicobacter pylori* in a suckling mouse model of passive immunity [J]. *Infect Immun* 2009 ,77(11) : 5116–5129.
- [8] Casswall T H ,Nilsson H O ,Björck L ,*et al.* Bovine anti-*Helicobacter pylori* antibodies for oral immunotherapy [J]. *Scand J Gastroenterol* 2002 37(12) : 1380–1385.
- [9] Early E M ,Hardy H ,Forde T ,*et al.* Bactericidal effect of a whey protein concentrate with anti-*Helicobacter pylori* activity [J]. *J Appl Microbiol* 2001 90(5) : 741–748.
- [10] Horie K ,Horie N ,Abdou A M ,*et al.* Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans [J]. *J Dairy Sci* 2004 87(12) : 4073–4079.
- [11] Zhou W Y ,Shi Y ,Wu C ,*et al.* Therapeutic efficacy of a multiepitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB /c mice model [J]. *Vaccine* 2009 ,27(36) : 5013–5019.
- [12] Shi Y ,Wu C ,Zhou W Y ,*et al.* Identification of H-2d restricted Th epitopes in urease B subunit of *Helicobacter pylori* [J]. *Vaccine* 2007 25 (14) : 2583–2590.
- [13] 章玉涛,王加启,赵圣国,等. 抗幽门螺杆菌 Ure B 蛋白免疫乳的制备 [J]. 甘肃农业大学学报, 2011 ,4: 1–6.
- [14] SHU Q ,BIR S H ,GILL H S ,*et al.* Antibody response in sheep following immunization with streptococcus bovis in different adjuvants [J]. *Vet Res Commun* 2001 1: 43–54.
- [15] 徐 茜,代红燕,莎丽塔娜提·贺纳亚提,等. 免疫接种次数对牛血清及乳汁中特异性抗体效价的影响 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2008 28(4) : 553–555.
- [16] 董晓丽,王加启,赵国琦,等. 牛奶中免疫活性蛋白的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2008 35(2) : 67–71.
- [17] 张和平,殷文政,王和平,等. 免疫乳及其制品研究 [J]. 中国乳品工业, 1997 25(5) : 13–24.
- [18] 张天哲,袁聚祥,徐应军,等. 幽门螺杆菌免疫奶羊的应答性实验研究 [J]. 免疫学杂志, 2004 ,20(6) : 443–449.
- [19] BOES M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses [J]. *Mol Immunol* ,2000 ,37(18) : 1141–1149.
- [20] 赵圣国,王加启,张春刚,等. 小鼠免疫刺激后乳腺 pIgR mRNA 转录及乳特异性 I gA 含量的变化 [J]. 华北农学报, 2010 25(6) : 19–24.
- [21] Paul ,W. E. 著,吴玉章等译. 免疫基础学 [M]. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2003: 1019–1021.
- [22] Dilda F ,Pisani L F ,Ranhman M M ,*et al.* Distribution of acute phase proteins in the bovine forestomachs and abomasum [J]. *Vet J* 2011 5: 1–5.
- [23] 杨永新,赵兴绪,张 勇,等. 临床型乳房炎与正常奶牛血浆的差异蛋白质组研究 [J]. 中国农业科学, 2008 41(7) : 2162–2167.
- [24] Seth M ,Lamont E A ,Janagama H K ,*et al.* Biomarker discovery in subclinical mycobacterial infections of cattle [J]. *PLoS One* 2009; 4(5) : e5478.
- [25] 杨永新,王加启,卜登攀,等. 基于 2-DE 结合质谱研究围产期奶牛血浆蛋白表达的变化 [J]. 畜牧兽医学报, 2010 41(2) : 188–192.
- [26] Eckersall P D ,Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine [J]. *Vet J* 2010 ,185(1) : 23–27.
- [27] Edelman R. The development and use of vaccine adjuvants [J]. *Mol Biotechnol* 2002 21(2) : 129–148.
- [28] 张和平. 免疫乳开发与研究进展 [J]. 乳业科学与技术, 2001 4: 10–13.
- [29] Gao F B ,Brenman J E ,Jan L Y ,*et al.* Genes regulating dendritic outgrowth ,branching and routing in *Drosophila* [J]. *Genes Dev* ,1999 ,13(19) : 2549–2561.
- [30] Subramanian A ,Prokop A ,Yamamoto M ,*et al.* Shortstop recruits EB1/APC1 and promotes microtubule assembly at the muscle-tendon junction [J]. *Curr Biol* ,2003 ,13(13) : 1086–1095.
- [31] Leung C L ,Sun D ,Zheng M ,*et al.* Microtubule actin cross-linking factor (MACF) : a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons [J]. *J Cell Biol* ,1999 ,147(6) : 1275–1286.
- [32] Gregory S L ,Brown N H. kakapo a gene required for adhesion between and within cell layers in *Drosophila* encodes a large cytoskeletal linker protein related to plectin and dystrophin [J]. *J Cell Biol* ,1998 ,143(5) : 1271–1282.