

稳定表达犬转铁蛋白受体 CHO 细胞系的建立和鉴定*

张薇¹, 闫琰¹, 白鲁根¹, 朱燕妮², 黄菱¹, 孙玉宁^{1△}

1. 宁夏医科大学 生物化学与分子生物学系, 宁夏医科大学生育力保持教育部重点实验室(银川 750004);

2. 宁夏医科大学总医院 呼吸与危重医学科(银川 750004)

【摘要】 目的 构建犬转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)的真核表达载体, 转染中国仓鼠卵巢 CHO 细胞, 建立稳定表达犬 TfR 的 CHO-TfR 细胞系。**方法** 从犬腺细胞系(WRD)提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 采用 PCR 方法扩增 TfR 基因, 将其克隆至真核表达载体 pCDNA3, 酶切和测序鉴定; 利用脂质体法转染 CHO 细胞, 通过 RT-PCR、Western blot 及免疫荧光法检测 TfR 的表达。**结果** 构建的 pCDNA3-TfR 重组质粒经过酶切和测序鉴定, TfR 基因序列成功插入到 pCDNA3 载体, 且无突变。转染 CHO 细胞后, RT-PCR、Western blot 及免疫荧光法检测 TfR 表达阳性, 成功建立了稳定表达犬 TfR 的 CHO-TfR 细胞系。**结论** 成功构建了真核表达载体 pCDNA3-TfR, 并获得了稳定表达 TfR 的 CHO-TfR 细胞系。

【关键词】 转铁蛋白受体 CHO 细胞 真核表达载体 稳定表达

The Establishment and Identification of Stable CHO Cell Line with Canine Transferrin Receptor Expression ZHANG Wei¹, YAN Yan¹, BAI Lu-gen¹, ZHU Yan-ni², HUANG Lin¹, SUN Yu-ning^{1△}. 1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Department of Respiratory Medicine and Critical Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

△ Corresponding author, E-mail: sunraining2008@hotmail.com

【Abstract】 Objective To construct eukaryotic expressing recombinant vector of canine transferrin receptor gene (TfR), then to transfect Chinese hamster ovary (CHO) cells with the vector for establishment of stable expression of TfR in CHO cell line. **Methods** The full-length TfR fragment was amplified by RT-PCR from the canine cells (walter reed dog cell, WRD) and then inserted into eukaryotic expression vector pCDNA3. After identification with enzyme digestion and sequencing, the recombinant vector was transfected into CHO cells by TransLipid Transfection Reagent. The stable transfected CHO cell line was then established by screening cultures with G418, and the expression of TfR was identified by RT-PCR, Western blot and immunofluorescence, respectively. **Results** The eukaryotic expression vector pCDNA3-TfR was constructed successfully by checking with enzyme digestion and sequencing, and the highly expressed canine TfR was observed in CHO cells transfected with pCDNA3-TfR by using RT-PCR, Western blot and immunofluorescence, respectively. The stable CHO cell line with canine TfR expression was established. **Conclusion** The construction of the eukaryotic expression vector pCDNA3-TfR and the establishment of stable CHO cell line with TfR expression provide solid foundation for further experimental studies on the function of TfR.

【Key words】 Transferrin receptor CHO cell line Eukaryotic expression vector Stable expression

转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)是一种位于细胞膜上的 II 型跨膜二聚体糖蛋白, 能够介导含铁的转铁蛋白从细胞外转运到细胞内^[1]。同时研究发现, TfR 可以通过与单体 IgA1 抗体、它自身的单克隆抗体的结合参与免疫调节、细胞分化、诱导凋亡等过程的调控作用^[2-5]。NED 等^[6]报道, TfR 还可能在 T 细胞的激活过程中, 发挥免疫调节的作

用。此外, 一些研究发现: 宿主细胞膜上的转铁蛋白受体能够作为病毒感染宿主细胞的受体, 介导病毒侵入宿主细胞, 如犬细小病毒(CPV)、猫细小病毒(FPV)通过 TfR 感染宿主细胞^[7-10]。中国仓鼠卵巢细胞(CHO)具有容纳外源基因高效扩增和表达的优点, 不仅能使外源基因在细胞内获得高效表达, 还具有使外源分泌性蛋白分泌到胞外的优势^[11-12]。因此, CHO 细胞在研究基因表达及功能方面受到青睐。本研究通过 DNA 重组技术将犬 TfR 基因全长克隆到真核表达载体 pCDNA3, 并转染 CHO, 经

* 国家自然科学基金(No. 81260247)资助

△ 通信作者, E-mail: sunraining2008@hotmail.com

过 G418 的筛选,建立稳定表达犬 TfR 的 CHO-TfR 细胞系,为其功能研究奠定良好的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

CHO、犬腺细胞(walter reed dog cell, WRD)及大肠杆菌 DH5 α 由宁夏医科大学基础医学院生物化学实验室储存。2 $\times$ phusion Master Mix, T4 DNA 连接酶(NEW ENGLAND Biolabs 公司); *EcoR* I、*Xho* I 限制性内切酶(TaKaRa 公司);质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(EZNAT MOMEGA 公司);反转录试剂盒、TransTaqTM HiFi DNA Polymerase、TransLipid Transfection Reagent(TRANS 公司);凯基全蛋白提取试剂盒(凯基生物公司);DAPI 染色试剂盒(上海贝博生物);F12/DMEM 细胞培养液、胎牛血清(Gibco 公司);胰酶(Sigma 公司);兔抗 TfR 抗体(ImmunoWay 公司), β -actin 抗体(中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和合成 参照 GenBank 上犬 TfR 基因全长的序列,利用 Bioedite 软件设计 TfR 引物。上、下游引物两端分别添加 *EcoR* I 和 *Xho* I,引物由上海生工生物技术有限责任公司合成。TfR 引物序列:上游,5'-CGGAATTCGCC GCCATGAT GGATCAAGCCAGATCAGC-3',下游,5'-GGCCTCGAGTTAAACTCATTTGTCAA TATCCCATATG-3'。

1.2.2 真核表达载体 pCDNA3-TfR 的构建和鉴定 提取 WRD(TfR 表达阳性)细胞 RNA 并进行反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板,通过 PCR 方法扩增 TfR 基因。扩增条件如下:98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 10 s,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。总扩增体积 100 μ L。扩增产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,切胶,回收纯化目的片段。分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切目的片段及 pCDNA3 质粒,连接并转化 DH5 α 菌。挑取单克隆,于含有氨苄青霉素的 LB 培养基中振荡培养过夜,提取质粒,酶切鉴定并测序,挑选阳性克隆质粒以备转染用。

1.2.3 重组质粒 pCDNA3-TfR 转染、筛选及细胞系的建立 CHO 细胞铺 6 孔培养板并培养过夜,使细胞贴壁率达到 80%,采用脂质体转染法(按产品说明书进行操作)将重组质粒 pCDNA3-TfR 转染 CHO 细胞。转染 48 h 后,加入 G418(400 μ g/mL)

工作液进行筛选,以未转染 CHO 细胞作为对照,每 3~5 d 更换培养液并进行传代培养,以对照组的细胞全部死亡作为参考,继续扩增存活的 CHO 转染细胞系,挑选两个阳性细胞克隆,继续扩大培养,应用 RT-PCR 和 Western blot 鉴定 TfR 表达水平。根据 TfR 的表达水平确定细胞株并继续传代培养,由此获得稳定表达犬 TfR 的 CHO-TfR 细胞系。

1.2.4 RT-PCR 检测 CHO-TfR 细胞系中 TfR mRNA 转录水平的表达 收集 CHO 细胞、CHO-TfR 细胞和 WRD 细胞(阳性对照),用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,取 5 μ g 进行反转录,用反转录试剂盒将其反转录为 cDNA,取 2 μ L 合成的 cDNA 为模板,PCR 扩增 TfR 目的基因。同时以 GAPDH 为内参。PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳,通过凝胶成像仪观察并分析结果。

1.2.5 Western blot 检测 CHO-TfR 细胞系 TfR 蛋白表达 收集 CHO 细胞、CHO-TfR 细胞和 WRD 细胞(阳性对照),裂解液裂解细胞,提取蛋白并进行定量。取 20 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并转印至 PVDF 膜。转膜结束用 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h,兔源 TfR 一抗(1:2 000)室温孵育 1.5 h,PBST 洗膜 3 次后加入抗兔二抗室温孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次,BCL 试剂进行显色,用 azure-C400 凝胶成像系统观察并分析结果。

1.2.6 免疫荧光观察 TfR 的表达 CHO 细胞、CHO-TfR 细胞系以及 WRD 细胞(阳性对照),铺 6 孔细胞培养板(内附盖玻片)过夜贴壁后用 PBS 缓冲液冲洗 2 次,加入 2 mL 冰冷固定液(体积分数为 50%甲醛和 50%丙酮混合物)固定细胞 10 min,除去固定液。用 PBS 洗 3 次后,0.5% TritonX-100 孵育 30 min,PBS 洗 3 次。加入 5%山羊血清 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,进行封闭。TfR 一抗(1:400)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗 4 次,每次 10 min。后用 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔二抗(1:800)闭光孵育 1 h,封片后用激光扫描共聚焦显微镜观察 TfR 的表达情况。

2 结果

2.1 TfR mRNA 和蛋白在 CHO 细胞中的表达

以 CHO 细胞、WRD 细胞的 cDNA 为模板,进行 TfR 扩增,结果见图 1 A,WRD 细胞(条带 1)在 590 bp 处有 TfR mRNA(扩增的部分片段)特异性目的条带,CHO 细胞(条带 3)未见。进一步通过 Western blot 检测 CHO 细胞中 TfR 蛋白的表达,

如图 1B 所示;CHO 细胞也几乎未见 TfR 蛋白表达条带。由此说明 CHO 细胞几乎没有 TfR 表达。

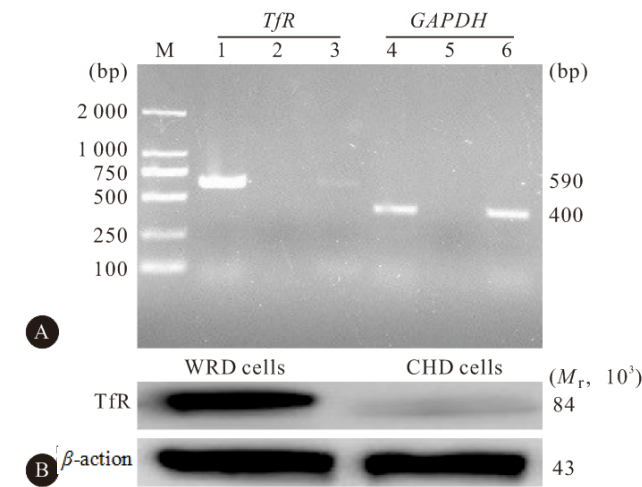


图 1 CHO 细胞 TfR 的表达

Fig 1 The expression of TfR in CHO cells

A: The expression of *TfR* gene of CHO cells was detected by PCR; M: DNA marker of DL2000; 1-3 : WRD cells, negative control (empty, no templates for PCR) and CHO cells for *TfR*; 4-6: WRD cells, negative control (empty, no templates for PCR) and CHO cells for *GAPDH*; B: TfR protein was detected by Western blot

2.2 pCDNA3-*TfR* 重组质粒的鉴定

构建的 pCDNA3-*TfR* 重组质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后,电泳(图 2)显示两条带,一条为 pCDNA3 载体(5 400 bp),另外一条为目的片段,大小为 2 313 bp(*TfR* mRNA 全长),与预期 *TfR* 大小一致。同时将重组质粒送公司测序(上海生工生物公司),测序结果显示 *TfR* 基因序列成功插入到 pCDNA3 载体中。

2.3 CHO-*TfR* 细胞系的鉴定

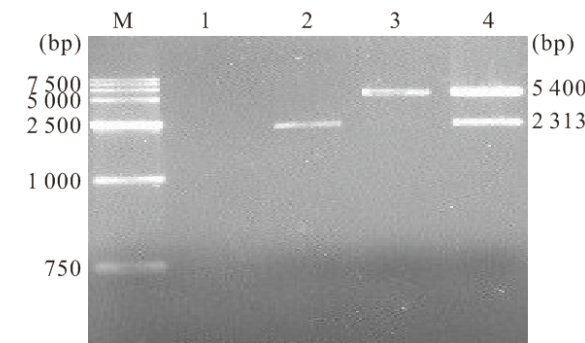


图 2 pCDNA3-*TfR* 重组质粒鉴定

Fig 2 Identification of recombinant pCDNA3-*TfR*

M: DNA marker; 1-4 : Negative control, PCR amplification of full-length *TfR*, pCDNA3 empty plasmid (digested with *EcoR* I and *Xho* I) and pCDNA3-*TfR* (digested with *EcoR* I and *Xho* I), respectively

2.3.1 RT-PCR 检测 CHO-*TfR* 细胞系 *TfR* mRNA 的表达 见图 3。以 WRD 细胞、CHO-*TfR* 细胞、CHO 细胞的 cDNA 为模板,PCR 扩增后,WRD 细胞和 CHO-*TfR* 细胞在 590 bp 处有明显的 *TfR* 目的条带出现,而 CHO 细胞没有 *TfR* 条带,说明构建的 CHO-*TfR* 细胞系存在 *TfR* mRNA 表达。

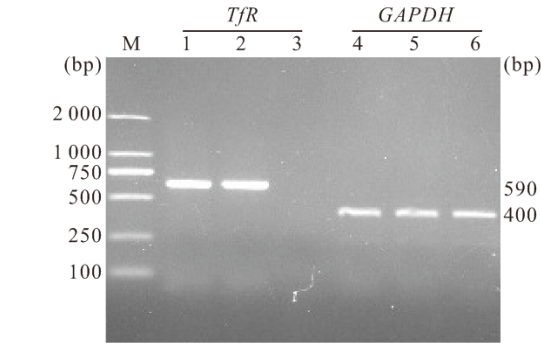


图 3 RT-PCR 分析 CHO-*TfR* 细胞系中 *TfR* mRNA 表达

Fig 3 The expression of *TfR* mRNA was detected in CHO-*TfR* cells by using reverse transcriptional-PCR

M: DNA marker of DL2000; 1-3 : WRD cells, CHO-*TfR* and CHO cells for *TfR*; 4-6: WRD cells, CHO-*TfR* and CHO cells for *GAPDH*

2.3.2 Western blot 检测 CHO-*TfR* 细胞系 TfR 蛋白的表达 Western blot 检测(图 4)显示,WRD 细胞、CHO-*TfR* 细胞在相对分子质量约为 84×10^3 处有明显的目的条带,CHO 细胞表达非常微弱。提示筛选并建立的 CHO-*TfR* 细胞系能够稳定表达犬 TfR 蛋白。

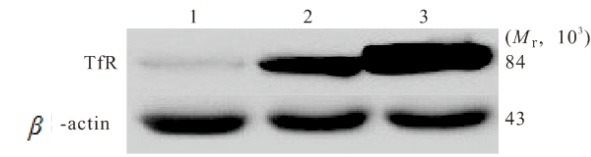


图 4 Western blot 检测 CHO-*TfR* 细胞系 TfR 蛋白的表达

Fig 4 The expression of TfR protein was detected in CHO-*TfR* cells by Western blot

1: CHO cells; 2: CHO-*TfR* cells; 3: WRD cells

2.3.3 免疫荧光检测 CHO-*TfR* 细胞系中 TfR 的表达 见图 5,WRD 细胞(图 5C)、CHO-*TfR* 细胞(图 5B)明显可见 TfR 蛋白(绿色)表达,并且主要分布到细胞膜周围。CHO 细胞几乎未见 TfR 存在(图 5A)。

3 讨论

TfR 又称为 CD71 分子,在参与细胞铁吸收和

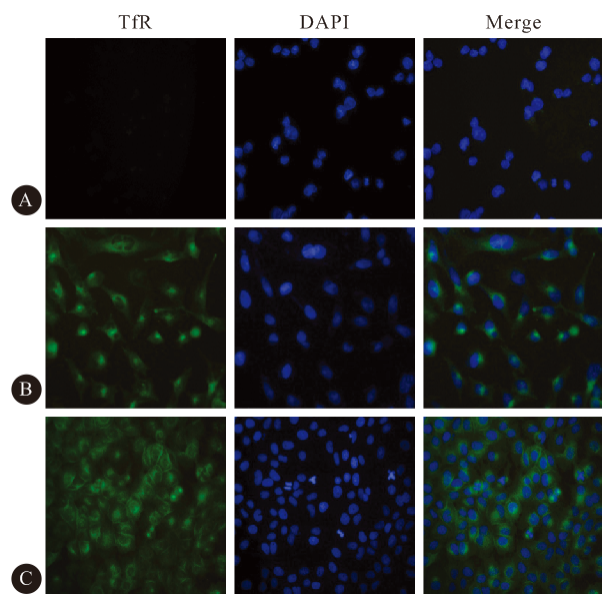


图 5 免疫荧光检测 CHO-TfR 细胞系中 TfR 的表达。×100

Fig 5 Expression of TfR was detected in CHO-TfR cells by fluorescent microscope. ×100

A: CHO cells; B: CHO-TfR cells; C: WRD cells

调节细胞生长方面发挥重要作用。在细胞吸收铁的过程中, TfR 通过细胞膜外区域与含有铁离子的转铁蛋白结合, 并通过网格蛋白介导内吞途径, 从而实现对铁离子的吸收^[1]。TfR 是相对分子质量约为 90×10^3 的二型细胞膜蛋白, 两个亚基通过两条二硫键交联形成同源二聚体形式 (180×10^3) 镶嵌在细胞膜上, 每个亚基单体包含一个大的胞外 C 端区域 (约 671 个氨基酸残基)、一个单跨膜区域 (含有 20~28 个氨基酸残基) 及一个短的位于胞浆内的 N 端区域 (含 61 个氨基酸残基)。C 端区域是一个外功能区, 含有 Tf 的结合位点。

TfR 除了在细胞吸收铁离子的过程中发挥受体作用外, 有些生物体的 TfR 还在病毒感染其嗜性细胞过程中发挥膜受体的作用。研究报道: TfR 成为 CPV、FPV 感染靶细胞的细胞膜受体, 在病毒识别、结合、感染靶细胞过程中, 病毒衣壳蛋白 VP2 与 TfR 相互作用和结合, 通过内吞途径完成感染^[7-10]。同时研究发现, CPV 和 FPV 可以结合人和鼠的转铁蛋白受体, 并且使用这些受体进入和感染细胞, 微注射或外源加入抗转铁蛋白受体的抗体, 能够阻止病毒感染细胞^[13]。这些研究结果说明 TfR 在病毒、尤其是细小病毒的感染过程中发挥受体作用。

CHO 细胞属于成纤维细胞, 是一种非分泌型细

胞, 很少分泌自身的内源蛋白, 并且具有对重组基因高效扩增和翻译表达的能力; 同时该细胞既可贴壁生长, 又可以悬浮培养并达到高密度培养的特点, 有利于大规模生产的优点, 因此 CHO 成为包括工程抗体和重组蛋白在内的生物技术药物研发和生产的重要的表达系统^[11-12]。据统计, 目前全世界治疗性重组蛋白中近 70% 都是用 CHO 细胞表达系统生产^[14]。

许多正常细胞表面都有不同水平 TfR 的表达, 代谢越旺盛的细胞表面 TfR 的表达量越高。研究表明 TfR 在许多肿瘤细胞表面高表达, 因此也成为肿瘤治疗的一个分子靶点^[15-16]。本研究中我们首先通过 RT-PCR 和 Western blot 方法证实 CHO 细胞几乎不表达 TfR 蛋白, 因此建立能够稳定表达 TfR 膜蛋白的 CHO 细胞系具有潜在意义。我们利用犬腺细胞 cDNA 为模板扩增 TfR 基因的全长序列, 并将其插入到 pCDNA3 质粒中, 构建 pCDNA3-TfR 重组质粒, 转染 CHO 细胞后, 通过 RT-PCR 和 Western blot 方法证实转染细胞能够表达犬 TfR 外源基因。同时采用免疫荧光方法观察 TfR 在细胞中的分布状况, 结果表明 TfR 表达分布于细胞膜, 符合正常生理状态下该蛋白的分布。研究结果表明成功建立了 TfR 稳定表达的 CHO-TfR 细胞系。

综上所述, 本研究成功建立稳定表达犬 TfR 的 CHO-TfR 细胞系, 为今后研究 TfR 分子的生物学功能及其在病毒感染方面提供良好的实验基础。

参 考 文 献

- [1] HOPKINS CR, TROWBRIDGE IS. Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol*, 1983, 97(2): 508-521.
- [2] MOURA IC, CENTELLES MN, ARCOS-FAJARDO M, *et al*. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig) A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med*, 2001, 194(4): 417-425.
- [3] PRUTKI M, POLJAK-BLAZI M, JAKOPOVIC M, *et al*. Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer. *Cancer Lett*, 2006, 238(2): 188-196.
- [4] TAETLE R, DOS SANTOS B, OHSUGI Y, *et al*. Effects of combined antigrowth factor receptor treatment on *in vitro* growth of multiple myeloma. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(6): 450-455.

(下转第 80 页)

2016. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1):7-30.
- [2] GULINO A, DI MARCOTULLIO L, SCREPANTI I. The multiple functions of Numb. *Exp Cell Res*, 2010, 316(6):900-906.
- [3] CAUSSINUS E, HIRTH F. Asymmetric stem cell division in development and cancer. *Prog Mol Subcell Biol*, 2007(45): 205-225.
- [4] OKAMOTO A, SAMEISHIMA Y, YOKOYAMA S, *et al.* Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 1991, 51(19):5171-5176.
- [5] MARKS JR, DAVIDOFF AM, KERNS BJ, *et al.* Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 1991, 51(11):2979-2984.
- [6] COLALUCA IN, TOSONI D, NUCIFORO P, *et al.* NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature*, 2008, 451(7174):76-80.
- [7] WANG C, FENG W, ZHANG C. The expression and function of NUMB in endometrial cancer and the interaction with HDM2 and P53. *J Cancer*, 2015, 6(10):1030-1040.
- [8] SHENG W, DONG M, ZHOU J, *et al.* Cooperation among Numb, MDM2 and p53 in the development and progression of pancreatic cancer. *Cell Tissue Res*, 2013, 354(2):521-532.
- [9] 敬 宏, 郑 艾, 牛晓宇. 膜相关蛋白 Numb 在上皮性卵巢癌中的表达及其与耐药相关蛋白 P 糖蛋白、多药耐药相关蛋白 1 的关系. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2015, 11(3): 323-328[2016-06-01]. <http://cjogp.paperopen.com>.
- [10] 李 蓉, 朱晓玲, 田桂兰. *CerbB2*、*p53* 基因及 PCNA 在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(12):1285-1287.
- [11] RHYU MS, JAN LY, JAN YN. Asymmetric distribution of Numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell*, 1994, 76(3): 477-491.
- [12] MAIORANO E, FAVIA G, PECE S, *et al.* Prognostic implications of NUMB immunoreactivity in salivary gland carcinomas. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2007, 20(4): 779-789.
- [13] HONGJM, LIU ZG, ZHU H, *et al.* The tumor suppressive role of NUMB isoform 1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 2014, 5(14):5602-5614.
- [14] PECE S, SERRESI M, SANTOLINI E, *et al.* Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol*, 2004, 167(2):215-221.
- [15] WESTHOFF B, COLALUCA IN, DARIO G, *et al.* Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(52):22293-22298.
- [16] RENNSTAM K, MCMICHAEL N, BERGLUND P, *et al.* Numb protein expression correlates with a basal-like phenotype and cancer stem cell markers in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 122(2):315-324.
- [17] 陈小君, 叶 枫. 细胞分裂方向的改变和 Numb 的表达增高在宫颈鳞癌中的作用. *实用癌症杂志*, 2003, 5(20):455-457.
- [18] CHEN H, CHEN X, YE F, *et al.* Symmetric division and expression of its regulatory gene Numb in human cervical squamous carcinoma cells. *Pathobiology*, 2009, 76(3): 149-154.
- [19] 田建新, 刘慧源, 商宇红. Numb 蛋白与宫颈病变类型及高危型 HPV 负荷量的关系. *山东医药*, 2014, 54(42):37-39.
(2016-06-14 收稿, 2016-11-05 修回)
- 编辑 汤 洁
- ~~~~~
- (上接第 60 页)
- [5] MOURA IC, LEPELLETIER Y, ARNULF B, *et al.* A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferring receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood*, 2004, 103(5):1838-1845.
- [6] NED RM, SWAT W, ANDREWS NC. Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development. *Blood*, 2003, 102(10):3711-3718.
- [7] HUEFFER K, PALERMO L, PARRISH CR. Parvovirus infection of cells by using variants of the feline transferrin receptor altering clathrin-mediated endocytosis, membrane domain localization and capsid-binding domains. *J Virol*, 2004, 78(11):5601-5611.
- [8] PARKER JS, MURPHY WJ, WANG D, *et al.* Canine and feline parvovirus can use human or feline transferrin receptors to bind, enter and infect cells. *J Virol*, 2001, 75(8):3896-3902.
- [9] BARBIS DP, CHANG SF, PARRISH CR. Mutations adjacent to the dimple of canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology*, 1992, 191(1):301-308.
- [10] PARKER JSL, PARRISH CR. Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol*, 2000, 74(4):1919-1930.
- [11] DINGERMAN T. Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. *Biotechnol J*, 2008, 3(1):90-97.
- [12] CONRADT HS, NIMTZ M, DITTMAR KE, *et al.* Expression of human interleukin-2 in recombinant baby hamster kidney, Ltk-, and Chinese hamster ovary cells. Structure of O-linked carbohydrate chains and their location within the polypeptide. *J Biol Chem*, 1989, 264(29):17368-17373.
- [13] MARTELLA V, DECARO N, ELIA G, *et al.* Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2005, 52(7-8):312-315.
- [14] LAI T, YANG Y, NG SK. Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2013, 6(5):579-603.
- [15] 卢 燕, 石屹峰. 转铁蛋白受体——肿瘤的标志物和靶向治疗. *生命的化学*, 2010, 30(2):360-363.
- [16] 钟 玲, 李思齐, 杨 蔚, 等. 转铁蛋白受体介导紫杉醇纳米粒对结肠癌细胞的靶向性研究. *中国生化药物杂志*, 2014, 35(5):23-29.
(2016-05-14 收稿, 2016-09-28 修回)
- 编辑 沈 进