

鸡白细胞介素 2 基因的克隆、原核表达及功能研究

郭川^{1,2}, 郑忠辉², 吴国平^{2,3}, 林由¹, 苏文金¹, 曹敏杰¹

(1. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005;
3. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 以 RT-PCR 法从鸡脾脏细胞中扩增出鸡白细胞介素 2 编码基因, 通过双酶切、连接步骤克隆进原核表达载体 pQE30 及 pGEX-4T-3, 构建了鸡白细胞介素 2 基因的重组原核表达质粒 pQE30-chIL-2 及 pGEX-chIL-2. 重组质粒转化大肠杆菌 JM109 后经诱导表达, 分别得到两种表达产物. 以 SDS-PAGE 和 Western blot 检测确认表达产物为带 6 组氨酸标签及 GST 蛋白的融合鸡白细胞介素 2, 分子量分别为 16 kDa 及 39.5 kDa. 表达蛋白与抗鸡白细胞介素 2 单抗均有良好的免疫结合性, 进一步证实为鸡白细胞介素 2. 表达产物经过纯化复性后, 具有明显促进鸡脾淋巴细胞增殖的作用.

关键词: 鸡白细胞介素 2; 克隆; 原核表达; 免疫印迹

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

Study on the cloning, expression and function of chicken interleukin - 2

GUO Chuan^{1,2}, ZHENG Zhong-hui², WU Guo-ping^{2,3}, LIN You¹, SU Wen-jin¹, CAO Min-jie¹

(1. School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China; 2. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 3. School of Fisheries, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: The gene encoding chicken interleukin - 2 (chIL - 2) was amplified from chicken spleen cells by RT-PCR. Following double digestion by restriction endonucleases and ligation, chIL - 2 was cloned into prokaryotic expression vectors of pQE30 and pGEX - 4T - 3 to construct recombinants of pQE30 - chIL - 2 and pGEX - chIL - 2, which were consequently transformed into *E. coli* JM109. Two kinds of recombinant protein were obtained with IPTG induction. The molecular weights of the expressed proteins were 16 kDa and 39.5 kDa on SDS - PAGE and they were regarded as 6His and GST labeled protein respectively as checked by Western blot. Both proteins revealed specific reaction to anti - chIL - 2 mAb, further confirming that recombinant proteins are chicken interleukin - 2. After purification and renaturation, the 6His - chIL - 2 showed biological activity in stimulating chicken lymphocyte proliferation.

Key words: chicken interleukin - 2; cloning; expression; Western blot

白细胞介素 2(interleukin - 2, IL - 2) 是 T 淋巴细胞在经抗原或有丝分裂原刺激之后产生的一种细胞因子, 具有促进 T 细胞的激活和增殖、B 细胞的活化、增强 NK 细胞的杀伤作用等功能^[1], 在机体的免疫应答中发挥着重要作用. 研究表明, IL - 2 能促进机体免疫反应, 与疫苗联用能增强其免疫保护效果^[2-5], 因此可以作为新一代免疫增强剂或免疫佐剂. Schauenstein 等人在 1982 年首次发现经 ConA 诱导的鸡脾淋巴细胞条件培养基可诱导淋巴细胞的增殖^[6], 表明鸡体内存在功能类似哺乳动物 IL - 2 的细胞因子. 鸡白细胞介素 2(Chicken interleukin - 2, chIL - 2) 基因克隆的成功^[7], 使 chIL - 2 的研究进入了基因水平, 并先后在原核及真核表达系统中实现体外表达, 推动了禽类传染病基因工程疫苗的研究及

收稿日期: 2005 - 06 - 27

作者简介: 郭川(1981 -), 男, 硕士研究生; 通讯联系人: 曹敏杰, 教授.

基金项目: 福建省科技攻关计划重点项目(2003N083); 厦门市科技攻关计划重点项目(3502Z20031054); 集美大学科研启动基金(F03003).

应用. chIL-2 对免疫原性较弱的基因工程疫苗起到免疫增强作用^[8]. 一些造成重大经济损失的病原如传染性法氏囊病病毒、新城疫病毒、禽流感病毒等感染后会引起免疫抑制,而这种免疫抑制大多伴有 IL-2 分泌异常或对 IL-2 反应异常^[9,10]. 由于鸡白细胞介素2是一种新近发现的禽类细胞因子且在鸡体内免疫调节过程中扮演重要角色,而国内外对此蛋白功能等方面的研究还较少. 特别是原核细胞所表达的重组 chIL-2, 经过复性后能否具有促进淋巴细胞增殖的功能还未见报道. 本实验分别用两种原核表达载体 pQE30 及 pGEX-4T-3, 对 chIL-2 进行原核表达, 并比较其表达效果, 为 chIL-2 的制备提供依据. 对表达产物生物活性功能的研究可为 chIL-2 作为免疫增强剂应用奠定理论基础.

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

健康鸡取自厦门某鸡场. Trizol 试剂、TaqDNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I、抗 6 组氨酸单克隆抗体、pQE30 及 pGEX-4T-3 质粒载体购自 Invitrogen 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司; 抗谷胱甘肽 S-转移酶(GST)单克隆抗体来自 Pierce 公司; 抗鸡白细胞介素2单克隆抗体、大肠杆菌 JM09 由本实验室保存. 辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG 购自 DAKO 公司; 琼脂糖来自 Bio-Rad 公司; Ni-NTA 亲和层析柱购自 Novagen 公司; SDS-PAGE 用蛋白质标准分子量购自 Fermentas 公司; 免疫印迹用蛋白质标准分子量购自 New England Biolab 公司; IMDM 培养液和胎牛血清来自 GIBCO 公司.

1.2 方 法

1) PCR 引物设计. PCR 反应的引物设计按 GenBank (AF000631) 中 chIL-2 的序列为依据进行: 上游引物 primer1 为 5'-cgcgatcgcgatctctcatcaaaaag-3'; 下游引物 primer2 为 5'-acgcgctgact-tattttgcatagatctcacaag-3'. 其中, primer 1 加入 *Bam*H I 酶切点, primer 2 加入 *Sal* I 酶切点.

2) RT-PCR. 取鸡脾脏组织, 用 Lymphoprep 试剂提取淋巴细胞, 并用 ConA 激活. 具体步骤参照文献[11]. 以 Trizol 试剂提取淋巴细胞总 RNA, 用 Oligo(dT)₁₅ 引物进行常规 RT-PCR 扩增合成 cDNA. 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件为预变性 94℃, 3 min; 94℃, 30 s; 59℃, 45 s; 72℃, 2 min. 共进行 30 个循环, 最后在 72℃ 下延伸 7 min. PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳上作分析检测.

3) 表达载体的构建与鉴定. *Bam*H I 及 *Sal* I 双酶切的 PCR 产物、pQE30 和 pGEX-4T-3 载体质粒, 以 T₄ DNA 连接酶在 22℃ 下进行连接反应 4 h, 并转化 JM109 感受态细胞, 涂布 LB 平板(含氨苄青霉素 100 μg/mL). 37℃ 过夜培养, 挑选单菌落, 培养后以细菌 DNA 作为模板, 分别用 chIL-2 特异引物和 pGEX-4T-3 载体通用引物以 PCR 筛选含重组菌. 阳性菌质粒送至上海博亚公司进行序列测定.

4) 融合蛋白的诱导表达. 将重组细菌接种于 5 mL LB 培养基(Amp), 37℃ 摇床过夜培养, 次日按 1% 接种量转于另一 5 mL LB (Amp) 培养基. 振荡扩增并测定 600 nm 的吸光值, 待 OD₆₀₀ = 0.5 ~ 0.7 时, 加入异丙基硫代半乳糖(IPTG) 至终浓度为 0.5 mmol/L 进行诱导, 37℃ 继续振荡 4 h 后, 12 000 g 离心 1 min, 沉淀分别重悬于 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl 缓冲液后超声波破碎, 12 000 g 离心 20 min 后沉淀用含 5 mol/L 尿素的 PBS 缓冲液洗涤, 包涵体最后溶于含 8 mol/L 尿素的 PBS 缓冲液中. 改变诱导表达的温度、IPTG 浓度诱导时间等表达条件, 对表达效果条件进行优化.

5) SDS-PAGE 及 Western blot 检测表达蛋白. 将未诱导对照、IPTG 诱导后样品及溶解于尿素后的表达蛋白样品经 SDS 处理后, 12% 聚丙烯酰胺电泳胶电泳, 考马斯亮蓝染色检测蛋白表达水平. 同时, 以上样品电泳后经电转移至硝酸纤维素膜, 以抗 6-His 单克隆抗体和抗 GST 单克隆抗体作为一抗、辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG 为二抗作免疫印迹反应, 分别检测以 pQE30 及 pGEX-4T-3 为表达载体的表达产物. 两种载体的表达产物进一步用抗 chIL-2 单克隆抗体作为一抗进行 Western blot 检测.

6) 包含体的纯化及复性. chIL-2 的纯化及复性采用金属 Ni²⁺ 螯合 6-His 亲和层析法及一步复性法, 具体步骤参照文献[12]进行, 并稍作修改. 将溶解于 5 mol/L 尿素的 6his-chIL-2 按 10 倍于凝胶的

体积上样于 Ni - NTA 亲和层析柱, 用不含尿素的复性缓冲液洗涤至 $OD_{280} < 0.005$ 后将柱置于 4 过夜复性 12 h. 用含 250 mmol/L 咪唑的 PBS 进行洗脱, 洗脱液于 SDS - PAGE 进行电泳检测.

7) 重组 chIL - 2 的生物活性检测. 按文献[11]的方法提取鸡脾脏淋巴细胞, 用 PBS 洗涤并用含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养液稀释至 1×10^6 cells/mL, 取 2 mL 细胞悬液于 24 孔培养板中, 加入纯化复性并过 0.22 μ m 滤器的 6His - chIL - 2 至终浓度为 200 pg/mL. 在 5% CO_2 、40 下培养 48 h 后在显微镜下观察细胞生长. 对照组则加入 PBS 洗脱液以替代重组 chIL - 2.

2 结果

2.1 PCR 扩增和表达载体的构建及鉴定

以鸡脾脏淋巴细胞提取的 RNA 为模板, 用 ChIL - 2 特异性引物进行 RT - PCR 扩增. 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 在约 420 bp 处呈现一条与预期产物大小相符的条带. 回收扩增产物, 经酶切、连接、转化后对阳性克隆质粒进行 PCR 鉴定, 结果(图 1(a))表明转化菌 1、2、3 已含有重组表达质粒 pQE30 - chIL - 2. 图 1(b) 为以 pGEX - 4T - 3 通用引物扩增的结果, 泳道 2、3 得到约 550 bp 的片段, 而 pGEX - 4T - 3 空载体扩增出的片段约为 130 bp (泳道 1), 证实 pGEX - 4T - 3 载体中已插入约 420 bp 的片段. 重组质粒测序结果表明在两种载体中插入的片段均为 chIL - 2 基因.

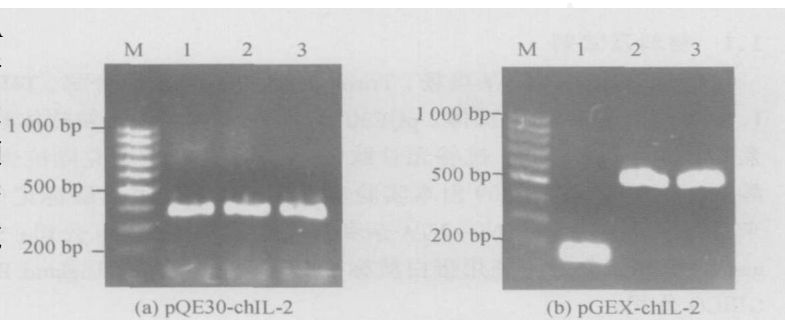


图 1 PCR 筛选重组子

Fig. 1 PCR screening of recombinant chIL - 2

(M: DNA 标准分子量; 1~3: 细菌 DNA 作模板的 PCR 结果)

2.2 重组质粒在大肠杆菌中的表达

两种含有重组质粒的 JM109 宿主菌, 经 0.5 mmol/L IPTG 在 37 下诱导后, 可获得 chIL - 2 的高效表达. 超声波破碎, 离心后分离上清及沉淀, 经 SDS - PAGE 后知表达蛋白主要存在于包含体中, 两种表达产物的分子量分别为 16 kDa 及 39.5 kDa (图 2), 与预计的蛋白质大小基本相同 (chIL2 本身大小约 14 kDa, 6 - His 标签为 2 kDa, GST 标签蛋白为 26 kDa), 因此, 表达产物可能是分别带 6 - His 及 GST 标签蛋白的 chIL - 2 蛋白, 经凝胶成像仪分析测定, 融合蛋白的表达量约为菌体总蛋白的 20% 及 35%.

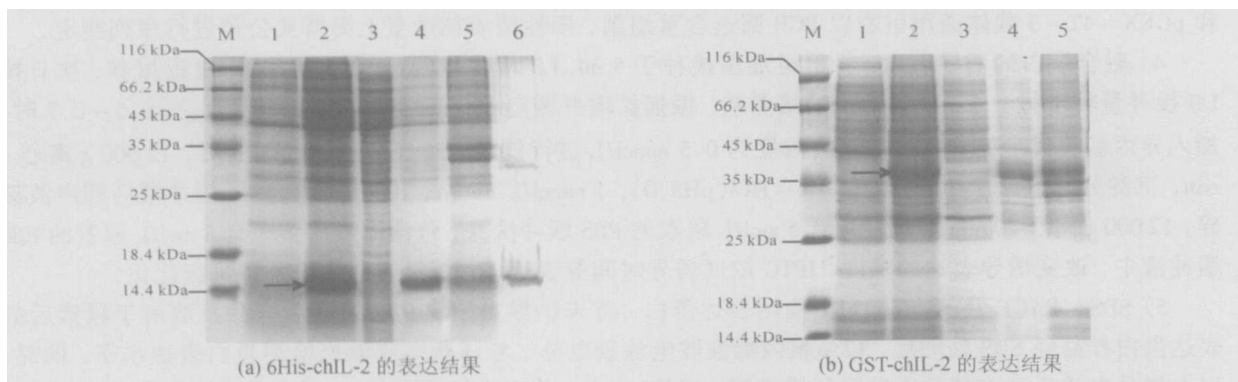


图 2 chIL - 2 蛋白表达结果的 SDS - PAGE 分析

Fig. 2 SDS - PAGE analysis of expressed chIL - 2

(M: 标准蛋白质; 1: 菌体诱导前全蛋白; 2: 菌体诱导后全蛋白; 3: 超声裂解液上清; 4: 溶于 5 mol/L 尿素的裂解液沉淀; 5: 溶于 8 mol/L 尿素的裂解液沉淀; 6: 纯化后 6His - chIL - 2. 箭头所指为目的蛋白位置)

2.3 融合蛋白的 Western Blot 分析

为了证明表达蛋白分别是带 6 - His 及 GST 标签的 chIL - 2 蛋白, 表达产物经 SDS - PAGE 后电转移至硝酸纤维素膜并分别经抗 6 - His 单克隆抗体、抗 GST 单克隆抗体为一次抗体、兔抗鼠 IgG - HRP 为二次抗体反应后以 DAB 底物检测. 由图 3 可见, 在分子量为 16 kDa 及 39.5 kDa 处出现了清晰的条带. 将两种表达蛋白与抗 chIL - 2 单克隆抗体反应, 也观察到表达蛋白的阳性反应(图 4). 图中 1、3、4 泳道的 16 kDa 及 32 kDa 处皆出现显色条带, 表明重组 chIL - 2 在变性条件下能够形成同源二聚体. 泳道 5、7、8 也出现分子量与理论值相符的显色条带, 分子量稍小的位置(29 kDa)出现的条带推测为 chIL - 2 的降解产物. 以上结果证实表达蛋白分别为 6 - His 及 GST 融合的 chIL - 2 蛋白.

2.4 包含体的纯化及复性

包含体经过 5 mol/L 尿素溶解及 Ni - NTA 亲和层析柱纯化并复性后可在 SDS - PAGE 检测中得到 16 kDa 及约 32 kDa 的纯化条带(图 4, 泳道 6), 其中 32 kDa 的条带应是 6His - chIL - 2 所形成的二聚体条带.

2.5 重组 chIL - 2 的生物活性检测

将纯化并复性后的 6His - chIL - 2 加入鸡脾淋巴细胞培养 48 h 后, 在显微镜下可观察到淋巴细胞的明显增殖且有细胞聚集现象, 而对照组细胞已开始凋亡(图 5). 说明重组 6His - chIL - 2 具有促进鸡淋巴细胞增殖的生理活性.

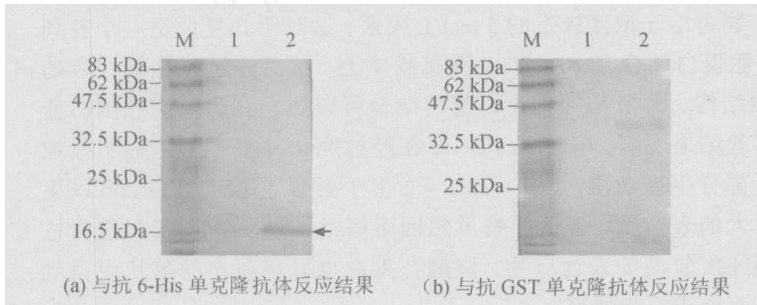


图 3 Western blot 检测 chIL - 2 蛋白的表达
Fig. 3 Western blot analysis of expressed chIL - 2
(M: 标准蛋白质; 1: 未诱导菌体; 2: 诱导菌体)

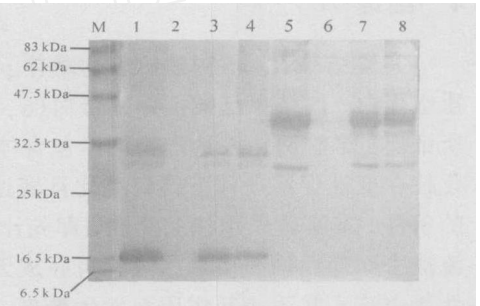


图 4 Western blot 检测 chIL - 2 蛋白的表达
(与抗 chIL - 2 单克隆抗体反应结果)
Fig. 4 Western blot analysis of expressed chIL - 2
(reaction with anti - chIL - 2 mAb)
(M: 标准蛋白质; 1、5: 菌体诱导前全蛋白; 2、6: 超声裂解液上清; 3、7: 溶于 5 mol/L 尿素的裂解液沉淀; 4、8: 溶于 8 mol/L 尿素的裂解液沉淀. 图中 1~4 为 6His - chIL - 2; 5~8 为 GST - chIL - 2)

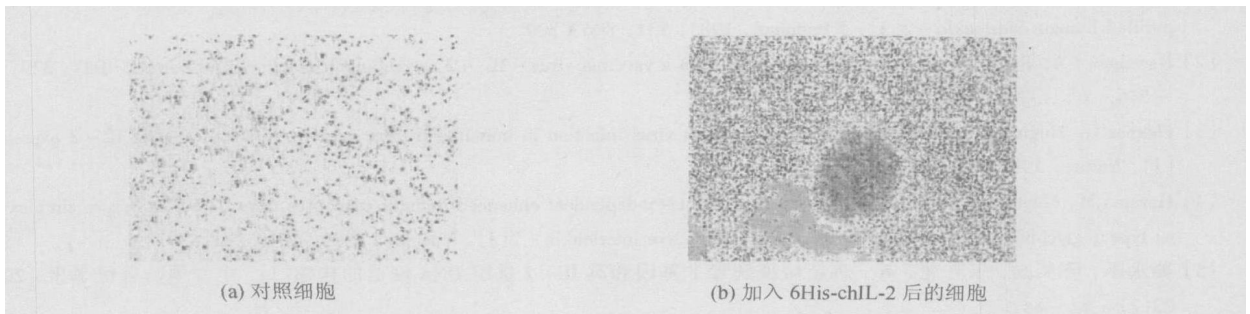


图 5 6His - chIL - 2 促进鸡脾淋巴细胞增殖
Fig. 5 Proliferation activity of 6His - chIL - 2 on chicken lymphocytes

3 讨论

目前, 许多种哺乳动物如人、鼠、牛、猪等的白细胞介素 2 已经得到纯化, 并已进行克隆、序列测定及功能性研究^[13-17]. 它们与人白细胞介素 2 之间的氨基酸同源性的为 58%~100%. 鸡白细胞介素 2 是第一个被鉴定的非哺乳动物白细胞介素, 与人白细胞介素之间遗传同源性只有 26.5%^[7]. 由于近年来

禽流感在东亚及东南亚地区频繁爆发,使得对禽流感疫苗及其佐剂的研究意义非凡,而 IL - 2 以其良好的免疫促进作用理所当然成为现阶段免疫佐剂研究的热点. Zhou 等最近报道了有关鸭白细胞介素 2 (Duck interleukin - 2, duIL - 2) 的表达及其功能研究,发现 duIL - 2 和 chIL - 2 会与它们的单克隆抗体起免疫交叉反应,而且 duIL - 2 能够促进鸡和鸭两类脾脏淋巴细胞的增殖^[18],这提示氨基酸同源性只有 55% ~ 56.7% 的两类 IL - 2 在结构及功能机理上可能存在着某种尚未知晓的因素.因此, chIL - 2 的生理功能、作用机理等内容还有待进一步研究.但是要对 chIL - 2 进行更深入的研究,必须得到足量可供研究用的活性蛋白.在以大肠杆菌为宿主菌的表达系统中一般都难以得到可溶性的表达产物,尽管在酵母表达系统中可得到可溶的重组 chIL - 2 蛋白,但其生物活性未得到验证^[19].

文献[11]报导的利用单克隆抗体偶联的亲和层析柱来纯化天然 chIL - 2 的方法尽管能得到高纯度天然蛋白,但由于在鸡淋巴细胞培养液中天然 chIL - 2 的含量一般在 100 pmol/mL 以下,因此,要得到一定量蛋白用于研究,尤其是用于作为免疫增强剂使用显然是难以进行的.

4 结语

实验结果表明,构建的表达载体 pQE30 - chIL2 及 pGEX - chIL - 2 都能在大肠杆菌中表达出 chIL - 2 重组蛋白.此结果已被抗标签蛋白(6 - His 及 GST)单克隆抗体及抗 chIL - 2 单克隆抗体的 Western blot 所证实.尽管两种表达产物均以包含体形式存在,但融合 6 - His 的表达产物可以用金属镍离子亲和纯化柱在变性促溶条件下得到纯化且表达产物可溶于浓度较低的 5 mol/L 尿素,这对于其复性是一个有利的条件.本实验采用柱上复性,即先让变性蛋白结合在 Ni - NTA 固相载体上,然后通过复性缓冲液的流洗去除变性剂而使之尽可能折叠成天然结构.固相 Ni - NTA 树脂的结合可以防止在去除变性剂时变性蛋白疏水基团相互作用而发生聚集.实验结果表明,6His - chIL - 2 在经过纯化并复性后能够明显地促进鸡脾淋巴细胞的增殖,证明其恢复了部分生理功能.GST - chIL - 2 由于融合了 GST 蛋白,可以更稳定地存在于大肠杆菌细胞内,且具有更大的表达量.表达产物虽然因溶解性问题无法用亲和层析柱纯化,但包含体经过洗涤或电洗脱可得到纯度较高的表达产物.该融合蛋白也可用凝血酶酶切而得到目的蛋白,但此类蛋白是否具有生理活性有待进一步研究.

参考文献:

- [1] Merluzzi V J, Welte K, Savage D M, *et al.* Expansion of cyclophosphamide - resistant cytotoxic precursors in vitro and in vivo by purified human interleukin - 2[J]. *J Immunol*, 1983, 131: 806 - 809.
- [2] Ramshaw I A. Recovery of immunodeficient mice from a vaccinia virus - IL - 2 recombinant infection[J]. *Nature*, 1987, 329: 545 - 546.
- [3] Flexner C, Hugin A, Moss B. Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient mice by vector - directed IL - 2 expression [J]. *Nature*, 1987, 330: 259 - 261.
- [4] Hazama M, Magumi A A, Asaksw N, *et al.* Adjuvant - independent enhanced immune responses to recombinant herpes simplex virus type 1 glycoprotein D by fusion with biologically active interleukin - 2[J]. *Vaccine*, 1993, 11: 629 - 636.
- [5] 姜永厚, 陈奖励, 宋秀龙, 等. 鸡新城疫病毒 F 基因和鸡 IL - 2 重组 DNA 疫苗的构建[J]. *中国预防兽医学报*, 2001, 23(2): 81 - 84.
- [6] Schauenstein K, Goberson A, Wick G. Avian lymphokines: thymic cell growth factor in supernatants of mitogen stimulated chicken spleen cells[J]. *Dev Comp Immunol*, 1982, 6: 533 - 540.
- [7] Sundick R S, Gill D C. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL - 2 and IL - 15[J]. *J Immunol*, 1997, 159: 720 - 725.
- [8] Li J R, Liang X Y, Huang Y W, *et al.* Enhancement of the immunogenicity of DNA vaccine against infectious bursal disease virus by co - delivery with plasmid encoding chicken interleukin 2[J]. *Virology*, 2004, 329: 89 - 100.
- [9] 费聿锋, 钱建飞, 凌雯, 等. 重组鸡 IL - 2 增强鸡四联灭活苗免疫效果的研究[J]. *畜牧与兽医*, 2004, 34(4): 9 - 11.
- [10] Holt P S. Enhancement of chicken lymphocyte activation and lymphocyte activation and lymphokine release by avian influenza virus

- [J]. *Dev Comp Immunol*, 1990, 14(4): 447 - 455.
- [11] 曹敏杰, Kwang J. 单克隆抗体的制备及鸡白细胞介素2的纯化[J]. *药物生物技术*, 2004, 11(4): 232 - 237.
- [12] Razeghifard M. On - column refolding of recombinant human interleukin - 4 from inclusion bodies[J]. *Protein Expr Purif*, 2004, 37: 180 - 186.
- [13] Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, *et al.* Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin - 2[J]. *Nature*, 1983, 302: 305 - 310.
- [14] McHnight A J, Mason D W, Barclay A N. Sequence of rat interleukin 2 and anomalous binding of a mouse interleukin 2 cDNA probe to rat MHC class II - associated invariant chain mRNA[J]. *Immunogenetics*, 1989, 30: 145 - 147.
- [15] Kashima N, Nishi T C, Fujita T, *et al.* Unique structure of murine interleukin - 2 as deduced from cloned cDNAs[J]. *Nature*, 1985, 313: 402 - 404.
- [16] Cerretti D P, McKereghan K, Larsen A, *et al.* Cloning, sequence, and expression of bovine interleukin - 2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 3 223 - 3 227.
- [17] Godall J C, Emery D C, Bailey M, *et al.* cDNA cloning of porcine interleukin - 2 by polymerase chain reaction[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1 089: 257 - 258.
- [18] Zhou J Y, Wang J Y, Chen J G, *et al.* Cloning, in vitro expression and bioactivity of duck interleukin - 2[J]. *Mol Immunol*, 2005, 42: 589 - 598.
- [19] 许健, 樊拥军, 李龙, 等. 鸡白细胞介素2在毕赤酵母细胞中的表达[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2004, 25(4): 339 - 342.

(接第 759 页)

参考文献:

- [1] 陈方, 唐凤翔, 李峰, 等. 中等分子量的 α -卡拉胶乙酰化方法的筛选[J]. *福州大学学报: 自然科学版*, 2006, 34(3): 424 - 429.
- [2] 方积年. 硫酸酯化多糖的研究进展[J]. *中国药学杂志*, 1993, 28(7): 393 - 396.
- [3] 周靓, 蒙义文. 多糖及其衍生物抗病毒作用研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 1997, 3(1): 82 - 90.
- [4] 辛现良, 丁华, 耿美玉, 等. 海洋硫酸多糖 911 抗艾滋病病毒作用及其机理研究[J]. *中国海洋药物*, 2000(6): 4 - 8.
- [5] Petitou M, Coudert C, Level M, *et al.* Selectively o - acylated glycosaminoglycan derivatives[J]. *Carbohydrate Research*, 1992, 236: 107 - 119.
- [6] 王乃兴, 李纪生. 有机合成中的相转移催化反应[J]. *化学世界*, 1994(9): 450 - 453.
- [7] Yamada T, Ogamo A, Saito T, *et al.* Preparation of O - acylated low-molecular-weight carrageenans with potent anti - HIV activity and low anticoagulant effect[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 41: 115 - 120.
- [8] 孔垂华, 徐效华. 有机物的分离和结构鉴定[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [9] 佚名. 凝胶色谱的讲义[EB/OL]. http://www.sepu.net/Article/2003-11-25/2046_3.shtml, 2003-11-25.
- [10] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [11] Pretsch E, Bühlmann P, Affolter C. 波谱数据表—有机化合物的结构解析[M]. 荣国斌译. 上海: 华东理工大学出版社, 2002.
- [12] Yamamoto I, Takayama K, Honma K, *et al.* Synthesis, structure and antiviral activity of cellulose and its branched derivatives[J]. *Carbohydr Polymers*, 1991, 14: 53 - 63.
- [13] Matsuzaki K, Yamamoto Z, Sato T, *et al.* Synthesis of water soluble branched polysaccharides and their antitumor activity[J]. *Makromol Chem*, 1985, 186: 449 - 456.
- [14] 王顺春, 方积年. 香菇多糖硫酸化衍生物的制备及其结构分析[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31(5): 594 - 597.