

## 论著

氯霉素驱动的  $\beta$ -半乳糖苷酶互补体系的构建

李黄金 陈伟 赵林 邱映丽 赖琼英 林冬霞 郭志云  
(广东药学院生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006)

**摘要:**目的 构建氯霉素驱动的  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -gal) 互补体系, 以期建立氯霉素残留检测用非竞争性均相酶互补免疫分析系统(OS-ECIA)。方法 从大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21 株分别克隆  $\beta$ -gal $\Delta\alpha$  和  $\Delta\omega$  基因, 采用重叠延伸 PCR 组装含抗氯霉素抗体可变区的互补肽融合蛋白, 在 T7 启动子驱动下于大肠杆菌宿主株中表达, 表达产物纯化与复性后进行酶互补活性分析。结果 成功克隆和高效表达融合肽基因  $V_{H-CAP}-\Delta\alpha$  和  $V_{L-CAP}-\Delta\omega$ , 表达产物为包涵体蛋白, 经纯化和复性后呈现特征性酶学互补活性, 且酶活性呈现氯霉素依赖性增加。结论 成功构建氯霉素驱动的  $\beta$ -gal 互补体系。

**关键词:** 氯霉素; 抗体可变区;  $\beta$ -半乳糖苷酶; 互补肽; 均相免疫分析

中图分类号: Q81 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2010)06-0481-05

Construction of Chloramphenicol-driven  $\beta$ -galactosidase Complementation

LI Huang-jin, CHEN Wei, ZHAO Lin, QIU Ying-li, LAI Qiong-ying, LIN Dong-xia, GUO Zhi-yun  
(College of Life Science and Biopharmaceuticals, Guangdong Pharmaceutical University,  
Guangdong Guangzhou 510006, China)

**Abstract: Objective** To establish a noncompetitive and homogeneous immunoassay for chloramphenicol based on the antigen-dependent reassociation of antibody variable fragment and  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) complementation (open sandwich enzymatic complementation immunoassay, OS-ECIA), chloramphenicol-driven complementation fragment of  $\beta$ -gal were constructed. **Method** Coding sequences of  $\Delta\alpha$  and  $\Delta\omega$  of  $\beta$ -gal were amplified from genomic DNA of *Escherichia coli* cell lines DH5 $\alpha$  and BL21, respectively, then fused to antibody variable region gene ( $V_{H-CAP}$  or  $V_{L-CAP}$ ) against chloramphenicol by a linker according to OS-ECIA model, and expressed under the control of promoter T7 in *E. coli*. Inclusion proteins were renatured after purification and analyzed for  $\beta$ -gal complementation activity. **Results**  $V_{H-CAP}-\Delta\alpha$  and  $V_{L-CAP}-\Delta\omega$  genes were cloned as designed. Both fusion peptides gene were over-expressed as inclusion proteins. Inclusion proteins were purified to a purity over 80%, then refolded by dilution method, and both refolded fusion proteins showed typical chloramphenicol-dependent complementation activity. **Conclusion** chloramphenicol-driven complementary system of  $\beta$ -gal were successfully constructed.

**Key words:** Chloramphenicol; Antibody Variable Region;  $\beta$ -Galactosidase; Complementation Fragment; Homogeneous Immunoassay

氯霉素是一种可引起人类再生障碍性贫血粒状白细胞缺乏症等严重疾病的抗生素<sup>[1]</sup>, 虽已被禁止使用, 但由于廉价高效, 目前仍被非法滥用于养殖业, 给人民生命健康和我国动物源性食品相关产品的出口贸易带来了较大的挑战。酶联免疫法(ELISA)是有害残留筛查的主要方法<sup>[2]</sup>, 但该方法需要耗时 2 h 以上, 用于大规模快速筛查时显得费时费力。另一方面, 兽药和农药类小分子半抗原

一般只有一个抗原表位, 因此只能采用灵敏度和线性范围较差的竞争性 ELISA 方法测定。Ueda 等<sup>[3,4]</sup>利用  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -gal) 的  $\Delta\alpha/\Delta\omega$  酶学互补特性和抗体可变区相互作用原理建立了一种“抗原驱动的非竞争性均相酶互补免疫分析(OS-ECIA)”系统(见图 1<sup>[5]</sup>)。由于该系统利用的  $\Delta\alpha/\Delta\omega$  酶互补活性远低于常用的  $\alpha/\Delta\alpha$  互补活性, 且属于非竞争性模式, 因此具有非常高的灵敏度, 同时因属于均相检测系统, 便于自动分析, 因此在食品有害残留的高通量快速筛查方面具有巨大的应用潜力。本文报道了氯霉素驱动的  $\beta$ -gal 互补体系的构建, 为建立氯霉素残留高通量与高灵敏度的检测方法打下了基础。

收稿日期: 2010-05-24

基金项目: 广东省科技计划项目(2007A020300007-8)

作者简介: 李黄金 男 博士 副教授 研究方向为基因工程药物与抗体 E-mail: lihuangjin@sohu.com

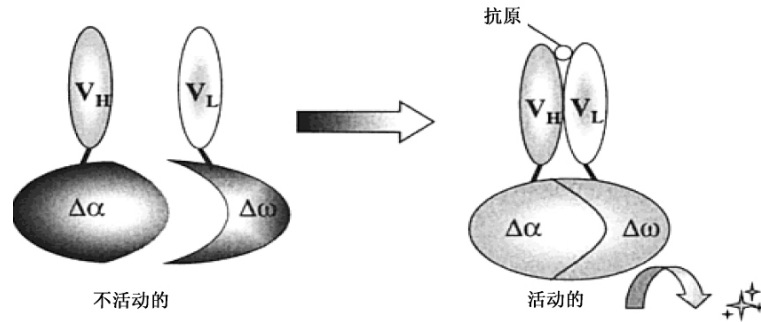


图1 抗原驱动的非竞争性均相酶互补免疫分析(OS-ECIA)系统<sup>[5]</sup>

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

含  $V_{H-CAP}$  (基因库 ID: FJ477893) 和  $V_{L-CAP}$  (基因库 ID: FJ477894) 基因的质粒、 $\beta$ -gal 的  $\alpha$  肽和  $\Delta\alpha$  肽由本室制备, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、大肠杆菌 BL21 (DE3) 和表达载体 pET21a 由本室保存, pMD18-T、Taq 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 长度标准品和蛋白质分子量标准品等均为大连宝生物工程有限公司产品, DNA 回收试剂盒购自百泰克生物技术有限公司, BCA 试剂盒为广州美津生物技术有限公司产品。

### 1.2 引物设计与合成

A:  $\Delta\alpha$  的上游引物, 5'-GCTGCTGGCGGTAGCG-GTGGTGGCGGTAGCATGACCATGATTACGGA-3', 下划线处为  $(Gly_4Ser_1)_2$  接头; B:  $\Delta\alpha$  的下游引物, 5'-AGCAAGCTTTTAATGATGATGATGATGATGATGTTTT-GACACCAGACCAACTGGTAATGGT-3', 下划线处为 Hind III 识别位点, 在终止密码子前引入 His<sub>6</sub> 标签序列; C:  $\Delta\omega$  的上游引物, 5'-GCTGCTGGCGGTAGCATGACCATGATTACGGATTCA-3', 下划线处为  $(Gly_4Ser_1)_1$  接头; D:  $\Delta\omega$  的下游引物, 5'-AGCAAGCTTTTAATGATGATGATGATGATGATGCACGGT-GAACTGATCGCGCA-3', 下划线处为 Hind III 识别位点; E:  $V_{H-CAP}$  上游引物, 5'-GAATCATATGCAGGTG-CAGCTGAAGGAGTC, 下划线处为 Nde I 识别位点; F:  $V_{H-CAP}$  下游引物, 5'-GCTACCGCCACCACCGCTAC-CGCCACCACCGGCTGAGGAGACGG-3', 下划线处为  $(Gly_4Ser_1)_2$  接头; G:  $V_{L-CAP}$  上游引物, 5'-GAAT-CATATGGATGTTTTGATGACCCA-3', 下划线处为 Nde I 识别位点; H:  $V_{L-CAP}$  下游引物, 5'-AATCATGGT-CATGCTACCGCCACCACCAGCCCGTTTGATTTCCAGCTTGTCCT-3', 下划线处为  $(Gly_4Ser_1)_1$  接头。所有引物均由上海英俊生物技术有限公司合成。

### 1.3 $\beta$ -gal $\Delta\alpha$ 和 $\Delta\omega$ 基因扩增与克隆

按常规方法制备大肠杆菌基因组 DNA, 以 DH5 $\alpha$  株来源 DNA 为模板, 用引物 A 和 B 扩增带柔性接头的  $\Delta\alpha$  基因, 以 BL21 株来源 DNA 为模板, 用引物 C 和 D 扩增带柔性接头的  $\Delta\omega$  基因。PCR 反应参数为 94 °C 5 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 3.5 min, 共 25 个循环, 72 °C 7 min。扩增产物用 PCR 产物回收试剂盒按厂家说明书纯化, 按厂家说明书克隆于 T 载体 pMD18-T。

### 1.4 $V_{H-CAP}\Delta\alpha$ 和 $V_{L-CAP}\Delta\omega$ 基因组装

以含  $V_{H-CAP}$  和  $V_{L-CAP}$  基因的质粒 DNA 为模板, 以引物 E 与 F 扩增  $V_{H-CAP}$  柔性接头, 以引物 G 与 H 扩增  $V_{L-CAP}$  柔性接头。扩增产物以 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳分离后用 DNA 回收试剂盒按照厂家说明书进行目的片段回收。回收片段经适当稀释后进行下述 2 步扩增反应: 第 1 步,  $V_{H-CAP}$  柔性接头和柔性接头  $\Delta\alpha$  或  $V_{L-CAP}$  柔性接头和柔性接头  $\Delta\omega$  进行重叠延伸, 反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 1 min, 72 °C 3.5 min, 共 5 个循环; 第 2 步, 以引物 B 和 E 或 D 和 G 进行常规 PCR 扩增, 反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 3.5 min, 共 25 个循环, 72 °C 7 min。扩增产物用 PCR 产物回收试剂盒按厂家说明书纯化。用 Nde I-Hind III 双酶切后按常规方法克隆于表达载体 pET21a 的相同位点。

### 1.5 基因表达诱导

工程菌接种于含 50  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基, 37 °C 振荡培养过夜, 按 1% (V/V) 比例转接新鲜 LB 培养基, 继续培养 2.5 h, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 进行表达诱导, 共诱导 4 h。6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。

### 1.6 包涵体蛋白分离纯化

经表达诱导所获菌体按 10% (W/V) 悬浮于含 500 mmol/L NaCl 的 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH = 7.5), 于冰浴中以 300 W 输出功率间歇式超声破碎 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min。所获沉淀分别用含 2% (V/V) Triton X100、500 mmol/L NaCl 和不同浓

度尿素的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH = 8.0) 洗涤。经纯化的包涵体蛋白按湿重的 1% (W/V) 悬浮于含 8 mol/L 尿素和 1% (V/V)  $\beta$ -巯基乙醇的 500 mmol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH = 8.0) 37 °C 水浴 3 h, 12 000 r/min 离心 10 min, 所获上清过经上述裂解缓冲液平衡的 HitrapHis 柱, 以含 300 mmol/L 咪唑的裂解缓冲液洗脱目的蛋白。所获变性蛋白以含 10% (W/V) 甘油、0.5 mmol/L 氧化型谷胱甘肽和 5 mol/L 还原型谷胱甘肽的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH = 8.0) 进行稀释复性。

### 1.7 蛋白质 SDS-PAGE 与凝胶扫描分析

按照常规方法进行各种样品的 SDS-PAGE, 分离胶浓度为 12% (W/V)。菌体培养物或纯化过程中的蛋白样品以 2 倍上样缓冲液煮沸 5 min, 12 000 r/min 离心后取上清电泳。电泳所获凝胶以“天能牌”凝胶密度扫描仪按厂家说明书进行拍照和表达水平或蛋白质纯度分析。

### 1.8 蛋白质浓度测定

采用 BCA 试剂盒按厂家说明书进行, 以小牛血清白蛋白为标准品。

### 1.9 $\beta$ -gal 酶活性测定

参照 Henderson 等<sup>[6]</sup>报道的方法进行。向 96 孔板每孔加入 100  $\mu$ l 含 1.25 mg/ml 邻硝基苯基-D-半乳糖吡喃糖苷 (ONPG) 的 PM 缓冲液 (1 mmol/L  $MgSO_4$ 、0.05% 吐温-20 的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH = 7.6), 加入氯霉素特异性互补肽至终浓度 0.1  $\mu$ g/ml, 分别加入终浓度为 0、0.1、1.0  $\mu$ g/ml 氯霉素, 37 °C 保温, 分别保温至 20、40、60、80、100、120、140、160 min 后加入 50  $\mu$ l 0.5 mol/L 碳酸钠以终止反应, 待全部反应终止后以酶标仪测定  $OD_{410}$ 。每个处理共设 3 个重复, 同时以  $\alpha/\Delta\alpha$  互补肽为阳性对照, 以单一的氯霉素特异性互补肽为阴性对照。

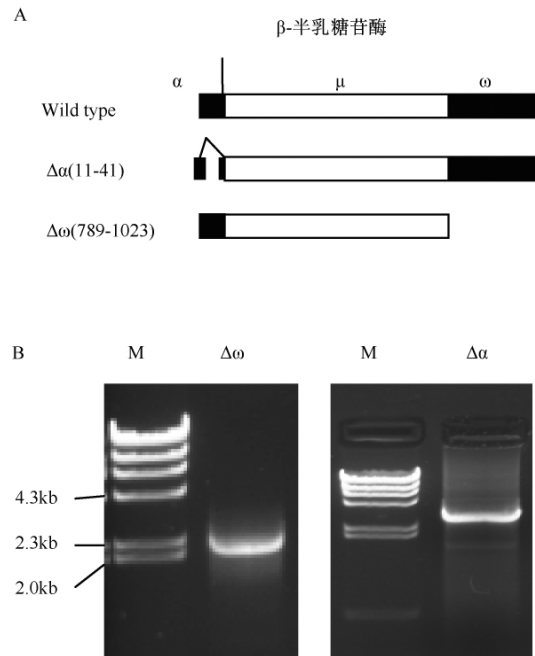
## 2 结果与分析

### 2.1 $\beta$ -gal $\Delta\alpha$ 和 $\Delta\omega$ 基因克隆

$\beta$ -gal 的  $\Delta\alpha$  和  $\Delta\omega$  互补片段区见图 2A。以大肠杆菌的  $\Delta\alpha$  突变株 DH5 $\alpha$  和含野生型  $\beta$ -gal 的 BL21 的基因组 DNA 为模板, 分别扩增  $\Delta\alpha$  和  $\Delta\omega$  编码序列, 各得到 3.0 kb 和 2.3 kb 大小的扩增片段, 所获片段与理论大小一致 (见图 2B)。PCR 产物克隆于 T 载体 pMD18-T 后进行 DNA 序列分析, 结果表明扩增产物即为  $\beta$ -半乳糖苷酶的  $\Delta\alpha$  和  $\Delta\omega$  片段。

### 2.2 氯霉素特异性互补肽基因组装与克隆

设计的氯霉素特异性  $\beta$ -gal 互补肽由抗氯霉素抗体可变区、弹性接头和互补肽组成, 结构形式为  $V_{H-CAP}-(Gly_4Ser)_2-\Delta\alpha$  和  $V_{L-CAP}-(Gly_4Ser)_1-\Delta\omega$ 。融

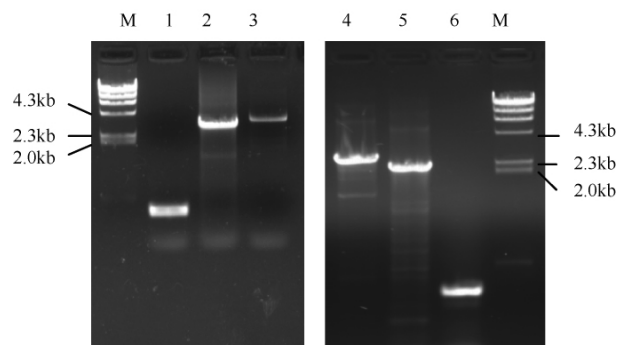


A.  $\beta$ -半乳糖苷酶互补区示意图; B. PCR 扩增产物  
图 2 大肠杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶  $\Delta\alpha$  和  $\Delta\omega$  编码序列 PCR 扩增

合肽 C 端均引入 His6 标签, 以便于利用 Ni 柱进行亲和层析纯化。以重叠延伸 PCR 组装融合肽基因得到大小约为 3.4 kb 的  $V_{H-CAP} \Delta\alpha$  和 2.7 kb 的  $V_{L-CAP} \Delta\omega$  组装产物, 与理论大小相符 (见图 3)。组装产物克隆于表达载体 pET21a 后进行序列分析, 结果表明克隆的融合肽基因与设计序列一致。

### 2.3 氯霉素特异性互补肽基因表达与产物纯化

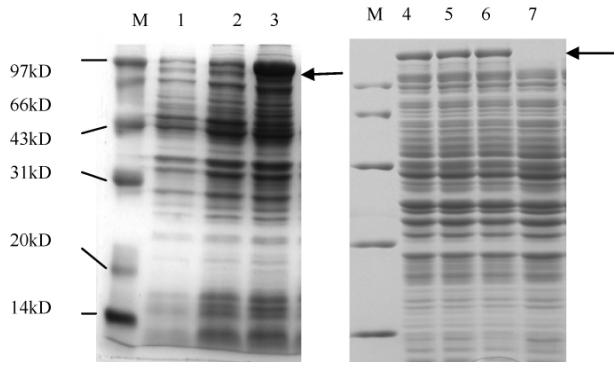
$V_{L-CAP} \Delta\omega$  和  $V_{H-CAP} \Delta\alpha$  融合肽工程菌表达诱导 SDS-PAGE 分析结果见图 4, 二者分别在 97 kD 和约 120 kD 处出现特征性表达诱导产物, 产物大小与融合肽的理论大小相符。凝胶密度扫描分析结果表明, 二者表达水平分别达到 45% 和 20%。



注: M, DNA 长度标准; 1,  $V_{H-CAP}-(Gly_4Ser)_2$ ; 2,  $(Gly_4Ser)_2-\Delta\alpha$ ; 3,  $V_{H-CAP}-(Gly_4Ser)_2-\Delta\alpha$ ; 4,  $V_{L-CAP}-(Gly_4Ser)_1-\Delta\omega$ ; 5,  $(Gly_4Ser)_1-\Delta\omega$ ; 6,  $V_{L-CAP}-(Gly_4Ser)_1$ 。

图 3 重叠延伸 PCR 组装  $V_{H-CAP} \Delta\alpha$  和  $V_{L-CAP} \Delta\omega$

融合肽表达产物分离纯化结果见图 5。2 个融



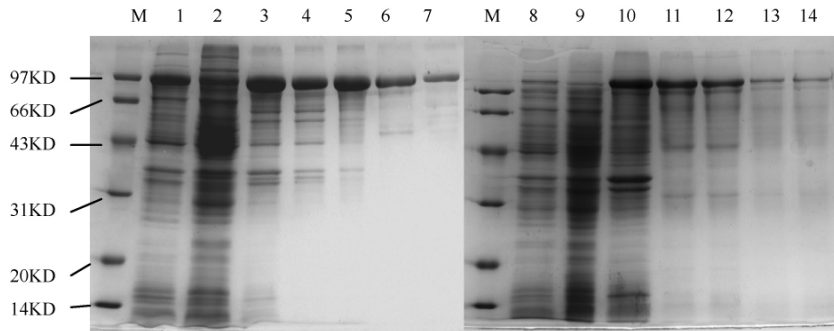
注:M,蛋白质分子量标准;1,宿主细胞;2,未诱导的 pET21a- $V_{L-CAP}\Delta\omega$  工程菌;3,诱导的 pET21a- $V_{L-CAP}\Delta\omega$  工程菌;4-6,诱导的 pET21a- $V_{H-CAP}\Delta\alpha$  工程菌;7,未诱导的 pET21a- $V_{H-CAP}\Delta\alpha$  工程菌。

图4  $V_{H-CAP}\Delta\alpha$  和  $V_{L-CAP}\Delta\omega$  融合肽基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达

合肽的表达产物主要存在于破菌后的沉淀中,表明是以包涵体蛋白形式存在。包涵体经洗涤、裂解后以 Ni 柱进行亲和层析纯化, $V_{L-CAP}\Delta\omega$  和  $V_{H-CAP}\Delta\alpha$  的纯度分别达到 90% 和 80% 以上。

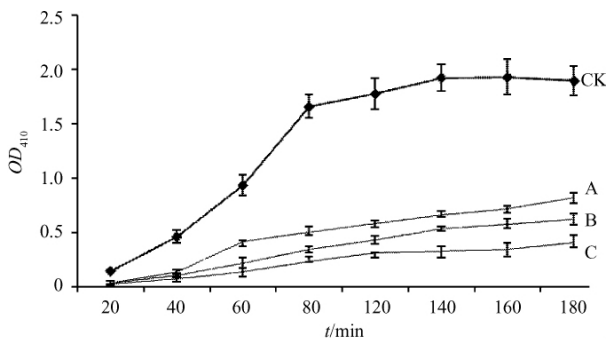
2.4  $\beta$ -gal 酶互补活性分析

以 ONPG 为底物的  $\beta$ -gal 酶互补活性测定结果见图 6。 $V_{L-CAP}\Delta\omega/V_{H-CAP}\Delta\alpha$  融合肽组成的互补体系  $OD_{410}$  绝对值和单位时间内的增量均远低于  $\alpha/\Delta\alpha$  体系的,且在观察的 180 min 反应时间内  $OD_{410}$  增长曲线未见平台期,而后者在反应 80 min 内即达到最大值,表明前者的酶学互补活性远低于后者的。当向  $V_{L-CAP}\Delta\omega/V_{H-CAP}\Delta\alpha$  反应体系加入终浓度为 0.1  $\mu\text{g/ml}$  和 1.0  $\mu\text{g/ml}$  的氯霉素时, $\beta$ -gal 酶活性表现出氯霉素剂量依赖性增加,但二者的酶活性仍远低于  $\alpha/\Delta\alpha$  体系的。



注:M,蛋白质分子量标准;1-7,  $V_{L-CAP}\Delta\omega$ ; 8-14,  $V_{H-CAP}\Delta\alpha$ ; 1和8,总蛋白;2和9,超声破碎上清;3和10,超声破碎沉淀;4和11,纯化的包涵体蛋白;5和12,变性蛋白;6和13, Ni 柱纯化变性蛋白;7和14,复性蛋白。

图5  $V_{H-CAP}\Delta\alpha$  和  $V_{L-CAP}\Delta\omega$  融合肽基因表达产物分离纯化



注:CK,  $\alpha/\Delta\alpha$ ; A,  $V_{L-CAP}\Delta\omega/V_{H-CAP}\Delta\alpha + 1.0 \mu\text{g/ml}$ ; B,  $V_{L-CAP}\Delta\omega/V_{H-CAP}\Delta\alpha + 0.1 \mu\text{g/ml}$ ; C,  $V_{L-CAP}\Delta\omega/V_{H-CAP}\Delta\alpha + 0 \mu\text{g/ml}$ 。

图6  $\beta$ -半乳糖苷酶互补活性分析

3 讨论

基于  $\beta$ -gal 的  $\alpha/\Delta\alpha$  互补的克隆酶均相免疫分析 (CEDIA) 系统是一种高通量的临床生化分析手

段<sup>[5,7]</sup>,但由于该系统的设计仍是基于竞争性作用模式,所以灵敏度不高,达不到食品残留检测的检测限要求。OS-ECIA 系统利用了抗原对轻、重链抗体可变区“桥接”和“稳定化”作用,是一种非竞争性的开放式三文治作用模式,因此比 CEIA 系统拥有更高的灵敏度和线性范围。成功建立特定待检物(抗原)的 OS-ECIA 系统的关键是构建抗原驱动的  $\beta$ -gal 互补肽,而该互补肽必须满足 2 个关键条件,其一是酶学互补活性必须非常低,以便降低背景活性;其二是互补活性必须呈现抗原依赖,即在一定浓度范围内,酶活性随抗原浓度的增加而增加。 $\Delta\alpha/\Delta\omega$  互补是一对低互补活性的互补片段,Rossi 等<sup>[8,9]</sup>曾通过重组技术构建过不同长度和类型的  $\Delta\alpha/\Delta\omega$  互补片段,且均表现了较低的互补活性,本研究选取最为常用的  $\Delta\alpha(11-41)$  和  $\Delta\omega(789-1023)$  片段,并以优化的模式结构构建  $V_{H-CAP}-(\text{Gly}_4\text{Ser})_2-\Delta\alpha$  和  $V_{L-CAP}-(\text{Gly}_4\text{Ser})_1-\Delta\omega$  形式融合蛋白,所制备的 2 种融合肽

拥有  $\beta$ -gal 互补活性,且互补活性远低于  $\alpha/\Delta\alpha$  互补的,因此可满足 OS-ECIA 系统对互补片段的要求。Ueda 等<sup>[10]</sup>的研究结果表明,尽管机制尚未明,但可以肯定的是并非所有抗原的抗体可变区均会呈现抗原驱动的“稳定化”现象,也就是说并非所有抗原的抗体可变区均适合于构建 OS-ECIA 所需要的抗原特异性互补肽。本研究所构建的  $V_{H-CAP}\Delta\alpha$  和  $V_{L-CAP}\Delta\omega$  片段初步呈现了氯霉素剂量依赖的酶学互补活性的增加,基本具备 OS-ECIA 系统所需抗原特异性互补肽的酶学特性。

OS-ECIA 系统属于均相酶免疫分析系统,没有繁复的操作步骤,因此比 ELISA 快速得多。OS-ECIA 检测速度在理论上主要依赖于  $\Delta\alpha/\Delta\omega$  片段建立酶学互补的速度。有研究表明, $\alpha/\Delta\alpha$  片段建立互补的速度为 15~20 min<sup>[5]</sup>。在本研究中, $V_{H-CAP}\Delta\alpha$  和  $V_{L-CAP}\Delta\omega$  片段互补活性形成明显慢于  $\alpha/\Delta\alpha$  的,在所观察的 180 min 内未见  $OD_{410}$  增长曲线平台期的出现。导致这一现象的可能原因是作为  $\beta$ -gal 活性测定最常用的底物 ONPG 并不适合作为  $\Delta\alpha/\Delta\omega$  互补活性测定的底物。Ueda 等<sup>[4]</sup>在优化  $\Delta\alpha/\Delta\omega$  互补活性测定系统的研究中发现,采用 ONPG 为底物时需要保温 8 h 才能观察到最大酶学活性,而采用 Galacton-Plus substrate (加拿大 Applied Biosystems 公司产品)作底物时,仅需保温 40 min,极大地缩短了分析所需时间。

本研究成功构建了氯霉素驱动的  $\beta$ -gal 互补系统,为进一步构建氯霉素的 OS-ECIA 系统打下了坚实的基础。

## 参考文献

- [1] 袁耀辉,李锋,柴春彦,等. 动物性食品中氯霉素残留检测技术进展[J]. 上海畜牧兽医通讯,2008(6):5-7.
- [2] 周宏琛,闫秋成,田晓林,等. 动物源性食品安全快速检测与酶联免疫吸附方法的应用[J]. 肉品卫生,2005,25(11):29-32.
- [3] UEDA H, TSUMOTO K, KUBOTA K, et al. Open sandwich ELISA: A novel immunoassay based on the interchain interaction of antibody variable region[J]. Nat Biotechnol,1996,14:1714-1718.
- [4] UEDA H. Open sandwich immunoassay: a novel immunoassay approach based on the interchain interaction of antibody variable region[J]. J Biosci Bioengin,2002,94(6):6614-6619.
- [5] YOKOZEK T, UEDA H, ARAI R, et al. A homogeneous noncompetitive immunoassay for the detection of small haptens[J]. Anal Chem,2002,74(11):2500-2504.
- [6] HENDERSON D R, FRIEDMAN S B, HARRIS J D, et al. CEDIA, a new homogeneous immunossay system[J]. Clin Chem,1986,32(9):1637-1641.
- [7] JEON S I, YANG X Y, JOSEPH D, et al. Modeling of homogeneous cloned enzyme donor immunoassay[J]. Analyt Biochem,2004,333:136-149.
- [8] ROSSI F M, CHARLTON C A, BLAU H M, et al. Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94:8405-8410.
- [9] ROSSI F M, BLAKELY B T, CHARLTON C A, et al. Monitoring protein-protein interactions in live mammalian cells by beta-galactosidase complementation[J]. Methods Enzymol,2000,328:231-251.
- [10] UEDA H, YOKOZEKI T, ARAI R, et al. An optimized homogeneous noncompetitive immunoassay based on the antigen-driven enzymatic complementation[J]. J Immunol Methods,2003,279:209-218.

## 法规文件

### 卫生部关于印发《进口无食品安全国家标准食品许可管理规定》的通知

各省、自治区、直辖市卫生厅局,新疆生产建设兵团卫生局,中国疾病预防控制中心、卫生部卫生监督中心:

为贯彻《食品安全法》及其实施条例,规范进口无食品安全国家标准食品许可工作,我部组织制定了《进口无食品安全国家标准食品许可管理规定》。现印发给你们,请遵照执行。

二〇一〇年八月九日

附件:卫生部关于印发《进口无食品安全国家标准食品许可管理规定》的通知(略)。