

不同月龄牦牛睾丸中LYZL4、LYZL6的 基因表达及蛋白质定位

李忠邦^{1,2}, 阎萍²

(1. 西北民族大学 生命科学与工程学院,甘肃 兰州 730030; 2. 中国农业科学院
兰州畜牧与兽药研究所/甘肃省牦牛繁育工程重点实验室,甘肃 兰州 730050)

摘要:为探讨人源类溶菌酶蛋白4(Human lysozyme-like protein 4,LYZL4)和人源类溶菌酶蛋白6(Human lysozyme-like protein 6,LYZL6)在牦牛睾丸中的表达机制,分别选取6、18、30、72月龄健康的牦牛12头(每组3头)采集睾丸组织。应用qRT-PCR、Western-blot和免疫组化技术分别分析了LYZL4和LYZL6在不同月龄牦牛睾丸中的表达和定位。结果显示,在不同月龄牦牛睾丸中均检测到LYZL4、LYZL6基因和相关蛋白质的表达,其基因表达量随着牦牛月龄增加呈现上升趋势。72、30月龄牦牛睾丸中LYZL4、LYZL6基因及蛋白质的表达量极显著高于6月龄和18月龄牦牛($P<0.01$)。LYZL4蛋白在6月龄牦牛睾丸中定位于间质细胞内,在18月龄牦牛睾丸中主要定位于精原细胞和支持细胞内,在30、72月龄牦牛睾丸中定位于圆形精子细胞内。而LYZL6蛋白在6月龄牦牛的睾丸中定位于间质细胞内,在18月龄牦牛睾丸中主要定位于精原细胞内,在30、72月龄牦牛睾丸中定位于圆形精子细胞和初级精母细胞内。LYZL4和LYZL6基因主要在牦牛性成熟后高丰度表达,而在性成熟前相对低丰度表达。因此,在牦牛雄性生殖系统的发育过程以及在精子发生的调控过程中LYZL4和LYZL6均发挥着重要的作用。

关键词:人源类溶菌酶蛋白4;人源类溶菌酶蛋白6;牦牛;睾丸;表达;定位

中图分类号:S823.8⁺5 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2019)07-0116-06

Gene Expression and Protein Localization of LYZL4 and LYZL6 in Testes of Different Months Old Yak

LI Zhongbang^{1,2}, YAN Ping²

(1. College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China;
2. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Gansu Key
Laboratory for Yak Breeding Engineering, Lanzhou 730050, China)

Abstract: In order to investigate the expression mechanism of human lysozyme-like protein (LYZL4) and human lysozyme-like protein (LYZL6) in yak testis, twelve yak testis tissues were collected at 6, 18, 30, 72 months old stages (3 replicates each). The expression and localization of LYZL4 and LYZL6 in testis of different months old yak were analyzed by qRT-PCR, Western-blot and immunohistochemistry. The results showed that the expression of LYZL4,LYZL6 genes and related proteins was detected in the testes of different months old yak, and the expression level of genes were increased with the growth of the yak age. The expression levels of LYZL4 and LYZL6 genes and proteins in the testes of 72,30 months old yak were significantly higher than those of 6 months old and 18 months old yaks ($P<0.01$). The immunohisto-

收稿日期:2019-01-03
基金项目:中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2014-LIHPS-01);现代肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-37)
作者简介:李忠邦(1994-),男,青海海东人,在读硕士研究生,研究方向:动物遗传育种与繁殖。
E-mail:1436338653@qq.com
通信作者:阎萍(1963-),女,山西运城人,研究员,博士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:pinyanz@163.com

chemical staining revealed that immunoreactivity of LYZL4 protein was localized at Leydig cells in 6 months old yak testis tissues, it was mainly located at spermatogonia and sertoli cells in 18 months old yak testis, and it was mainly localized at spermatids in 30, 72 months old yak testis tissues. The positive expression of LYZL6 protein in 6 months old yak testis tissue was localized at Leydig cells, it was mainly localized at spermatogonia in 18 months old yak testis, and it was localized at spermatids and primary spermatocytes in 30, 72 months old yak testis tissues. And we found that *LYZL4* and *LYZL6* genes reached high abundance expression after yak sexual maturity and relatively low abundance before sexual maturity. Therefore, *LYZL4* and *LYZL6* play an important role in the development of male reproductive system and regulation of spermatogenesis of yaks.

Key words: LYZL4; LYZL6; Yak; Testis; Expression; Localization

哺乳动物的精子发生过程由多个因素同时调控,而遗传因素在其中起着决定性作用。许多与精子发生相关的基因,包括睾丸特异性基因和睾丸高表达基因的突变、缺失、功能异常最终都会导致雄性不育^[1]。SCHLECHT等^[2]利用基因芯片技术发现,约200个基因在大鼠生殖细胞的发育中起着调节作用。国外研究者于20世纪30年代发现了一种特别的杀菌剂——溶菌酶,基于其物理和功能特性,已经鉴定出多种溶菌酶,它们主要分为6个家族:g型(鹅型)、c型(鸡型)、无脊椎动物型(i型)、噬菌体型、细菌型和植物型^[3]。其中,c型(鸡型)溶菌酶存在于多个物种的雄性生殖道内以及不同器官组织中。c型溶菌酶是N-乙酰葡萄糖胺结合蛋白,包括2种类型,即非钙结合c-溶菌酶和钙结合c-溶菌酶^[4]。人溶菌酶(Human lysozyme, LYZ)属于c型溶菌酶家族,c型溶菌酶家族还包括其他5种人源类溶菌酶蛋白(Human lysozyme-like protein, LYZL)^[5]。初步研究表明,LYZL主要存在于雄性生殖系统,定位于睾丸、附睾和精子上^[6-7]。目前,已经从人类的雄性生殖道中克隆出编码4种c型LYZL的基因(*LYZL2*、*LYZL4*、*LYZL6*和*SPACA3*)。其中,*LYZL4*基因能够在人类精子的后顶体区域高度富集,也能够小鼠的睾丸、附睾和精子中表达。小鼠的LYZL4及其特异性抗体的免疫中和作用显著降低了小鼠体外受精的比例,并呈剂量依赖性^[8]。此外,有研究发现,rLYZL6蛋白能够在生理pH条件下对革兰氏阳性细菌显示出弱的溶菌活性^[9],而LYZL6能够定位于成熟精子的顶体后区和中段之前^[10]。由于LYZL6也是c型溶菌酶家族的成员,为了了解其是否表现出对糖基键的溶菌活性,在菌落形成中通过测试重组LYZL6蛋白杀死菌株*S. au* ATCC25923的能力,进一步明确了它的溶菌活性,而这种活性可能是由于LYZL6中存在2个保守

的必需催化残基35-Glu和52-Asp^[3]。

牦牛是生活于高寒、高海拔地区的特有牛种,是我国及世界珍稀的物种资源,但其具有繁殖能力低的劣势。因此,了解牦牛在发育过程中的生殖调控,对保护这一珍贵的物种资源具有重要意义。本研究选取性成熟前6月龄和18月龄、性成熟早期30月龄以及性成熟后72月龄4个不同时期的牦牛,通过对其LYZL4和LYZL6的基因及蛋白质表达机制进行研究,了解LYZL4和LYZL6在牦牛睾丸发育和精子发生中的调控机制,旨在为牦牛繁殖性能研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 荧光定量试验主要仪器与试剂 Trizol Reagent 购自 Invitrogen(美国)公司,SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒、Prime Script[™] RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)反转录试剂盒均购自 TaKaRa(大连)公司,其他无特殊说明的试剂均为国产分析纯;荧光定量PCR仪、电泳仪、琼脂糖凝胶成像系统均购自美国 Biodine Rad 公司。

1.1.2 Western-blot 和免疫组织化学试验主要试剂 全蛋白提取试剂盒购自北京 Solarbio 公司;BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、ECL Plus 超敏化学发光液均购自苏州新赛美生物科技有限公司;生物素化二抗 Goat Anti-rabbit IgG/HRP、一抗均购于Bioss生物公司;柠檬酸盐缓冲液(0.01 mol/L、pH 值 6.0)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;山羊血清购自北京中山金桥生物有限公司;DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒购自碧云天生物技术公司。

1.2 牦牛睾丸组织样本采集

选取健康状况良好的6、18、30、72月龄牦牛公畜各3头。每组牦牛个体营养状况相同、体质量相

似。牦牛经过放血致死后,取一部分睾丸组织装入冻存管投入液氮带回,分样后置于-80℃保存,剩余部分组织样品装入含有4%多聚甲醛的离心管中进行固定。

1.3 试验方法

1.3.1 牦牛睾丸组织总 RNA 的提取和反转录 常规 Trizol 法提取牦牛睾丸组织样品的总 RNA,应用核酸分析仪检测总 RNA 质量浓度以及 OD 值,模板 RNA 选用 OD 值在 1.8~2.0 的总 RNA,按照 Prime Script™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒说明书,合成 cDNA,以 GAPDH 基因的特异性引物检测合成的 cDNA。

1.3.2 引物设计及合成 根据 NCBI 已报道的 LYZL4 基因(登录号:NM_001077959.1)、LYZL6 基因(登录号:NM_001046466.1)和 GAPDH 基因(登录号:NM_001034034.2)序列,使用 Primer 5.0 分别设计引物,然后由 NCBI 中的 BLAST 检测引物特异性。设计的引物由西安擎科生物工程有限公司合成。引物序列信息见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列信息
Tab.1 qRT-PCR primer sequence information

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物长度/bp Product length
LYZL4	F: ACCCTATGGCTGTCTATGAA R: TGGATTCACTAAAGCAGAGC	131
LYZL6	F: GTGCCTGGCTTTCGTAGAGA R: CGTGCGACTCTGGTAATCGT	127
GAPDH	F: GGGGAAAAGCGGACTTAGGA R: TGGTTCACGCCATCACA	143

1.3.3 qRT-PCR 检测牦牛睾丸组织 LYZL4、LYZL6 基因的表达 按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒建议的 qRT-PCR 反应体系,以 GAPDH 基因作为内参进行 qRT-PCR 反应,每个样本进行 3 次重复,用 2^{-ΔΔCt}法对定量结果进行分析。

1.3.4 Western-blot 检测牦牛睾丸组织 LYZL4、LYZL6 蛋白的表达 根据全蛋白提取试剂盒所提供的步骤提取牦牛睾丸组织样品的全蛋白,利用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒检测全蛋白浓度。然后在得到的全蛋白样品中加入上样缓冲液,置于沸水中使蛋白质变性后,上样并进行电泳,结束电泳后转膜并封闭,分别加入一抗和二抗后于 4℃ 孵育过夜。最后加入适量配制好的 ECL Plus 超敏化学发光液,在暗室中依次经显影、水洗、定影进行胶片曝光。结果使用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件扫

描测定。

1.3.5 牦牛睾丸组织免疫组织化学染色 固定的牦牛睾丸组织经全自动脱水机脱水后,进行包埋与切片,然后将脱蜡后的切片放入染色缸,浸入 0.01 mol/L 的柠檬酸盐缓冲液(pH 值 6.0)进行抗原修复,滴加山羊血清封闭液,然后再滴加一抗和生物素化二抗 Goat Anti-rabbit IgG/HRP 进行孵育,使用 DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒进行显色,最后使用苏木素进行轻度复染,经脱水、透明后,使用中性树胶封片。采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件测定所采集全部图像的光密度和面积。

1.4 数据分析

应用 SPSS 17.0 统计分析软件对平均数进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 不同月龄牦牛睾丸组织中 LYZL4、LYZL6 基因的表达

以 GAPDH 为内参基因,通过 qRT-PCR 对不同月龄牦牛睾丸组织中 LYZL4 和 LYZL6 基因的表达进行校正之后,结果如图 1 所示,LYZL4 和 LYZL6 基因在 72 月龄牦牛睾丸组织中的表达量最高,在 6 月龄牦牛睾丸组织中的表达量最低;72 月龄牦牛睾丸组织中的 LYZL4 和 LYZL6 基因表达量与 6、18、30 月龄存在极显著差异($P<0.01$),30 月龄牦牛睾丸组织中的 LYZL4 和 LYZL6 基因表达量与 6、18 月龄存在极显著差异($P<0.01$),18 月龄牦牛睾丸组织中的 LYZL4 和 LYZL6 基因表达量与 6 月龄也存在极显著差异($P<0.01$)。

2.2 不同月龄牦牛睾丸组织中 LYZL4、LYZL6 蛋白的表达

如图 2 所示,在不同月龄牦牛睾丸组织中 LYZL4 蛋白均有表达。其中,6、18 月龄牦牛睾丸组织中 LYZL4 蛋白的表达量偏低,而 30、72 月龄牦牛睾丸组织中 LYZL4 蛋白的表达量明显上调,与 6、18 月龄牦牛相比差异极显著($P<0.01$)。牦牛睾丸组织中 LYZL6 蛋白表达量检测结果如图 3 所示,LYZL6 蛋白在 6、18 月龄牦牛睾丸组织中的表达量较低,而在 30、72 月龄牦牛睾丸组织中的表达量极显著上调($P<0.01$)。此外,除 LYZL6 蛋白在 18 月龄牦牛睾丸组织中的表达量与 6 月龄相比呈下降趋势外,不同月龄牦牛睾丸组织中 LYZL6 蛋白的表达趋势与其 mRNA 的表达趋势相似。

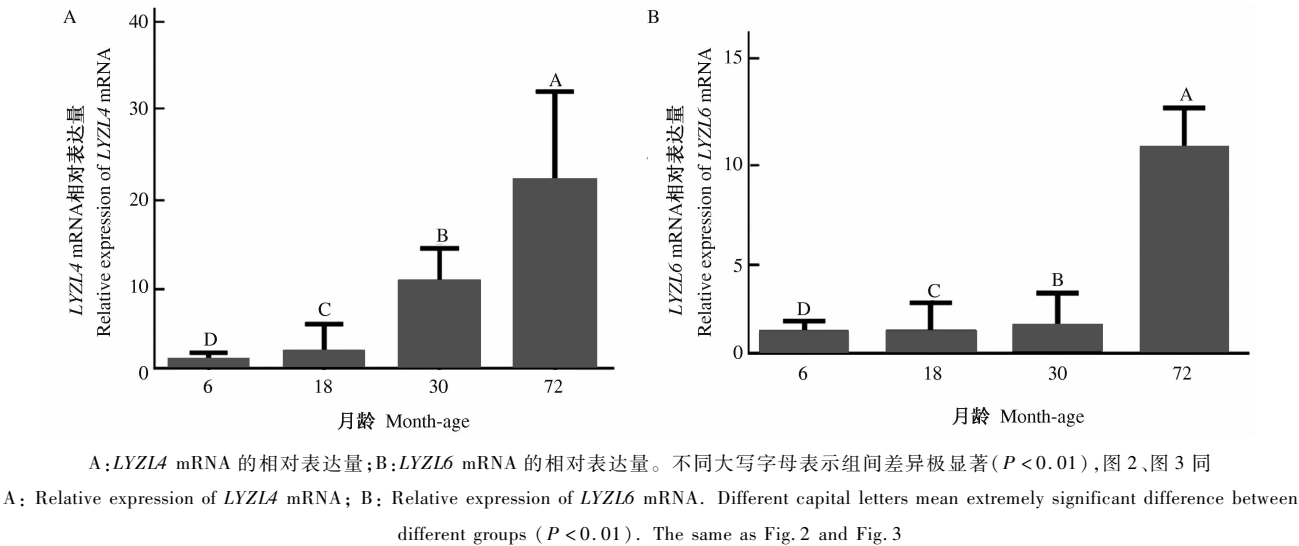


图 1 不同月龄牦牛睾丸组织中 LYZL4、LYZL6 mRNA 的相对表达量

Fig. 1 Relative expression of LYZL4 and LYZL6 mRNA in testis of different months old yak

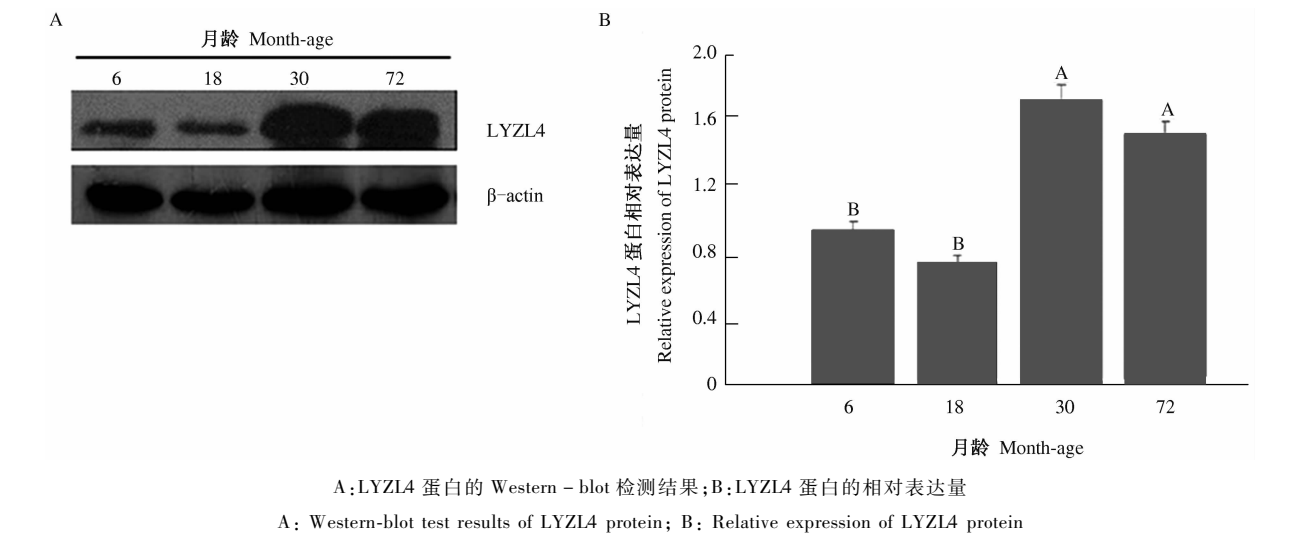


图 2 不同月龄牦牛睾丸组织中 LYZL4 蛋白的相对表达量

Fig. 2 Relative expression of LYZL4 protein in testis of different months old yak

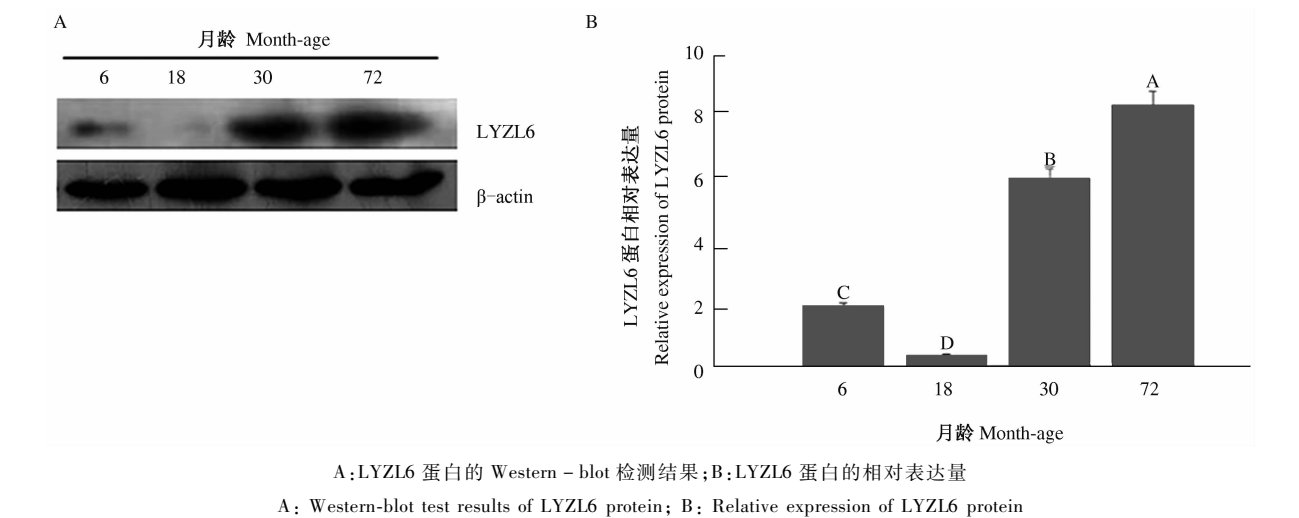


图 3 不同月龄牦牛睾丸组织中 LYZL6 蛋白的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of LYZL6 protein in testis of different months old yak

2.3 不同月龄牦牛睾丸组织中 LYZL4、LYZL6 蛋白的定位

经免疫组织化学染色后发现,LYZL4 蛋白在 6 月龄牦牛睾丸组织中定位于间质细胞内(图 4A),在 18 月龄牦牛的睾丸组织中主要定位于精原细胞和支持细胞内(图 4B),在 30、72 月龄的牦牛睾丸组织中定位于圆形精子细胞(图 4C 和 4D);从 LYZL4 蛋白积分光密度值结果可以看出,18、30、72 月龄的牦牛睾丸组织中 LYZL4 蛋白的免疫阳性信号强度显著高于 6 月龄($P<0.05$),而 18、30、72 月龄牦牛睾丸组织中的 LYZL4 蛋白之间免疫阳性信号强度无明显差异($P>0.05$)(图 4E)。LYZL6 蛋白在 6 月龄的牦牛睾丸组织中定位于间质细胞内(图 5A),在 18 月龄的牦牛睾丸组织中主要定位于精原细胞(图 5B),在 30、72 月龄的牦牛睾丸组织中定位于圆形精子细胞和初级精母细胞(图 5C 和 5D);从 LYZL6 蛋白积分光密度值结果可以看出,6 月龄的牦牛睾丸组织中 LYZL6 蛋白免疫阳性信号强度显著低于 18、30、72 月龄($P<0.05$),但是在 18、30、72 月龄牦牛睾丸组织中的 LYZL6 蛋白之间免疫阳性信号强度无显著差异($P>0.05$)(图 5E)。

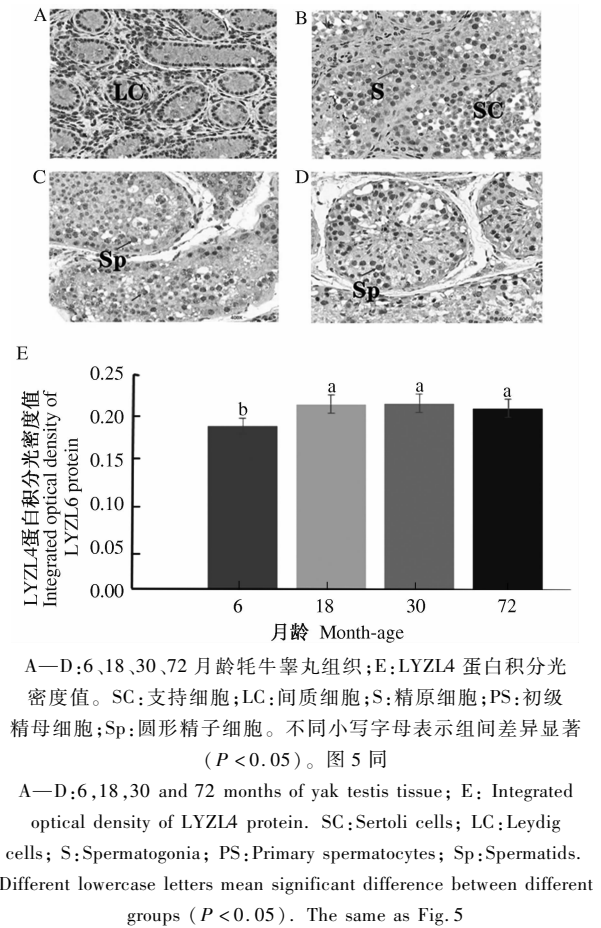


图 4 不同月龄牦牛睾丸组织中 LYZL4 蛋白的免疫组织化学染色 (400 ×)

Fig. 4 Immunohistochemical staining of LYZL4 protein in testis of different months old yak (400 ×)

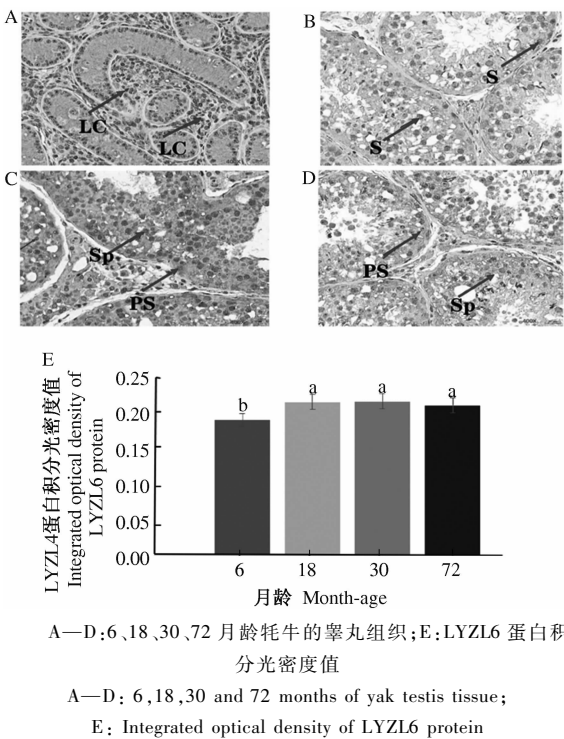


图 5 不同月龄牦牛睾丸组织中 LYZL6 蛋白的免疫组织化学染色 (400 ×)

Fig. 5 Immunohistochemical staining of LYZL6 protein in testis of different months old yak (400 ×)

3 结论与讨论

精液质量是衡量动物受精能力的重要指标,它能够直接影响雌性动物的受孕率。因此,提高动物的精液品质能够进一步优化动物的繁殖性能^[11]。精子发生是一个高度复杂的过程,包括生殖细胞分化的 3 个主要连续阶段:精原细胞的有丝分裂增殖、精母细胞的减数分裂和精子细胞的变态过程^[12]。在哺乳动物中,生精细胞向精子的分化过程涉及与外在因素和内在因素相关的调节基因的顺序表达^[13]。在精子发生的任何阶段发生失调,都可能最终导致不育的发生^[14-16]。近年来,随着现代生物技术的发展,在动物睾丸中对精子发生的调控机制及其相关基因和蛋白质分子水平上的探索,受到越来越多的关注^[17]。LYZL 属于 c 型溶菌酶类,但在包括大鼠在内的许多物种中关于 LYZL 的研究并不多。LYZL4 基因能够编码 1 条包含 146 个氨基酸残基的肽链,成熟分子的分子质量约 14 500 u,分子中存在 8 个保守的半胱氨酸残基^[18]。黄鹏等^[19]通过原核表达的 rLYZL4 制备出该蛋白质的多克隆抗体,确认了其在睾丸和附睾中表达,并且发现其定位于圆形精子细胞及长形精子细胞的顶体上。据报道,人类精子类溶菌酶蛋白 1 (SLLP1) 和 小鼠 LYZL4 有助于受精,但它们没有表现出溶菌活性^[9]。黄鹏等^[20]研究证实,鹅型溶菌酶 2 (LysG2) 主要在睾丸

的支持细胞中表达并被分泌到精浆中,表明 LysG2 可能在雄性生殖道的先天免疫中起作用,此外,还首次报道了 LYZL6 是一种具有酸性和溶菌性的人类精子相关蛋白质,并推测其可能与受精具有重要关系,但不适用于雄性生殖道的先天免疫。WEI 等^[6]通过免疫检测发现,LYZL6 蛋白存在于初级精母细胞和睾丸圆形精子细胞中以及成熟附睾精子的顶体后区域和中段,且 rLYZL6 蛋白具有抗菌活性。

本研究应用 qRT-PCR、Western-blot 和免疫组化技术分别分析了 LYZL4 和 LYZL6 在不同月龄牦牛睾丸中的表达与定位。结果表明,LYZL4 基因的表达主要集中在性成熟期间,但在未成年牦牛睾丸组织中也有表达,其表达量随着牦牛年龄的增长而上调,LYZL4 基因在性成熟前的表达量极显著低于性成熟后($P < 0.01$);LYZL4 蛋白表达量在牦牛性成熟期间相对较高,主要定位于牦牛睾丸组织的圆形精子细胞中。LYZL6 基因的表达主要集中在成年牦牛的睾丸组织中,而性成熟前牦牛睾丸中 LYZL6 基因的表达量相对较低;性成熟后 LYZL6 蛋白定位于初级精母细胞、圆形精子细胞中以及成熟附睾精子的顶体前区和中段,性成熟后 LYZL6 蛋白的表达量极显著高于性成熟前($P < 0.01$)。因此,LYZL6 通过参与调控初级精母细胞的分裂而影响精子的形成过程,在哺乳动物的精卵结合过程中起着重要作用。可以推测 LYZL4 和 LYZL6 对牦牛睾丸中生殖细胞的分裂过程尤其是减数分裂过程起调控作用,进而促进精子的发生,能够保证良好的精液品质,提高牦牛的繁殖性能。本研究为进一步研究和探讨 LYZL4 和 LYZL6 基因在牦牛睾丸组织中的生物学功能提供了研究素材,但由于 LYZL4 和 LYZL6 基因的具体功能尚不清楚,并且精子发生过程的调控机制比较复杂,受到多种因素的联合调控,因此,LYZL4 和 LYZL6 对精子发生的具体调控作用还有待进一步研究和验证。

参考文献:

- [1] 丁小举,王朝亮,张卫星,等. 基因敲除技术在精子发生相关基因功能研究中的应用[J]. 中华男科学杂志, 2014,20(9):850-853.
- [2] SCHLECHT U,DEMOUGIN P,KOCH P,et al. Expression profiling of mammalian male meiosis and gametogenesis identifies novel candidate genes for roles in the regulation of fertility[J]. Molecular Biology of the Cell, 2004, 15(3):1031-1043.
- [3] 周啸宇. 一种新型人溶菌酶同源蛋白 LYC1 在毕赤酵母中的重组表达与发酵研究[D]. 上海:复旦大学,2013.
- [4] DAUTIGNY A,PRAGER E M,PHAM-DINH D,et al. cDNA and amino acid sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin[J]. Journal of Molecular Evolution, 1991,32(2):187-198.
- [5] ZHANG K,GAO R,ZHANG H X,et al. Molecular cloning and characterization of three novel lysozyme-like genes, predominantly expressed in the male reproductive system of humans, belonging to the c-type lysozyme/alpha-lactalbumin family[J]. Biology of Reproduction, 2005,73(5):1064-1071.
- [6] WEI J,LI S J,SHI H,et al. Characterisation of *Lyzs* in mice and antibacterial properties of human LYZL6[J]. Asian Journal of Andrology, 2013,15(6):824-830.
- [7] ZHOU X,YU Y,TAO J,et al. Production of LYZL6, a novel human c-type lysozyme, in recombinant *Pichia pastoris* employing high cell density fed-batch fermentation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014,118(4):420-425.
- [8] SUN R,SHEN R,LI J,et al. *Lyzl4*, a novel mouse sperm-related protein, is involved in fertilization[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2011,43(5):346-353.
- [9] HUANG P,LI W,YANG Z,et al. LYZL6, an acidic, bacteriolytic, human sperm-related protein, plays a role in fertilization[J]. PLoS One, 2017,12(2):e0171452.
- [10] 黄鹏,杜望春,施尉珺,等. 人源类溶菌酶蛋白 6 的功能研究及生理特性分析[J]. 中国生物工程杂志, 2018,38(3):1-8.
- [11] 马红,王文涛,付博,等. 精液品质及其体内和体外受精能力的相关性研究[J]. 畜牧与兽医, 2012,44(3):27-30.
- [12] XU C,WU S,ZHAO W,et al. Differentially expressed microRNAs between cattleyak and yak testis[J]. Scientific Reports, 2018,8(1):592.
- [13] MEI X X,WANG J,WU J. Extrinsic and intrinsic factors controlling spermatogonial stem cell self-renewal and differentiation[J]. Asian Journal of Andrology, 2015, 17(3):347-354.
- [14] JAISWAL D,TRIVEDI S,AGRAWAL N K,et al. Dysregulation of apoptotic pathway candidate genes and proteins in infertile azoospermia patients[J]. Fertility & Sterility, 2015,104(3):736-743.
- [15] LARDER R,CLARK D D,MILLER N L,et al. Hypothalamic dysregulation and infertility in mice lacking the homeodomain protein Six6[J]. Journal of Neuroscience, 2011,31(2):426-438.
- [16] ZHANG X,LUI W Y. Dysregulation of nectin-2 in the testicular cells: An explanation of cadmium-induced male infertility[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1839(9):873-884.
- [17] LIU S,MASTERS D,FERGUSON M,et al. Vitamin E status and reproduction in sheep: Potential implications for Australian sheep production[J]. Animal Production Science, 2014,54(6):694-714.
- [18] 黄鹏,钱能,杜望春,等. 人源类溶菌酶蛋白 4 在受精过程中的作用及酶学性质研究[J]. 中华男科学杂志, 2018,24(2):109-115.
- [19] 黄鹏,杨智昉,徐一新,等. 人源类溶菌酶蛋白 4 的多克隆抗体制备及其表达分析[J]. 中华男科学杂志, 2017,23(1):3-10.
- [20] 黄鹏,杨智昉,谢君,等. 人 g2 型溶菌酶的多克隆抗体制备及其在睾丸中的表达分析[J]. 免疫学杂志, 2016,32(10):842-847.