

用鼠红细胞膜纯化中华绒螯蟹血清凝集素的方法

刘雪兰,余为一,李谨年

(安徽农业大学 畜牧水产学院,安徽 合肥 230036)

摘要:本研究建立鼠红细胞膜吸附法纯化中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)血清凝集素的方法,并与硫酸铵盐析、凝胶过滤层析和离子交换层析等其他提取方法进行比较。实验结果表明,中华绒螯蟹血清经鼠红细胞膜吸附后,再由 EDTA 把结合的凝集素从膜上解离,可以获得纯化的高活性凝集素。该纯化物在 PAGE 中出现 2 个清晰的区带,一个是高分子的 b 带,另一个则是由 3 种大小相近的小分子组成的 c 区带;在 SDS-PAGE 中,则显示出 3 个分子量接近、约为 100 000 的条带。经 50% 饱和硫酸铵盐析或用 Sephadex G200 凝胶过滤层析法可浓缩但不能纯化中华绒螯蟹血清凝集素。经 DEAE-Sephadex A50 离子交换层析法可获得 2 个蛋白峰,其中只有 1 个峰有凝集活性,在 PAGE 中表现为 a 蛋白带。凝集活性较高、分子量较大的蛋白带。上述实验结果表明,应用鼠红细胞膜法可纯化中华绒螯蟹血清凝集素。

关键词:中华绒螯蟹;凝集素;鼠红细胞膜吸附;纯化

中图分类号:Q959.223 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)06-0519-06

凝集素广泛存在于动物、植物及微生物体内,是一大类与细胞膜特定多糖结合的生物大分子物质。通过选择性地凝集动物、微生物细胞或与蛋白质(糖蛋白)结合形成复合物^[1]。凝集素具有多种生理生化功能。甲壳动物体内有多种凝集素,有些作为识别因子,具有识别和防御外源异物入侵的功能^[2-3],是甲壳动物防御体系中重要的组成部分之一。近年来,甲壳动物中的虾类^[4-11]和中华绒螯蟹^[12]凝集素已有报道。本研究通过建立并优化用鼠红细胞膜纯化中华绒螯蟹血清凝集素的方法,旨在为研究中华绒螯蟹凝集素化学性质和生物学活性提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 中华绒螯蟹血清的制备

实验中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)选自安徽省某养蟹场,体重 50~70 g。用无菌注射器从中华绒螯蟹第三、四步足的基关节处抽取血淋巴,室温下放置 30 min,再置于 4℃冰箱 2~4 h,经 3 000~3 500 r/min 离心 10 min,吸取上清,于 -20℃保存。

1.2 中华绒螯蟹血清凝集素的分离

1.2.1 盐析 先后用 33%、50%、75% 饱和硫酸铵

分级沉淀血清,将每次离心(3 500 r/min, 30 min)后的沉淀,用 pH 7.2, 0.01 mol/L 的 PBS 透析 48 h,其间换 PBS 6~7 次。

1.2.2 凝胶层析 将经处理的 Sephadex G200 (Pharmacia)凝胶与 pH 7.2, 0.02 mol/L 的 PBS(含 0.15 mol/L NaCl)均匀混合,装柱(1.0 cm × 80 cm),用 PBS 平衡过夜。加 1 mL 血清样品。用 PBS 洗脱,控制流速 0.3 mL/min,收集样品,用 Folin-酚法和 2% 鼠红细胞悬液分别检测蛋白浓度和血凝活性。

1.2.3 离子交换层析 将处理的 DEAE-Sephadex A50(Pharmacia)用 pH 7.5, 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(0.10 mol/L NaCl)平衡装柱(1.0 cm × 20 cm),加 1 mL 血清样品。用含 NaCl(浓度为 0.10、0.15、0.35 mol/L)的 Tris-HCl 缓冲液进行梯度分段洗脱和收集样品,用 Folin-酚法和 2% 鼠红细胞悬液分别检测蛋白浓度和血凝活性。

1.2.4 鼠红细胞膜吸附法

(1)鼠红细胞膜的制备 用肝素作为抗凝剂,从小白鼠心脏采血。用 pH 7.4, 0.01 mol/L 的 PBS(含 0.15 mol/L NaCl)洗涤 3 次。然后反复冻融红细胞 2~3 次;再用 PBS 洗涤细胞膜 3 次,每次以 10 000 r/min

收稿日期:2003-11-21; 修订日期:2004-02-22.

基金项目:安徽省自然科学基金项目(99041355).

作者简介:刘雪兰(1973-),女,博士生,研究方向为预防兽医学和微生物学.

通讯作者:余为一, E-mail: yuweiyi@sohu.com

离心5 min,弃上清。沉淀即为细胞膜。

(2)用鼠红细胞膜吸附与解离凝集素 将制备好的新鲜鼠红细胞膜1 mL(含湿重0.2 g)悬液与1 mL中华绒螯蟹血清混合,使细胞膜悬浮均匀。室温静置30 min,离心10 min(10 000 r/min,)后弃上清液,用PBS悬浮细胞膜并洗涤5次(离心同前)。再加入0.5 mL EDTA(4 mol/L, pH 5.0)进行解离反应:4℃放置2 h,其间每隔30 min振荡1次。最后以10 000 r/min离心10 min,收集上清液,置PBS中透析24 h,其间换液5~6次。收集后检测样品的凝集活性。

1.2.5 中华绒螯蟹血清凝集素与鼠红细胞的凝集反应 在96孔V型微量反应板上,用生理盐水稀释中华绒螯蟹血清样品(50 μL/孔),分别加入等量鼠红细胞悬液(50 μL/孔),在振荡器上振荡混匀,室温下静置1~2 h。凝集结果的判断:如中华绒螯蟹血清不与红细胞发生凝集,则红细胞沉于“V”型板的孔底形成一个界线清晰光滑的小红点,判断为“-”;如发生凝集,则在孔底形成细胞凝集片,判断为“+”。以出现明显凝集的血清最高稀释度的倒数表示凝集价。

1.2.6 PAGE分析处理的样品 参照《分子克隆实验指南》^[13]中的方法用PAGE鉴定不同分离方法的样品纯度。浓缩胶2.5%,分离胶7.5%;SDS-PAGE测定纯化的凝集素分子量,浓缩胶2.5%,分离胶10%。

2 结果与分析

2.1 膜吸附法纯化凝集素的最佳条件与结果

2.1.1 鼠红细胞膜吸附凝集素的作用时间 按1.2.4(2),中华绒螯蟹血清与鼠红细胞膜反应10 min、20 min和30 min后,其凝集价分别为2、1和1,而未经吸附处理的对照血清的凝集价为512。表明鼠红细胞膜与中华绒螯蟹血清中绝大部分凝集素作用,反应在20 min内基本完成。

2.1.2 鼠红细胞膜与中华绒螯蟹血清的比例 按1.2.4(2),取0.5 mL鼠红细胞膜(0.1 g湿重)悬液与不同体积(0.5、1、2、3、4、5、6、7和8 mL)效价为512的中华绒螯蟹血清于室温反应20 min,离心10 000 r/min,10 min,然后测定上清液的凝集效价。结果表明0.1 g鼠细胞膜可与0.5 mL中华绒螯蟹血清的凝集素全部稳定结合,使凝集价从512降为1。

2.1.3 EDTA解离中华绒螯蟹凝集素与鼠红细胞膜结合的时间 将0.5 mL EDTA(4 mol/L, pH 5.0)溶液与上述细胞膜-凝集素结合物(0.1 g湿重鼠细胞膜与0.5 mL血清反应后离心的沉淀物)混合作用0.5~12 h后,离心取上清液,经PBS透析,用鼠红细胞测定凝集价。结果如表1所示。经EDTA处理12 h的样品在透析后都仍具有血凝活性,而解离反应1 h即可达到与12 h相同的凝集价64。

表1 EDTA解离凝集的时间与凝集价
Table 1 Agglutinin titer and time for disintegration of agglutination in EDTA

项目 Item	经EDTA处理的细胞膜-凝集素结合物 Membrane-agglutinin treated with EDTA					对照血清 Control serum	
						未经EDTA处理 Treated without EDTA	经EDTA处理 Treated with EDTA
处理时间/h Treated time	0.5	1	3	6	12		
上清液样品凝集价 Agglutinin titer in supernatant	32	64	64	64	64	512	256

2.1.4 膜吸附法纯化凝集素的PAGE图谱 如图1E所示,纯化的凝集素在PAGE中为1条大分子b带和3条分子量接近的小c带。

2.2 盐析、凝胶层析、离子交换层析与膜吸附法提取凝集素的结果比较

2.2.1 饱和硫酸铵分级盐析提取的中华绒螯蟹血清凝集素及其PAGE蛋白质图谱 如表2所示的结果,

在不同饱和度硫酸铵分级盐析产物中,50%饱和度盐析的中华绒螯蟹血清凝集素的活性最高,在回收的约32.8%的蛋白质中,凝集素占原血清50%以上。比较它们在图1B的PAGE蛋白图谱(第1~4泳道),经3种硫酸铵饱和度的盐析样品的蛋白带,除了浓度变化外,与未处理的血清蛋白带无明显的差异,除33%硫酸铵盐析只有b和c带外,均有a、b和c3条带。

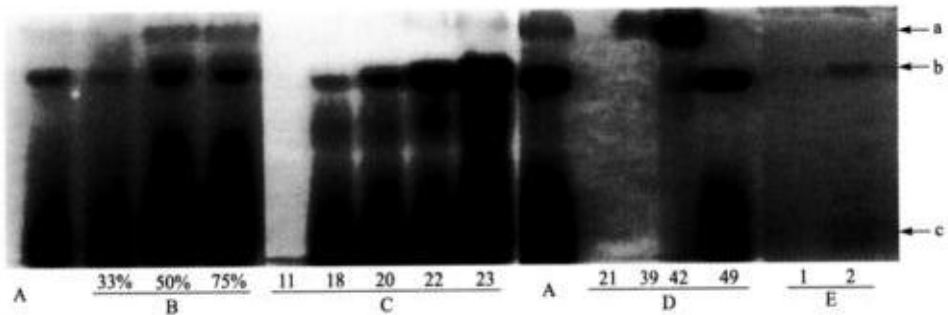


图 1 4 种方法分离提取的凝集素蛋白 PAGE 图谱

A:血清;B:盐析,百分数为饱和度;C:凝胶层析管序,数字为管号;D:离子交换层析管序,数字为管号;E:膜吸附法,1-仅细胞膜,2-经细胞膜吸附的样品,数字为管号。

Fig.1 PAGE maps of agglutinin proteins separated by four methods

A, Serum. B, Ammonium sulfate precipitation; the percentage means saturation. C, The tube number of gel chromatography; the digits mean tube number. D, The tube number of ion-exchange chromatography. E, Membrane treatment, 1 - only membrane, 2 - agglutinins adsorbed with mouse membrane adsorption; the digits mean tube number.

表 2 硫酸铵盐析法提取中华绒螯蟹血清凝集素的活性比较

Table 2 *Eriocheir sinensis* agglutinin activity after precipitation by ammonium sulfate

样品(1 mL) Sample	对照血清 Control serum	硫酸铵饱和度 % Saturation of ammonium sulfate			上清 Supernatant	合计 Total
		33	50	75		
凝集价 Agglutin titer	512	16≤	256 <	64≤	4	340≤
(回收率/% Recoverable rate)		(3.1)	(50 <)	(12.5)	(0.7)	(66.3≤)
蛋白含量/mg Protein	25.6	0.91	8.39	7.74	1.67	18.71
(回收率/% Recoverable rate)		(3.6)	(32.8)	(30.2)	(6.5)	(73.1)
凝集价/(mg 蛋白) Agglutin titer/(mg protein)	20	17.6≤	30.5 <	8.3≤	2.4	

2.2.2 凝胶过滤层析 经过 Sephadex G200 分离中华绒螯蟹血清的蛋白浓度与凝集价关系如图 2 所示,有 2 个蛋白峰和 1 个凝集活性峰,其峰值相符(第 23 管处),但是在第一蛋白峰几乎无凝集活性。在

PAGE 蛋白图谱中(如图 1C 所示,第 11、20、22 和 23 管)各样品蛋白成分差异不明显,且凝集活性较高的洗脱样品(22、23)中蛋白条带在总蛋白带中的比例(从蛋白带染色的深浅进行比较)也无明显差异。

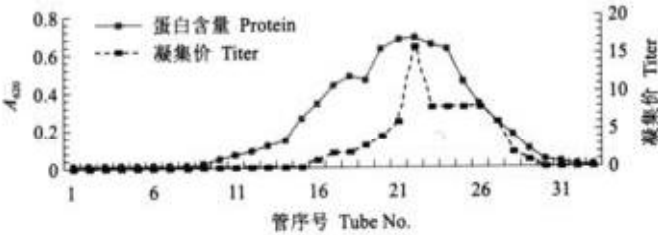


图 2 Sephadex G200 凝胶过滤中中华绒螯蟹血清蛋白和凝集素分布

Fig.2 Distribution of proteins and agglutinins of *Eriocheir sinensis* serum in an chromatography with Sephadex G200

2.2.3 离子交换层析 在经 DEAE-sephadex A50 层析的中华绒螯蟹血清样品中,蛋白浓度出现 2 个峰,分别分布于第 42 和第 51 管;而凝集活性只有 1

个峰,并与蛋白质第一峰值相重叠(如图 3 所示)。比较图 3D 中该两峰的 PAGE 蛋白电泳区带,提示凝集活性存在于分子量相对较大的区带中。

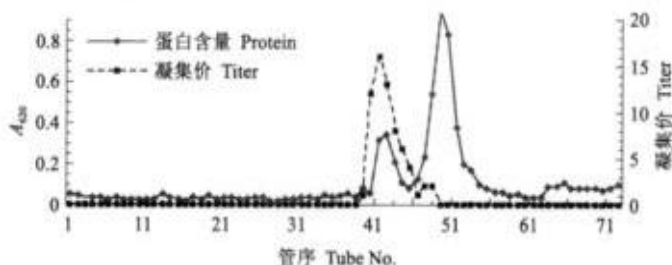


图3 DEAE-Sephadex A50 离子交换层析中华绒螯蟹血清蛋白和凝集素分布

Fig.3 Distribution of proteins and agglutinins of *Eriocheir sinensis* serum in an ion-exchange chromatography with DEAE Sephadex A 50

注:第1~12管洗脱液为0.1 mol/L NaCl;第13~29管为0.15 mol/L NaCl;第30~72管为0.30 mol/L NaCl.

Note: Nos. 1~12 tubes with elution of 0.1 mol/L NaCl; Nos. 13~29 tubes with 0.15 mol/L NaCl; Nos. 30~72 tubes with 0.30 mol/L NaCl.

2.2.4 盐析、凝胶层析、离子交换层析与膜吸附法

提取中华绒螯蟹凝集活性物的 PAGE 蛋白图谱

比较应用4种方法提取的中华绒螯蟹血清中具有凝集活性的蛋白质在PAGE电泳中的区带分布表明,具有凝集活性的蛋白至少有5种不同分子量的成分所组成(如图1右箭头所指);分子最大的蛋白带a,是血清(图1A)、盐析(图1B的50%和75%饱和度)、凝胶过滤(图1C的第23管)所共有、离子交换层析,在离子交换层析(图1D)的第39和42管中特别明显;接着是蛋白带b,也是血清、盐析、凝胶过滤所共有,而在离子交换层析的第49管和膜吸附法中较明显;最后是较小的蛋白区带c,在血清和前3种方法中为不易分开宽区带,而在膜吸附法(图1E)中则表现为3条分子量相近蛋白带。

2.3 膜吸附法分离提取中华绒螯蟹凝集活性物的 SDS-PAGE 图谱

经膜吸附法分离提取的中华绒螯蟹血清凝集活性蛋白质的SDS电泳中出现3条分子量为100 000左右的区带(如图4中箭头所指),因比较靠近,不易区分。根据其电泳图谱中的位置,与图1中B带相符。

3 讨论

凝集素是一大类具有凝集动物红细胞和细菌的生物大分子物质的总称,甲壳动物的血清凝集素种类就很多,如日本鲎(*Tachypleus tridentatus*)就有5种^[2],所以增加了分离纯化的难度。实验结果表明,中华绒螯蟹凝集素是由分子大小和结构不同的多种成分组成,具有多样性的特点。根据它们的分子性质可用化学方法进行浓缩提取,而应用小鼠红细胞膜吸附法还可分离到至少一种高纯度的凝集素。

3.1 分子组成

中华绒螯蟹血清凝集素是由性质不同的多种分子组成。中华绒螯蟹血清蛋白和经盐析、凝胶层析的样品在PAGE中不易形成清晰的区带(图1-A、B、C)。经离子交换层析虽出现a、b和c3个区带,其凝集活性却在a区带;经小鼠红细胞膜吸附法纯化的凝集活性物只分布于b和c区带。这种化学性质和生物活性的差异说明了中华绒螯蟹凝集素成分的多组分性。

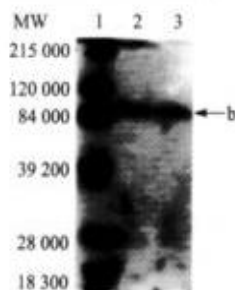


图4 膜吸附纯化凝集素的 SDS-PAGE 图谱

1. 蛋白分子标样;2,3. 膜吸附样品

Fig.4 SDS-PAGE map of agglutinin separated by membrane adsorption

1. Protein MW marker; 2,3. Membrane adsorption

首先,凝集素是蛋白分子,其结构和活性受到离子浓度等因素的影响。经离子交换层析的凝集素主要是a区带的蛋白,而b区带缺乏活性,其原因可能是高离子浓度(0.30 mol/L NaCl)使这部分凝集素改变了结构,失去了对小鼠红细胞的凝集性。经小鼠红细胞膜吸附法获得的凝集素主要是b和c区带,则可能是EDTA只能使部分凝集素(b和c区带)解离,不能使a区带的凝集素解离。因为小鼠红细胞膜吸附后的血清失去了凝集活性,表明血清凝集

素已与细胞膜结合。凝集素-细胞膜经 EDTA 解离后,其上清液中的凝集效价为 64,而血清经 EDTA 处理后的凝集效价为 256(表 1),其中约有 3/4 的凝集素或被 EDTA 破坏或未能从细胞膜上解离,a 区带则可能就是未被解离的凝集素。

其次,凝集素分子结构还受到 SDS、温度等因素影响。经小鼠红细胞膜吸附的凝集素在 PAGE 中,表现为明显而较宽的区带 b 和区带 c,而在 SDS-PAGE 图谱(图 4)中区带 b 形成 3 条分子大小相近的带,并且失去小分子的 c 区带,表明在 SDS 和高温作用下,b 区带的多种蛋白分子结构发生变化,形成 3 种多肽链,而小分子成分则被降解。

廖绍安等^[14]曾用不同动物红细胞吸附日本对虾血清凝集素,再与其他红细胞做交叉血凝实验,结果发现,经大鼠、小鼠红细胞吸附的对虾血清,已基本或完全失去了对小鼠、大鼠、豚鼠、兔红细胞的凝集活性,而经豚鼠、兔红细胞吸附的对虾血清却仍保持对大鼠、小鼠红细胞有较高的凝集活性。这说明对虾血清中存在多种凝集素,与不同动物的红细胞凝集的活性有差异。本实验结果则表明,与同一种动物红细胞结合的中华绒螯蟹血清凝集素存在多种成分。

3.2 纯化方法

根据凝集素分子在化学性质方面的差异,可用不同的提取方法进行纯化。

首先,因为用不同饱和度(33%、50%和 75%)的硫酸铵盐析中华绒螯蟹血清,所分离的蛋白成分区别不明显(图 3),但是其凝集活性比(凝集价/mg 蛋白)却有差异(表 2)。其中,50%饱和硫酸铵盐析的蛋白组分中凝集素含量较高。所以,用盐析法可浓缩血清凝集素,但不能进行纯化。

其次,在凝胶过滤层析中,中华绒螯蟹血清蛋白并没有按分子大小不同而被分离,在 PAGE 图谱的各洗脱管(第 11~31 管)中,大小蛋白分子均有存在。原因可能是中华绒螯蟹血清蛋白主要为糖蛋白,由于与载体葡聚糖凝胶本身所带的电荷互作作用,难以在本实验条件下进行分离。所以,应用凝胶过滤层析难以达到分离凝集素的目的。

再次,在离子交换层析中经 pH 为 7.0,NaCl 浓度为 0.30 mol/L 的溶液洗脱,可得到与凝集活性相

符的第 1 个蛋白峰,在 PAGE 中为一大分子量 a 蛋白带(图 1D);在其后的第 2 峰中尽管还有 b 和 c 区(图 1D),却缺乏凝集活性。这表明用此法可获得部分凝集素。

最后,应用鼠红细胞膜吸附法可得到纯化的凝集素。在此过程中,与小鼠红细胞膜表面分子结合的凝集素可通过加入螯合剂 EDTA 使之解离,并经透析除去 EDTA 后恢复其活性。这说明 EDTA 对中华绒螯蟹血清凝集素的抑制作用是一种可逆性反应,同时也说明阳离子是维持凝集素活性的必要条件。这 2 种方法为提取凝集素提供了一个有价值的手段。

参考文献:

- [1] Yeaton R W. Invertebrate lectins: I Occurrence[J]. Dev Comp Immunol, 1981, 5: 391-402.
- [2] Kawabata S, Iwanaga S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab[J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23(4-5): 391-400.
- [3] Seki N, Mizunoe Y, Wai S N, et al. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1999, 96(18): 10 086-10 091.
- [4] 肖克宇. 我国水产动物免疫研究的现状与发展[J]. 内陆水产, 2000, 9: 39-40.
- [5] 王伟庆, 李爱杰, 兰翠霞, 等. 用免疫消浊比浊法测定中国对虾血清中的免疫因子[J]. 水产学报, 1998, 22(2): 170-174.
- [6] 王雷, 李光友, 毛兴远. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究[J]. 海洋与湖沼, 1993, 26(1): 34-41.
- [7] 叶淑芳. 中国对虾体液免疫实验方法的探讨[J]. 海洋科学, 1991(6): 66-67.
- [8] 罗日祥. 中国对虾凝集素活力及细菌的诱导动力学[J]. 海洋学报, 1997, 19(4): 117-120.
- [9] 牟海津, 江晓路, 刘树青. 中国对虾血细胞凝集素的性能研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 32-35.
- [10] 王雷, 李光友, 毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化物酶活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(2): 179-182.
- [11] 莫照兰, 李会荣, 俞勇, 等. 细菌糖蛋白对螯蟹免疫因子的影响[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 28-32.
- [12] 曹广力, 朱越雄, 薛仁宇, 等. 中华绒螯蟹血清中外源凝集素的凝集作用及影响因素[J]. 水产养殖, 1999(5): 16-18.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [14] 廖绍安, 李筠, 张晓华, 等. 日本对虾血清凝集素的基本物理化学性质[J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 1-4.

Purification of *Eriocheir sinensis* serum agglutinin using mouse erythrocyte membrane

LIU Xue-lan, YU Wei-yi, LI Jin-nian

(College of Animal Science and Fisheries, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: *Eriocheir sinensis*, as a kind of crustacean animals, is one of the important aquatic products in China. Since lack of specific immune system, crustacean animals require unspecific immune factors, such as agglutinin, to resist pathogenic microbes. Agglutinin is a big family composing of different molecules. So far, the serum agglutinin in these animals has not been well identified. The aim of this study was to purify *Eriocheir sinensis* serum agglutinins and research their characters.

Firstly, a method was established to purify agglutinin molecules of *Eriocheir sinensis* serum, which was named mouse erythrocyte membrane adsorption (MEMA). Briefly, after a reaction of *Eriocheir sinensis* serum (0.5 mL) with prepared mouse erythrocyte membrane (0.1 g of wet weight) for 2 h and following a centrifugation, the precipitated membrane was suspended with 0.5 mL EDTA (4 mol/L, pH 5.0) and incubated for 1–12 h. Then a centrifugation was carried out and the supernatant was dialyzed against PBS to remove EDTA. The results of agglutination test showed that the samples kept the same activity treated with EDTA for 1 h as well as 12 h. These purified molecules had two sections in a polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) map, one of them contained three bands, named band c, with the similar lower molecule weight (MW) and other was a single band, named band b, with higher MW. However, in SDS-PAGE, they had one section containing three bands with the similar MW about 100 000.

Secondly, we used other methods such as saturated ammonium sulfate precipitation, gel chromatography with Sephadex G200 and ion-exchange chromatography with DEAE Sephadex A50 to gain the agglutinins. The ammonium sulfate solution with final saturation of 33%, 50% and 75% was used to precipitate the *Eriocheir sinensis* serum, successively. After centrifugation, the precipitates were dialyzed against PBS (pH 7.2, 0.01 mol/L) for 48 h to remove ammonium sulfate. The highest activity of agglutinin was found in the sample used by 50% saturated ammonium sulfate, in which the recoverable rates of protein and agglutinins were about 32.8% and more than 50%, respectively. There was no difference among these samples in the bands in PAGE map.

Two peaks of protein were observed in the eluted solution of *Eriocheir sinensis* serum in the gel chromatography. The first peak had no agglutinin activity while the second did. In PAGE map, no clear difference was examined between these two samples in the bands.

In the ion-exchange chromatography, *Eriocheir sinensis* serum was successively eluted by NaCl solution with subsection concentration grade of 0.5, 0.15, 0.25 and 0.35 mol/L, however, few protein was found except that with 0.35 mol/L, in which there were mainly two protein peaks and only one of them had agglutinin activity. In PAGE this protein peak showed as a single band, named band a.

In conclusion, the agglutinins of *Eriocheir sinensis* serum could be concentrated either by the ammonium sulfate precipitation or by the gel chromatography, but not purified. Only a kind of protein with agglutinin activity could be separated by the ion-exchange chromatography, while by MEMA two kinds of purified agglutinins could be obtained.

Key words: *Eriocheir sinensis*; agglutinin; mouse erythrocyte membrane adsorption (MEMA); purification

Corresponding author: YU Wei-yi. E-mail: yuwei yi@sohu.com