

雷州黑鸭 PID1 基因部分序列的克隆与蛋白功能分析

黄汉光, 汤绮明, 苏瑛*, 许冲, 崔红艳, 常羽, 黄骏腾 (广东海洋大学农学院, 广东湛江 524088)

摘要 [目的]了解雷州黑鸭磷酸酪氨酸互作结构域 1(phosphotyrosine interaction domain containing 1, PID1) 基因的序列结构特征及其蛋白的功能, 为利用其改善雷州黑鸭肉品质与提高肉风味提供分子理论依据。[方法]采用 RT-PCR 方法克隆雷州黑鸭 PID1 基因部分序列, 测序后比对其同源性, 构建系统发育树, 并预测其蛋白结构与功能。[结果]该核苷酸序列长度为 369 bp, 编码 80 个氨基酸, 且大多为疏水性氨基酸。与人、牛、鸡等物种进行同源性比对, 发现雷州黑鸭 PID1 基因序列与鸡具有高度同源性, 同源性高达 94%, 且雷州黑鸭与鸡聚于同一系统发育支。蛋白质结构预测表明, 该蛋白无跨膜结构与信号肽, 氨基酸序列呈疏水性, 位于细胞质中。[结论]雷州黑鸭的 PID1 基因与鸡的亲缘关系最近, 其蛋白主要功能是在细胞质中参与肌内脂肪沉积的调控。

关键词 雷州黑鸭; PID1; 克隆; 蛋白功能分析

中图分类号 S834+.89 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)34-207-04

Analysis of Cloning and Protein Function of Partial PID1 Gene Sequence of Leizhou Black Duck

HUANG Han-guang, TANG Qi-ming, SU Ying* et al (Agriculture College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract [Objective] To understand structure characteristics and protein function of partial PID1 gene sequence of Leizhou black duck, which will provide the molecular basis for improvement of Leizhou black duck and improve the quality of meat flavor. [Method] Using RT-PCR cloning gene partial sequence of the Leizhou black duck PID1, homology sequenced, phylogenetic tree was constructed, and their protein structure and function was forecasted. [Result] A length of 369 bp nucleotide sequence was obtained, the sequence encoding the 80 amino acids, most of which are hydrophobic amino acids. It was found homology alignment and phylogenetic tree species such as people, cattle and chickens, Leizhou black ducks and chickens homology of 94%, together in a phylogenetic tree on. And its protein structure prediction, and found that there is no similar transmembrane signal peptide, and present in the cytoplasm. [Conclusion] Leizhou black duck PID1 protein is involved in the regulation of intramuscular fat deposition in the cytoplasm, and recent genetic relationship with chicken.

Key words Leizhou black duck; PID1; Cloning; Protein function analysis

肌内脂肪(IMF)是衡量鸭肉品质的重要指标之一,与肉的口感嫩度、咀嚼性能及多汁性等密切相关^[1],适量的肌内脂肪不仅改善肉的风味,也提高了消费者的感官满意度。肌外膜、肌内膜及肌束膜是肌内脂肪的主要储存场所。研究表明,一方面,肌内脂肪主要通过溶解肌纤维束的作用来提高肉品质的多汁性与口感嫩度,另一方面,磷脂是肌内脂肪的主要组成成分,占 20%~50%,磷脂通过增加脂肪酸的降解产物,进而提高肉香味相关化合物的含量,从而改善肉的香味^[1-2]。磷酸酪氨酸互作结构域 1(Phosphotyrosine interaction domain containing 1, PID1)是利用抑制性消减杂交技术从正常人群与肥胖人群腹部脂肪组织中检测到的差异性表达基因,提交 NCBI 后,根据该基因的结构特征被国际统一命名为 PID1 基因^[1,3]。脂肪沉积能力是衡量动物经济价值的重要参数之一,对脂肪沉积相关候选基因进行研究,可为畜禽品种选育提供参考依据,进而加速育种进程。研究表明, PID1 基因通过促进更多的 3T3-L1 脂肪前体细胞进入染色质合成期,进而发挥促进脂肪细胞增殖的作用^[3-4]。此外, PID1 基因的过表达对胰岛素受体底物 1(insulin receptor substrate family 1, IRS1)的酪氨酸磷酸化进程具有抑制作用,降低机体对胰岛素的敏感性,进而影响脂肪代谢^[5]。钱源等^[6]对

莱芜猪 PID1 基因 CDS 区进行克隆、表达,并对该基因进行功能性分析,结果表明, PID1 基因与莱芜猪的肌内脂肪沉积有关。殷捷等^[7]采用 RT-PCR 方法测定了 PID1 基因在安徽白山羊不同组织的表达情况,并分析 PID1 基因与白山羊肌内脂肪的相关性,结果表明 PID1 基因与安徽白山羊的肌内脂肪沉积量显著相关。目前人类、大鼠、牛、猪、鸡的 PID1 基因的 CDS 序列已经被克隆,但鸭 PID1 基因序列的克隆与蛋白功能分析未见报道,此外,鸭肌内脂肪沉积的主效基因尚未确定^[8]。笔者根据 GenBank 登录的鸡 PID1 基因序列并参考文献设计引物,扩增出长度为 369bp 雷州黑鸭的 PID1 基因 CDS 序列,并对其蛋白结构进行功能性分析,为研究雷州黑鸭肌内脂肪代谢调控机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 300 d 雷州黑鸭种公鸭 1 只,颈静脉放血,取胸肌,置于液氮中进行速冻, -80 °C 保存备用。

1.2 试剂与设备 DEPC、RNAiso Regent、Master Mix (2x)、Gel Extraction Kit、pUC-T simple vector、OneLysePlasmid Mini Kit 均购自北京康为世纪生物科技有限公司; PrimeScript III 1st strand cDNA synthesis Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司; LB 固体培养基、LB 液体培养基、缓冲液 1 × TSS、50 μg/ml Amp/LB 固体培养基、50 μg/ml Amp/LB 液体培养基均按照要求配制。

1.3 试验方法

1.3.1 引物的设计与合成。根据 GenBank 登录的鸡 PID1 基因序列(登录号为 NM_001178144.1)分别设计出两对引物并标记为 P1、P2(表 1),引物由英潍捷基(上海)贸易有限公

基金项目 广东省科技计划项目(2014A020208123);广东星火计划项目(2012A020602104);湛江市科技计划项目(2012C0204 湛科[2012]86 号);广东海洋大学博士启动基金项目(1212040);广东海洋大学研究生示范课程培育项目(11)。

作者简介 黄汉光(1989-),男,广东汕头人,硕士研究生,研究方向:动物遗传资源利用与品种选育。*通讯作者,教授,博士,从事家禽遗传资源评价与分子遗传学研究。

收稿日期 2015-11-05

司合成。

表1 引物序列

引物	上游(5'-3')	下游(5'-3')
P1	GCAGCACTTTCAGACCAT	ATTTCAGAAAGAGCATTAGC
P2	ACGCTTGCCAGGGAGGATA	TGTGGTCAGCAGTGCAGTAGG

1.3.2 cDNA 片段的制备。取胸肌 50 mg, 添加液氮进行研磨后, 用 Trizol 提取总 RNA。用 Eppendorf BioPhotometer plus 检测其浓度和纯度。然后使用 PrimeScript II 1st strand cDNA synthesis Kit 试剂盒, 参见试剂盒说明书合成 cDNA。

1.3.3 目的片段的扩增。扩增体系(50 μ l): cDNA 溶液 2.0 μ l, 上游引物(10 μ mol/L) 2.0 μ l, 下游引物(10 μ mol/L) 2.0 μ l, Master Mix(2x) 25 μ l, dH₂O 19 μ l。扩增参数: 预变性 94 $^{\circ}$ C 2 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 55 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min 10 s(30 个循环); 延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min; 25 $^{\circ}$ C 保存产物。

1.3.4 产物回收与测序。采用 1% 的琼脂糖凝胶对产物进行电泳, 后用 Gel Extraction Kit 试剂盒对目的片段进行回收, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

用 pUC-T simple 与回收的目的片段连接, 产物转入大肠

杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性重组子, 摇菌, 用 OneLyse-Plasmid Mimi Kit 试剂盒抽取质粒, 送至上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.3.5 序列分析与蛋白质结构、功能预测。所得序列经测序后用 NCBI 进行比对, 证明所得序列为雷州黑鸭 PID1 基因 CDS 区, 后将该序列翻译成蛋白质, 利用 NCBI 和 DNAMAN 的 BLAST 分析软件分析所获得的核苷酸序列和推导氨基酸序列的同源性并构建系统进化树。使用 ExPASy 服务的各种在线软件对该蛋白质序列的结构与功能进行预测。

2 结果与分析

2.1 雷州黑鸭 PID1 基因的序列分析 测序结果显示, 所得雷州黑鸭 PID1 基因核苷酸序列长度为 367 bp, 与预期相同。该核苷酸序列与鸡 PID1 基因(NM_001178144.1) 54~422 bp 区段具有较高相似度, 于 574~953 bp 处有一个完整的开放阅读框, 具有分析意义。该片段碱基 G、C、A、T 分别占 23.4%、26.4%、26.4%、23.7%, 四者所占比例相近, A+T 的含量(50.1%) 略高于 C+G 的含量(49.8%)。该序列共编码 80 个氨基酸。

表2 不同物种 PID1 基因核苷酸序列的碱基组成

物种	T(U) // %	C // %	A // %	G // %	大小 // bp
牦牛 <i>Bos grunniens</i>	17.8	28.5	26.7	27.1	776
牛 <i>Bos taurus</i>	24.4	24.8	27.5	23.2	2 560
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	25.7	22.7	26.3	25.3	1 935
鸡 <i>Gallus</i>	22.3	25.1	27.7	24.9	654
大猩猩 <i>Gorilla</i>	24.7	25.4	26.6	23.3	2 593
人 <i>Homo sapiens</i>	24.3	25.0	27.0	23.7	2 837
雷州黑鸭 <i>Leizhou black duck</i>	23.7	26.4	26.4	23.4	367
鼠 <i>Mus</i>	26.3	23.3	26.7	23.7	2667
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	22.2	23.0	27.2	27.7	784
猪 <i>Sus scrofa</i>	19.8	29.2	25.1	26.0	339
绵羊 <i>Ovis aies</i>	25.3	24.3	27.2	23.2	2 407
平均	24.4	24.6	26.9	24.1	1 629

2.2 雷州黑鸭 PID1 基因的序列同源性比较及系统发育进化分析 用 BLAST 在线软件对雷州黑鸭与其余物种的 PID1 基因进行同源性分析, 结果显示同类型物种具有较高同源性, 雷州黑鸭与鸡的 PID1 基因同源性高达 94%。基于 Kimura 双参数遗传模型, 利用 MEGA 4.1 软件构建 PID1 基因系统发育树。人、大猩猩、绵羊、牦牛、牛、猪、鼠、褐家鼠聚在一支, 雷州黑鸭与鸡聚于同一支, 而斑马鱼则单独成一支(图 1)。

2.3 雷州黑鸭 PID1 基因的蛋白质结构与功能预测

2.3.1 疏水性分析。使用 ExPASy 的 ProtScale 程序 Kyte^[9] 和 Doolittle 构建疏水性图谱并计算蛋白质疏水性 GRAVY 值。结果显示, 氨基酸序列的两端呈亲水性, 疏水氨基酸比例较高, 且亲水性氨基酸与疏水性氨基酸交替出现(图 2)。

2.3.2 跨膜结构分析。用 TMPRED 软件预测分析雷州黑鸭 PID1 蛋白分子的跨膜结构。TMPRED 分析结果显示 PID1 不存在跨膜蛋白结构(图 3)。

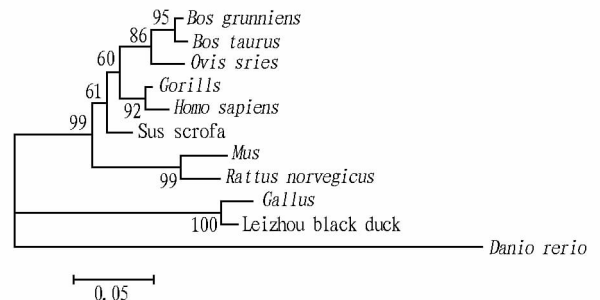
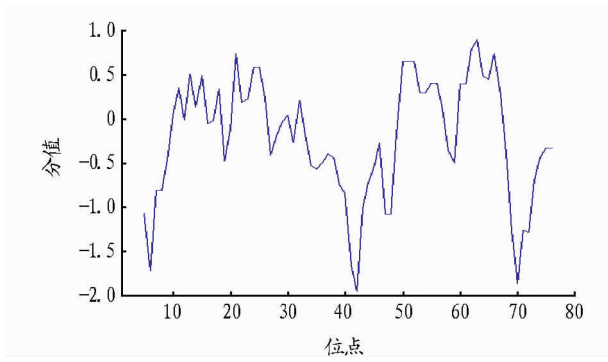


图1 雷州黑鸭 PID1 基因系统发育树

2.3.3 信号肽的预测。采用 ExPASy Proteomics Server 中的 SignalP 4.0 Server-prediction 软件分析表明, PID1 蛋白序列不存在蛋白质信号肽(图 4)。

2.3.4 蛋白质二级结构的预测。用 HNN 软件预测雷州黑鸭 PID1 蛋白的二级结构, 结果显示存在随机卷曲、延伸结构和 alpha 螺旋 3 种二级结构(图 5), 延伸结构、alpha 螺旋及随



注:纵坐标负值表示亲水性,正值表示疏水性。

图2 雷州黑鸭 PID1 蛋白的疏水性

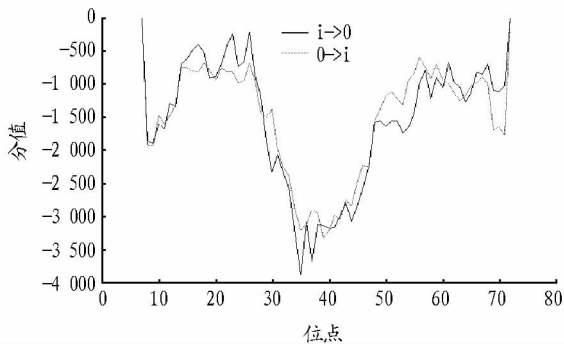
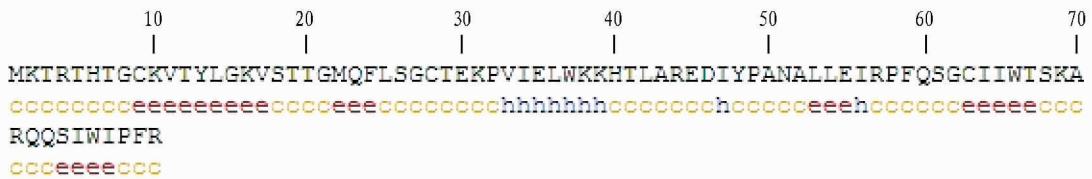


图3 TMPRED 软件预测雷州黑鸭 PID1 蛋白分子跨膜结构机卷曲分别占 30.0%、11.25% 及 58.75%。



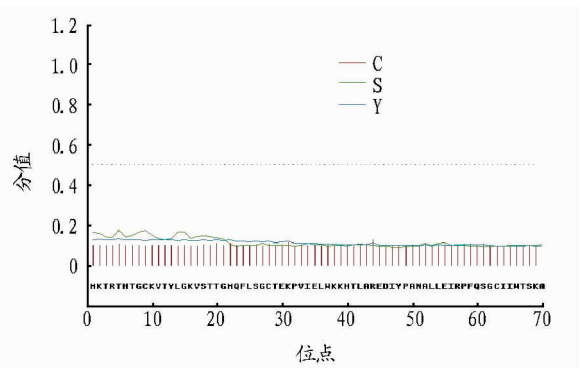
注:c 为随机卷曲,e 为延伸结构,h 为 alpha 螺旋。

图5 雷州黑鸭 PID1 蛋白二级结构预测

上,且两者所表达蛋白质结构非常相近,推测雷州黑鸭 p94 蛋白同样参与肌肉嫩度的调节功能^[11]。研究表明,PID1 与动物肌肉脂肪沉积密切相关^[7,14]。推测由于雷州黑鸭与鸡 PID1 基因同源性高,且雷州黑鸭 PID1 基因存在一定的自身特异性,是导致雷州黑鸭肉质鲜香,肌肉嫩,良好风味,成为广受欢迎的肉产品^[15-16]的根本原因。

3.2 雷州黑鸭 PID1 氨基酸序列疏水性分析 利用雷州黑鸭 PID1 基因氨基酸序列构建的疏水性图谱,可以看出雷州黑鸭 PID1 基因氨基酸序列中疏水性氨基酸比例较高,且均匀分布于整个肽链中。钱源等^[2,6]对莱芜猪 PID1 基因进行克隆、表达并研究其与肌肉内脂肪沉积关系,结果显示猪 PID1 氨基酸序列整体表现为亲水性。疏水性氨基酸可稳定蛋白质的内部构象,而亲水性则增加了蛋白质的溶解性。因此,雷州黑鸭 PID1 基因编码的疏水性蛋白质比猪的 PID1 蛋白结构更稳定。

3.3 雷州黑鸭 PID1 蛋白的结构比较与功能分析 SignalP 4.0 Server - prediction 软件分析表明,雷州黑鸭 PID1 蛋白序



注:C 为断裂点预测,S 为信号肽预测参考值,Y 为两者的校正断裂点综合值。

图4 雷州黑鸭 PID1 蛋白信号肽的预测

3 讨论

3.1 雷州黑鸭 PID1 部分碱基序列分析 研究结果显示,PID1 基因核苷酸序列因物种不同而存在差异性,亲缘度高的物种,核苷酸序列相似度越高。BLAST 对比分析发现,人、大猩猩、绵羊、牦牛、牛、猪、鼠、褐家鼠聚在一支;雷州黑鸭与鸡聚于同一支,且同源性高达 94%^[9-10];而斑马鱼则单独成一支。这表明,PID1 基因在同物种间具有种属相似性和生物多样性,同时不同物种间具有差异性。相近的序列与蛋白结构,其发挥的功能往往相类似^[11]。骨骼肌特异性钙蛋白酶(Muscle specific calpain, p94)被广泛应用于研究肉的嫩度^[12-13]。雷州黑鸭与鸡 p94 基因同源性达 90% 以

列不存在蛋白质信号肽。TMPRED 软件预测分析雷州黑鸭 PID1 蛋白分子的跨膜结构,结果表明,PID1 不存在跨膜蛋白结构。推测雷州黑鸭 PID1 前体蛋白于胞质合成后,前体蛋白直接在胞质内加工成成熟蛋白质,进而发挥其生物学功能。这和钱源等^[6]在猪 PID1 基因 CDS 区的克隆、表达及其 mRNA 表达与肌肉脂肪沉积关系的研究中的研究结果猪的 PID1 蛋白为细胞质蛋白是一致的。

蛋白质二级结构预测结果显示,随机卷曲占雷州黑鸭 PID1 蛋白结构的 58.75%。而钱源等^[2,6]研究结果表明,猪 PID1 蛋白质结构以 alpha 螺旋为主。这可能与动物进化过程中对生存环境及养殖模式的适应性演变有关。

雷州黑鸭的 PID1 基因与鸡的亲缘关系最近,其蛋白主要功能是在细胞质中参与肌肉脂肪沉积的调控。

参考文献

- [1] 杨伦,徐正刚,王惠,等. RNA 干扰沉默 PID1 基因在 C2C12 细胞中表达的研究[J]. 山东大学学报(理学版),2013,48(1):36-42.
- [2] 钱源,曾勇庆,崔景香,等. 莱芜猪 PID1 基因的功能分析及表达谱研究[J]. 畜牧兽医学报,2011,42(5):621-628.
- [3] 余章斌,郭锡榕. 肥胖相关新基因 NYGGF4 的系列研究[J]. 中华实用

- 儿科临床杂志,2012,27(1):53-56.
- [4] ZHAO Y P,ZHANG C M,ZHU C,et al. NYGGF4 homologous gene expression in 3T3-L1 adipocytes;Regulation by FFA and adipokines[J]. Molecular biology reports,2010,37(7):3291-3296.
- [5] ZENG X Q,ZHANG C M,TONG M L,et al. Knockdown of NYGGF4 increases glucose transport in C2C12 mice skeletal myocytes by activation IRS-1/PI3K/AKT insulin pathway. [J]. Journal of bioenergetics & biomembranes,2012,44(3):351-355.
- [6] 钱源,曾勇庆,杜金芳,等. 猪 PIDI 基因 CDS 区的克隆及其 mRNA 表达与肌内脂肪沉积关系[J]. 遗传,2010,32(11):1153-1158.
- [7] 殷捷,凌英会,丁建平,等. 山羊 PIDI 基因组织表达谱及其与肌内脂肪含量的相关性[J]. 江苏农业学报,2014,30(4):784-789.
- [8] 陈小玲,黄志清,贾刚,等. 磷酸酪氨酸互作结构域 1 基因对肉质性状的调控[J]. 动物营养学报,2012,24(4):591-594.
- [9] 满朝来,赵丹丹,李响. 鸡 NYGGF4 同源基因的克隆与表达分析[J]. 中国农学通报,2010,26(4):1-5.
- [10] MAN C L,LI X,ZHAO D D. Cloning,sequence identification,and tissue expression analysis of novel chicken NYGGF4 gene [J]. Mol Cell Biochem,2011,346(1/2):117-124.
- [11] 汤绮明,苏瑛,张丽,等. 雷州黑鸭 p94 部分序列的克隆与蛋白功能分析[J]. 广东农业科学,2013(1):147-153.
- [12] ILIAN M A,BEKHIT A D,STEVENSON B J,et al. Up- and down-regulation of longissimus tenderness parallels enhances in the myofibril-bound calpain 3 protein[J]. Meat Sci,2004,67(3):433-445.
- [13] JIA Z,PETROUNEVITCH V,WONG A,et al. Mutations in calpain 3 associated with limb girdle muscular dystrophy:Analysis by molecular modeling and by mutation in m-calpain[J]. Biophys J,2001,80(6):2590-2596.
- [14] 徐正刚,杨伦,曾勇庆,等. RNA 干扰沉默 PIDI 基因肉兔模型的构建[J]. 畜牧兽医学报,2014,45(5):750-756.
- [15] 黄骏腾,苏瑛,廖院华,等. 雷州黑鸭滩涂生活习性观察[J]. 南方农业学报,2014,45(3):484-488.
- [16] 汤绮明,苏瑛,谭道杰,等. 雷州黑鸭外貌特征及体型性状的主成分分析[J]. 中国家禽,2012,34(19):20-24.

(上接第 206 页)

- [9] LU F,MENCIA A,BI L,et al. Dendrimer-like alpha-D-glucan nanoparticles activate dendritic cells and are effective vaccine adjuvants [J]. J Control Release,2015,204:51-59.
- [10] LIU M,MACHOVA E,NEŠČAKOVA Z,et al. Vaccination with mannan protects mice against systemic aspergillosis[J]. Med Mycol,2012,50:818-828.
- [11] VASSILAROS S,TSIBANIS A,TSIKKINIS A,et al. Up to 15-year clinical follow-up of a pilot Phase III immunotherapy study in stage II breast cancer patients using oxidized mannanMUC1 [J]. Immunotherapy,2013,5:1177-1182.
- [12] KJAERUP R M,DALGAARD T S,NORUP L R,et al. Adjuvant effects of mannose-binding lectin ligands on the immune response to infectious bronchitis vaccine in chickens with high or low serum mannose-binding lectin concentrations[J]. Immunobiology,2014,219:263-274.
- [13] STARUCH M J,WOOD D D. The adjuvant activity of Interleukin-1 *in vivo* [J]. Immunol,1983,130:2192-2194.
- [14] WOLPERT F,HAPPOLD C,REIFENBERGER G,et al. Interferon- β modulates the innate immune response against glioblastoma initiating cells [J]. PLoS One,2015,10(10):139603.
- [15] KREUTZ M,BAKDASH G,DOLEN Y,et al. Type I IFN-mediated synergistic activation of mouse and human DC subsets by TLR agonists [J]. Eur J Immunol,2015,45(10):2798-2809.
- [16] ROBB R J,MUNCK A,SMITH K A. T cell growth factor receptors. Quantitation,specificity,and biological relevance [J]. J Exp Med,1981,154(5):1455-1474.
- [17] SU L K,YU F,LI Z F,et al. Intranasal co-delivery of IL-6 gene enhances the immunogenicity of anti-caries DNA vaccine [J]. Acta Pharmacol Sin,2014,35(5):592-598.
- [18] KHAN T,HEFFRON C L,HIGH K P,et al. Membrane-bound IL-12 and IL-23 serve as potent mucosal adjuvants when co-presented on whole inactivated influenza vaccines [J]. Virol J,2014,11:78.
- [19] CAMUSSONE C M,VEAUTE C M,PUJATO N,et al. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant [J]. Res Vet Sci,2014,96(1):86-94.
- [20] XIONG Q,WEI Y,FENG Z,et al. Protective efficacy of a live attenuated *Mycoplasma hypopneumoniae* vaccine with an ISCOM-matrix adjuvant in pigs [J]. Vet J,2014,199(2):268-274.
- [21] JINESH G G,CHUNDURU S,KAMAT A M. Smac mimetic enables the anticancer action of BCG-stimulated neutrophils through TNF- α but not through TRAIL and FasL [J]. J Leukoc Biol,2012,92(1):233-244.
- [22] KLEINNIJENHUIS J,QUINTIN J,PREIJERS F. BCG-induced trained immunity in NK cells:Role for non-specific protection to infection [J]. Clin Immunol,2014,155(2):213-219.
- [23] ILJINE D A,ARKHIPOV S A,SHKURUPY V A. *In vitro* expression of IL-1 α , GM-CSF, and TNF- α by multinucleated macrophages from BCG-infected mice [J]. Bull Exp Biol Med,2013,155(5):663-666.
- [24] LIU Q,IAN Y,ZHAO X,et al. NMAAP1 Expressed in BCG-activated macrophage promotes M1 macrophage polarization [J]. Mol Cells,2015,2:10.
- [25] BEHRENS N E,GERSHWIN L J. Immune modulation of T regulatory cells and IgE responses in horses vaccinated with West Nile virus vaccine combined with a CpG ODN [J]. Vaccine,2015,pii:S0264-410X.
- [26] PRADHAN P,QIN H,LELEUX J A,et al. The effect of combined IL10 siRNA and CpG ODN as pathogen-mimicking microparticles on Th1/Th2 cytokine balance in dendritic cells and protective immunity against B cell lymphoma [J]. Biomaterials,2014,35(21):5491-5504.
- [27] GUNAWARDANA T,FOLDVARI M,ZACHAR T. Protection of neonatal broiler chickens following *in ovo* delivery of oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG-ODN) formulated with carbon nanotubes or liposomes [J]. Avian Dis,2015,59(1):31-37.
- [28] SINGH D,SOMANI V K,AGGARWAL S,et al. PLGA (85:15) nanoparticle based delivery of rL7/L12 ribosomal protein in mice protects against *Brucella abortus* 544 infection; A promising alternate to traditional adjuvants [J]. Mol Immunol,2015,5890(15):30072-30079.
- [29] SAEED M I,OMAR A R,HUSSEIN M Z,et al. Development of enhanced antibody response toward dual delivery of nano-adjuvant adsorbed human Enterovirus-71 vaccine encapsulated carrier [J]. Hum Vaccin Immunother,2015,11(10):2414-2424.