

水稻小热休克蛋白 OsHSP20 抗体特性鉴定及应用

何婧^{1,2} 刘寒^{1,2} 郭留明^{1,2} 李静² 张恒木^{1,2,*}

(¹ 浙江师范大学 化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004; ² 浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所/省部共建植物有害生物国家重点实验室培育基地, 杭州 310021; *通讯联系人, E-mail: zhhengmu@tsinghua.org.cn)

Characterization and Application of Antibodies Against a Small Heat Shock Protein OsHSP20 from *Oryza sativa*

HE Jing^{1,2}, LIU Han^{1,2}, GUO Liuming^{1,2}, LI Jing², ZHANG Hengmu^{1,2,*}

(¹ College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; ² State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control/Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; *Corresponding author, E-mail: zhhengmu@tsinghua.org.cn)

Abstract: 【Objective】 In previous studies, *OsHSP20*, a gene encoding small heat shock protein, was cloned from *Oryza sativa*. Here its polyclonal antibodies were prepared and analyzed for their properties of immunological reactions and range of application. 【Method】 Synthetic peptide and recombinant protein of *OsHSP20* were used to immunize the rabbits for preparing the polyclonal antibodies against the protein, respectively. Antigen-coated plate (ACP)- and dot-enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) were used for comparing the titer and sensitivity of antibodies. Western blotting was used to determine the antibody specificity and the range of application. 【Result】 In Western blotting assays, both antibodies were strongly reacted with a band of protein with an expected size of 37 kD, suggesting that they were specific against the *OsHSP20*. ACP- and dot-ELISA assays showed that the polyclonal antibody prepared from the recombinant protein had a higher titer and sensitivity than that of peptide. Further assays showed that the polyclonal antibody could be used for detection of the SHSP homologs of plants. 【Conclusion】 The polyclonal antibodies were successfully prepared with high specificity, titer, and sensitivity and could be widely used to analyze the expression of *HSP20* protein in a variety of monocotylous and dicotyledonous plants, which could contribute to the functional characterization of *OsHSP20* and its homologs in different plants.

Key words: small heat shock protein; polyclonal antibodies; Western blot

摘要: 【目的】在前期克隆了一个水稻小热休克蛋白(*OsHSP20*)的基础上, 进一步分析该蛋白多克隆抗体的免疫反应特性和应用范围, 为深入鉴定该类基因的功能奠定基础。【方法】利用合成多肽和其原核表达产物分别免疫家兔制备了相应的多克隆抗体; ACP(Antigen-coated plate)-ELISA 和 dot-ELISA 用于分析比较多克隆抗体效价和灵敏度; Western blot 用于鉴定多克隆抗体的特异性和应用范围。【结果】Western blot 分析显示, 利用重组 *OsHSP20* 蛋白及其合成多肽所制备的多克隆抗体均可以在原核表达 *OsHSP* 样品中特异性检测到 1 条大小与预期一致(37 kD)的条带, 表明两种方法获得的多克隆抗体都具有高度的特异性; ACP(Antigen-coated plate)-ELISA 和 dot-ELISA 分析表明, 利用重组蛋白制备的多克隆抗体效价和灵敏度均高于利用多肽制备的抗体。进一步的 Western blot 分析显示该抗体可用于多种植物小热休克蛋白(SHSP)的检测。【结论】制备了 *OsHSP20* 蛋白质抗体, 且具有高度的特异性和较高的效价和灵敏度, 可广泛地用于多种单、双子叶植物 *HSP20* 蛋白的表达分析, 有助于 *OsHSP20* 及其他植物同源蛋白的功能鉴定。

关键词: 小热休克蛋白; 多克隆抗体; 蛋白质印迹法

中图分类号: Q785; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2019)03-0235-06

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是生物体细胞受到高温等外界非生物条件刺激时产生的一

类结构保守的分子伴侣蛋白, 分子量大小分布为 10~200 kD, 其中小热休克蛋白(small heat shock

收稿日期: 2019-01-21; 修改稿收到日期: 2019-02-17。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31601603); 浙江省重点研发计划资助项目(2019C02018)。

protein, SHSP)的分子量大小一般在 15~30 kD, 且在充当分子伴侣时不依赖 ATP^[1-2]。作为生物抗逆重要防线的 SHSP 广泛存在于各类生物细胞中且含量丰富, 在重金属、干旱、冷冻和氧化胁迫等诸多非生物逆境以及细胞凋亡、分化等发育过程中发挥重要功能^[3-5]。与动物 SHSP 相比, 植物 SHSP 种类更为丰富多样, 进化过程也更为复杂; 进化树分析和亚细胞定位预测表明植物 SHSP 至少可分为 14 个亚类(subfamilies), 不同亚类的 SHSP 可能定位于不同的细胞器, 不同的亚细胞器定位在一定程度上反映了植物 SHSP 功能多样性^[6]。最近的报道显示, 植物 SHSP 不仅参与保护植物免受非生物逆境的伤害, 还可能参与病毒等生物逆境响应过程^[7], 但对于它们的功能机制仍然了解很少。

在前期的研究中, 本实验室在研究水稻条纹病毒与水稻互作的过程中发现病毒侵染可改变小热休克蛋白在水稻细胞内的定位和分布模式, 并且水稻条纹病毒复制酶可特异性地与一个水稻小热休克蛋白(OsHSP20)在细胞质中相互作用, 表明该 OsHSP20 可能参与病毒侵染宿主水稻的过程^[7]。生物信息学分析显示 OsHSP20 在分类上隶属于 CI 类, 其 C 端部分(52~143 aa) 具有保守的 α -晶体蛋白结构域(α -crystallin domain, ACD), 类似的结构多存在于小热休克蛋白及其他分子伴侣蛋白^[8-9]; 定量分析显示热激处理和病毒侵染都显著影响该基因的表达^[7,10]; 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析显示该蛋白在体外能形成同源二聚体或寡聚体, 支持该蛋白可能通过形成同源寡聚体的方式发挥其分子伴侣活性^[11]。为了进一步分析 OsHSP20 的特性, 本研究在前期克隆和原核表达的基础上进一步通过合成多肽和纯化的异源重组表达产物作为抗原制备了该蛋白的多克隆抗体, 并对其效价、灵敏度和特异性进行比较分析, 以期深入鉴定植物 SHSP 特性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

OsHSP20 基因及其原核表达载体均由本实验室克隆、构建并保存^[10-11]。免疫学实验使用的碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AP)、AP 标记的羊抗兔 IgG 二抗、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔等均购自上海生工生物工程股份有限公司; 水稻(*Oryza sativa*)和本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)种子由本实验室保存, 玉米(*Zea mays*)、

辣椒(*Capsicum annuum*)、萝卜(*Raphanus sativus*)、青菜(*Brassica chinensis* Linn.)、白菜(*Brassica pekinensis* Rupr)、生菜(*Spinacia oleracea*)等蔬菜种子购自浙江勿忘农种业公司并按商家说明培养于光照培养箱, 热激处理植物材料的条件为 45℃、2 h。

1.2 重组蛋白表达与纯化

将含有 OsHSP20 基因的表达载体质粒(pET-OsHSP20)转化至表达菌株 *E. coli* BL21(DE3), 并接种于含氨苄抗生素的固体 LB 培养基, 37℃ 下培养过夜; 第二天转接至大量液体培养基, 以 180 r/min 转速振荡培养, 当 OD₆₀₀ 值约 0.6 时加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)继续振荡培养, 离心收集菌体, 经超声波裂解后, 在 4℃、12 000 r/min 下离心 25 min, 收集上清; 再按照试剂盒说明书, 通过镍柱从上清液中亲和层析纯化重组蛋白。

1.3 多肽抗原设计与合成

根据 OsHSP20 蛋白的氨基酸序列^[10], 应用 B 细胞表位预测程序 ABCpred^[12]筛选多肽表位“DQWHRVERSSGKFLR”, 该多肽经化学合成后偶联至载体蛋白 KLH(Keyhole limpet hemocyanin)上用作抗原(AB-LIND 公司合成)。

1.4 抗体制备和纯化

多肽抗原和纯化蛋白抗原分别溶于磷酸盐(PBS)缓冲液, 加入等体积福氏免疫佐剂, 经完全乳化后作为免疫抗原。然后采用腹腔多点皮下注射的方法免疫家兔, 免疫 3 次后, 采集抗血清并按照商家说明利用亲和层析柱法纯化抗体。

1.5 酸性磷酸酶-酶联免疫吸附试验(ACP-ELISA)

ACP-ELISA 参照文献 [13]的方法进行, 具体步骤如下: 蛋白样品经包被液稀释后, 取 100 μ L 加入 96 孔板中, 4℃ 下包被过夜; 包被后的 96 孔板, 用抗体稀释液(PBST)清洗 3 次; 加入 250 μ L 封闭液(5%脱脂奶粉; 5 g 奶粉加入 100 mL 1×PBS 溶液中溶解), 37℃ 下封闭 0.5 h; 封闭后, PBST 清洗, 每孔加入 100 μ L 一抗稀释液, 37℃ 下反应 1 h, PBST 清洗 3 次, 每次 3 min; 每孔加入 100 μ L 酶标二抗稀释液, 37℃ 下反应 1 h; PBST 清洗后, 每孔加入 100 μ L 显色液, 显色 30~60 min; 用酶标仪测定 OD₄₀₅ 值。

1.6 斑点酶联免疫吸附试验(dot-ELISA)

dot-ELISA 法参照文献报道^[14]的方法, 略有修改。取 2 μ L 蛋白样品点样至硝酸纤维膜上, 室温干燥 10~20 min, 将点样后的硝酸纤维膜移至 PBS 封闭液(含 5%脱脂奶粉)孵育 1 h; 弃去封闭液, 用 PBS 洗膜 3 次, 再加入含一抗的稀释液室温下反应 1 h,

用 PBS 洗膜 3 次后, 于二抗稀释液中反应 1 h; 洗膜 3 次后, 加入 NBT-BICP 进行显色反应。

1.7 SDS-PAGE 和 Western blot

植物组织用液氮研磨成粉末, 加入细胞裂解液(含 0.15 mol/L Tris-HCl, 6% SDS, 2% β -巯基乙醇), 离心取上清, 即为植物总蛋白。提取的总蛋白或纯化蛋白经 SDS-PAGE(浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%)电泳^[15]后, 采用半干转移印系统(BIO-RAD 公司)通过电转移法将蛋白转至硝酸纤维素膜(美国 GE 公司)。经蒸馏水清洗后, 将膜放入含 5% 奶粉的 PBS 中室温封闭 1 h; 用 PBS 洗膜 3 次后, 加入一抗稀释液, 室温下反应 1 h; 用 PBS 洗膜 3 次, 加入二抗稀释液, 室温下反应 1 h; 再用 PBS 洗膜 3 次。然后利用 eECL Western Blot 试剂盒(Millipore 公司)按照商家说明进行显色反应, 应用 Amersham imager 600(美国 GE 公司)成像系统获取图像信号。

2 结果与分析

2.1 OsHSP20 蛋白表达纯化及其多克隆抗体特异性分析

为了表达 OsHSP20, 将重组质粒 pET-OsHSP20 转化至表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 诱导表达 1~3 h 后进行 SDS-PAGE 检测分析。在含重组质粒 pET-OsHSP20 的诱导表达菌株样品中均存在一条与重组蛋白预期分子量大小一致的染色较深的条带(第 3~5 泳道), 约为 37 kDa, 而仅含空载体质粒或含重组质粒但未经诱导的宿主菌样品中则不存在

对应的条带(图 1-A); 采用镍柱亲和层析方法从上清液中可成功纯化该重组蛋白(图 1-A), 表明 OsHSP20 重组蛋白获得正确表达, 且 1~3 h 的诱导表达效果无显著差异。

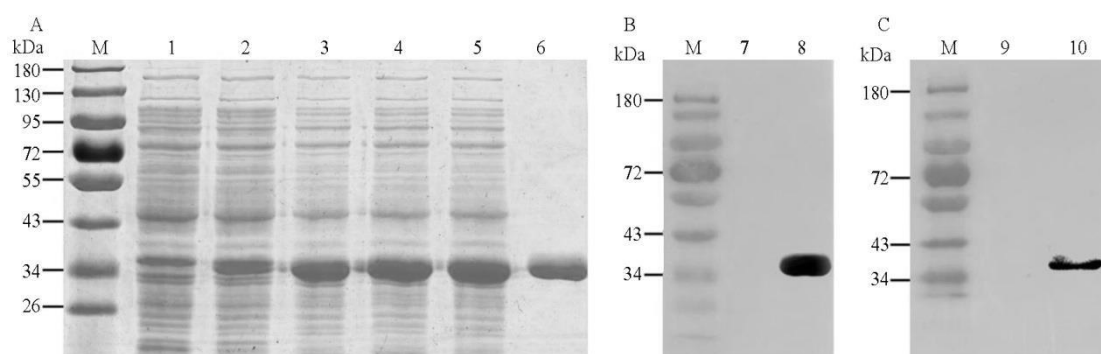
利用重组表达纯化的全长 OsHSP20 蛋白及合成的肽段分别免疫家兔, 制备了两种多克隆抗体。为便于描述, 将由重组全长蛋白制备的多克隆抗体命名为 L 抗体; 由合成短肽制备的多克隆抗体称为 S 抗体。为了分析抗体的特异性, 分别以 L 抗体和 S 抗体作为一抗进行 Western blot 分析(图 1-B 和 C)。两种方法所制备的抗体在诱导表达 OsHSP20 重组蛋白的宿主菌裂解物样品和纯化的 OsHSP20 重组蛋白样品中均检测到一条大小一致的信号条带, 而在不含重组载体质粒的对照大肠杆菌裂解物样品中均未检测到反应信号。因此, 本研究所制备的两种多克隆抗体均能够与目标重组蛋白发生免疫学反应且条带单一, 具有良好的特异性。

2.2 ACP-ELISA 法测定抗体效价

测定两种抗体的效价, 发现应用纯化的重组蛋白制备的抗体效价达到 1:512000(图 2-A), 应用合成肽段方法制备的抗体效价 1:4000(图 2-B)。相比之下, 应用纯化的 OsHSP20 重组蛋白所制备抗体的效价明显高于应用合成多肽所制备抗体。

2.3 dot-ELISA 法分析抗体的灵敏度

为了比较上述两种抗体的灵敏度, 将纯化的 0.5 μ g OsHSP20 重组蛋白进行梯度稀释, 依次点至硝酸纤维素膜上进行斑点杂交实验, 结果如图 3 所示。两种抗体均无法识别牛血清白蛋白(BSA), 但均能



M 为蛋白标记; 第 1、7、9 泳道为诱导的含空载体的 *E. coli* BL21(DE3) 宿主菌样品; 第 2 泳道为未诱导的含 OsHSP20 的宿主菌; 第 3~5 泳道分别为诱导 1、2、3 h 含 OsHSP20 的宿主菌; 第 6 泳道为纯化的 HSP20 蛋白; 第 8、10 泳道为诱导 1 h 含 OsHSP20 的宿主菌。

M, Protein marker; Lanes 1, 7, and 9, *E. coli* BL21(DE3) transformed with plasmid pET-32a(+); Lane 2, *E. coli* BL21 (DE3) harboring recombinant plasmid pET-OsHSP20 without IPTG; Lanes 3-5, *E. coli* BL21 (DE3) harboring recombinant plasmid pET-OsHSP20 induced by IPTG for 1, 2, and 3 h, respectively; Lanes 8 and 10, *E. coli* BL21 (DE3) harboring recombinant plasmid pET-OsHSP20 induced by IPTG for 1 h.

图 1 应用 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析重组 OsHSP20 蛋白的表达(A)和 L 抗体(B)和 S 抗体(C)抗体的特异性

Fig. 1. Analysis of recombinant OsHSP20 (A) and specificity of L and S antibodies (B and C) by SDS-PAGE and Western blot.

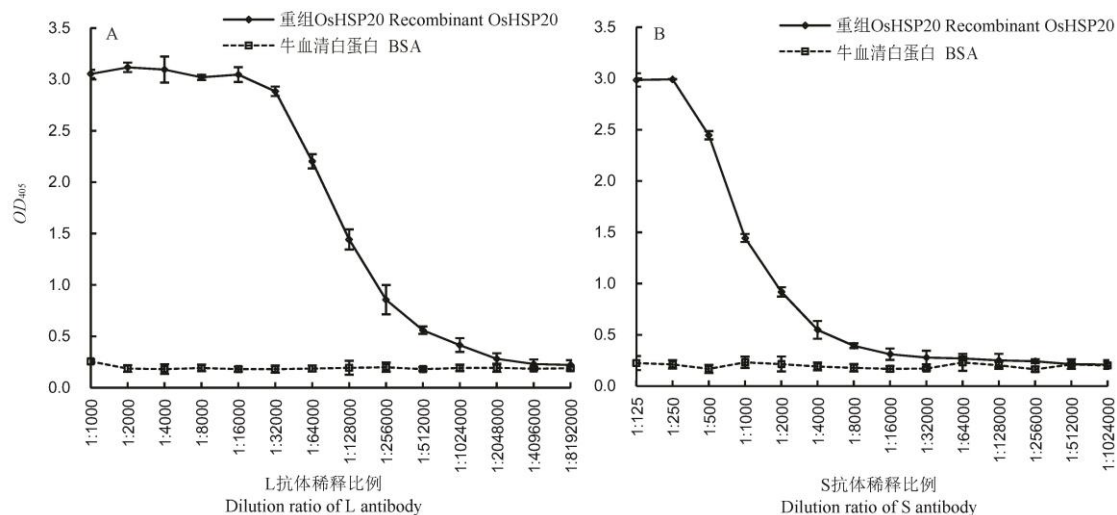
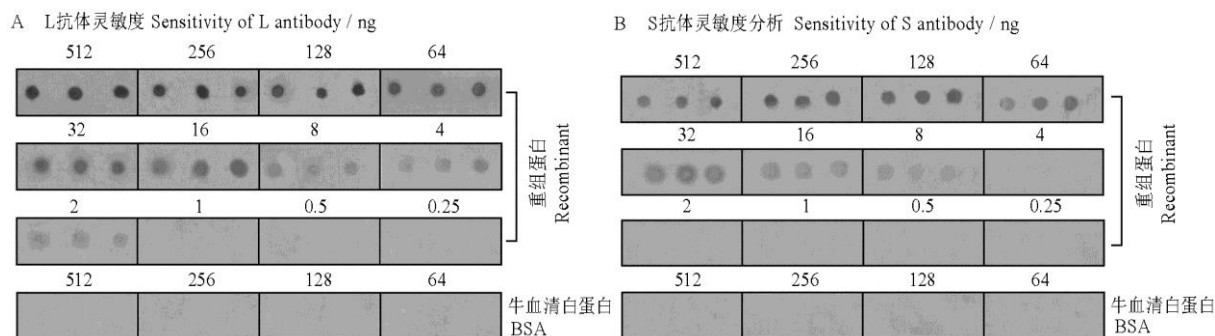


图2 ACP-ELISA 法分析 L 抗体(A)和 S 抗体(B)的效价

Fig. 2. Titer examination of L (A) and L (B) antibodies by ACP-ELISA.



图A、B中均为16组斑点杂交实验,每组3个实验重复。

Sixteen groups of dot-ELISA (three repeats per group).

图3 dot-ELISA 法分析 L 抗体(A)和 S 抗体(B)的灵敏度

Fig. 3. Sensitivity analysis of L (A) and S (B) antibodies by dot-ELISA.

有效识别稀释至 64 倍的重组蛋白抗原(8 ng); 但当重组蛋白抗原稀释至 256 倍(2 ng)时, S 抗体已经检测不到信号, 因此 S 抗体的检测灵敏度约 8 ng; 而 L 抗体一直可有效识别稀释至 256 倍的抗原, 表明其灵敏度可高达 2 ng。

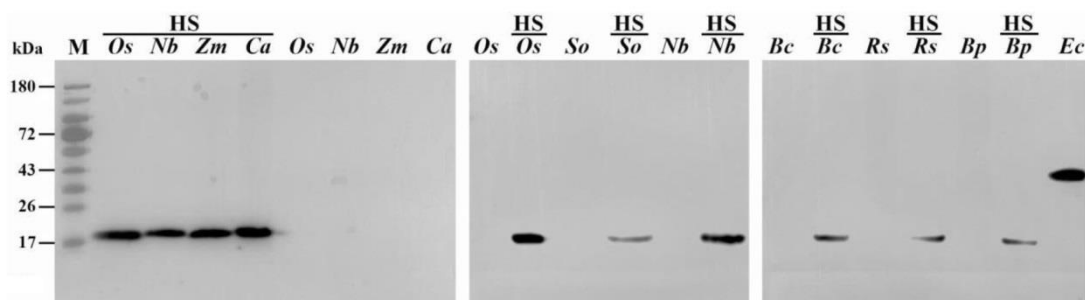
2.4 在检测植物 HSP20 中的应用

为了应用 OsHSP20 多克隆抗体, 我们提取水稻总蛋白并以效价和灵敏度均较高的 L 抗体为一抗进行 Western blot 分析, 发现在 45℃ 热激处理 2 h 的水稻样品中可特异性地检测到一条显色较强的条带, 且分子量与预期大小一致, 而未热激处理的水稻样品中则未检测到相应的条带(图 4)。说明该蛋白是热激诱导蛋白, 可能在高温胁迫逆境中发挥作用。为了确定 L 抗体是否能应用于其他植物 HSP20 的检测, 分别从 45℃ 热激处理 2 h 的玉米、本氏烟、辣椒、大白菜、生菜、青菜、萝卜等植物样品中提

取了总蛋白, 并进行 Western blot 分析(图 4)。L 抗体在所检测的热激处理样品中, 均可检测到大小一致的条带, 而在未热激处理的植物样品也未检测到任何信号, 这些结果表明对应的植物 HSP20 与 OsHSP20 一样, 在正常生长条件下表达水平极低, 甚至检测不到, 而在高温逆境条件下高水平表达, 支持该蛋白在高温逆境下发挥重要作用的推论; 同时也表明本研究所制备的多克隆抗体可广泛地用于检测植物 HSP20。值得注意的是, 不同植物中的杂交信号有强弱, 可能反映这些植物的 HSP20 和 OsHSP20 的同源性存在一定程度上的差异。

3 讨论

抗体是研究蛋白功能的前提条件之一, OsHSP20 是一类在温度逆境下发挥重要作用的功



M 为蛋白 Marker; HS-热激处理; Os-水稻; Nb-本氏烟; Zm-玉米; Ca-辣椒; So-生菜; Ec-重组表达 OsHSP20 蛋白的菌株; Bc-青菜; Rs-萝卜; Bp-大白菜。

M, Protein marker; HS, Heat shock treatment; Os, *Oryza sativa*; Nb, *Nicotiana benthamiana*; Zm, *Zea mays*; Ca, *Capsicum annuum*; So, *Spinacia oleracea*; Ec, *E. coli* expressing recombinant OsHSP20 proteins; Bc, *Brassica chinensis* Linn.; Rs, *Raphanus sativus*; Bp, *Brassica pekinensis*.

图 4 Western blot 检测不同植物体内的 HSP20

Fig. 4. Detection of HSP20s with Western blot in different plant samples.

能蛋白, 目前尚未见有关 OsHSP20 抗体的报道。以 KLH 偶联的合成多肽作为抗原是当前常用的制备抗体的方法之一, 相比以完整蛋白为抗原的抗体制备方法而言, 该方法也有一定的优势, 如简单快速且易获得多肽特异性抗体^[16]。因此, 近年来, 该方法应用也较为广泛。本研究应用该方法制备的 S 抗体表现出良好的特异性(图 1-C); 但从效价和灵敏度来看, 以纯化的重组蛋白作为抗原所制备的 L 抗体具有明显的优势, 因此完整的 OsHSP20 中可能存在丰富的表位, 从 OsHSP20 中筛选免疫原性更好的表位可能有助于进一步提高用 KLH-多肽为抗原所制备抗体的效价和灵敏度。

ACP-ELISA 和 dot-ELISA 是常用的检测抗体效价和灵敏度的方法, 本研究采用 dot-ELISA 法检测两种抗体的效价, 结果表明 L 抗体效价较高。但根据以上结果可知 dot-ELISA 方法检测的效价明显比间接 ELISA 方法高, 其原因可能是由于 ACP-ELISA 中使用的聚苯乙烯酶标板与抗原抗体复合物结合能力较弱; 而 dot-ELISA 中使用的硝酸纤维素膜对蛋白质的亲和力更高^[17-18]。如此, 我们在灵敏度检测时选择 dot-ELISA 方法。有关植物 HSP20 抗体的研究鲜有报道, 本研究制备的 OsHSP20 抗体, 为研究该蛋白功能奠定了良好的基础; 同时证实了该抗体可广泛应用于多种植物来源的同源 HSP20 基因的检测分析, 拓宽该抗体的应用范围, 为直接探索其他植物来源的同源基因功能提供了特异性抗体材料。

参考文献:

[1] Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants.

Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2003, 42(4): 579-620.

[2] Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, Buchner J. Some like it hot: The structure and function of small heat shock proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(10): 842-846.

[3] Arrigo AP. Small stress proteins: Chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol Chem*, 1998, 379(1): 19-26.

[4] Kappe G, Leunissen J A, DeJong W W. Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins. *Prog Mol Subcell Biol*, 2002, 28: 12-17.

[5] Zou J, Liu A, Chen X, Zhou X, Gao G, Wang W. Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment. *Plant Physiol*, 2009, 166(8): 851-861

[6] Scharf K D, Siddique M, Vierling E. The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress Chap*, 2001, 6(3): 225-237.

[7] Li J, Xiang C Y, Yang J, Chen J P, Zhang H M. Interaction of HSP20 with a viral RdRp changes its sub-cellular localization and distribution pattern in plants. *Sci Rep*, 2015, 5: 14016

[8] MacRae T H. Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: Established concepts and emerging ideas. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(6): 899-913.

[9] van Montfort R, Slingsby C, Vierling E. Structure and function of the small heat shock protein/ alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem*, 2002, 59: 105-156.

[10] 项聪英, 蔡年俊, 李静, 羊健, 陈剑平, 张恒木. 一个水稻小热休克蛋白基因的克隆和鉴定. *中国水稻科学*, 2016, 30(6): 587-592.

Xiang C Y, Cai N J, Li J, Yang J, Chen J P, Zhang H M. Cloning and characterization of a small heat shock

- protein (SHSP) gene in rice plant. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(6): 587-592. (in Chinese with English abstract)
- [11] 蔡年俊, 郭留明, 李静, 项聪英, 羊健, 陈剑平, 张恒木. 一个水稻小热休克蛋白的异源表达及寡聚特性分析. *中国水稻科学*, 2017, 31(5): 483-488.
Cai N J, Guo L M, Li J, Xiang C Y, Yang J, Chen J P, Zhang H M. Heterologous expression and oligomeric identification of a small heat shock protein (SHSP) from *Oryza sativa*. *Chin J Rice Sci*, 2017, 31(5): 483-488. (in Chinese with English abstract)
- [12] Saha S, Raghava G P. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Prote-struct Funct & Bioinform*, 2010, 65(1): 40-48.
- [13] 徐宜为. 免疫检测技术. 2 版. 北京: 科学出版社, 1991.
Xu Y W. Immunoassay Technology. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1991. (in Chinese)
- [14] Shang H L, Xie Y, Zhou X P, Qian Y J, Wu J X. Monoclonal antibody-based serological methods for detection of Cucumber green mottle mosaic virus. *Virolog J*, 2011, 8: 228-236.
- [15] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术. 北京: 科学出版社, 2001.
Liang G D. The Newest Experimental Techniques of Molecular Biology. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)
- [16] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998.
Shen G X, Zhou R L. Modern Immunology Experimental Technology. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 1998. (in Chinese)
- [17] 邵健忠, 项黎新. 应用 Dot-ELISA 技术检测草鱼出血病病毒的研究. *水产学报*, 1996, 20(1): 6-12.
Shao J Z, Xiang L X. Study on detection of hemorrhagic disease of grass carp by Dot-ELISA. *J Fish China*, 1996, 20(1): 6-12.
- [18] Salonen E M, Vaheri A. Immobilization of viral and mycoplasma antigens and of immunoglobulins on polystyrene surface for immunoassays. *J Immun Meth*, 1979, 30(3): 209-218.