

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.015

抗 Trx 单克隆抗体用于血吸虫病诊断的研究 *

吴玉龙^{1,2} 程 梅³ 刘春会¹ 耿 丽¹ 张 珍¹ 杜镇镇¹ 李波清¹ 李雍龙⁴

(1 滨州医学院病原生物学教研室 山东 烟台 264003; 2 南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室 江苏 南京 210029;

3 滨州医学院护理学院 山东 滨州 256603; 4 华中科技大学基础医学院人体寄生虫学教研室 湖北 武汉 430030)

摘要 目的:建立双抗体夹心 ELISA 法检测日本血吸虫硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)。方法:用重组日本血吸虫 Trx(rTrx)蛋白免疫 BALB/c 小鼠,筛选高滴度、高特异性的单克隆抗体建立双抗体夹心 ELISA 法。通过检测日本血吸虫排泄-分泌物(excretory-secretions, ES)与 rTrx 的浓度评价该方法的敏感性;通过对健康人血清的检测确定其特异性;通过对布氏姜片吸虫病、华支睾吸虫病、卫氏并殖吸虫病、囊虫病患者血清进行交叉反应试验,评价该方法的特异性。**结果:**获得 2 株稳定分泌抗 rTrx 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株,命名为 McTrx1 和 McTrx2。以 McTrx1 为包被抗体,HRP-McTrx2 为酶标抗体,建立的双抗体夹心 ELISA 可检测出 ES 的最低浓度为 4.8 $\mu\text{g/ml}$,检测出 rTrx 的最低浓度为 1.2 $\mu\text{g/ml}$ 。该方法的特异性为 96 %。**结论:**以抗 rTrx 蛋白单克隆抗体 McTrx1 与 McTrx2 为基础建立的双抗体夹心 ELISA 法具有较高的特异性。

关键词:日本血吸虫;单克隆抗体;硫氧还蛋白;双抗夹心 ELISA

中图分类号:R383.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)06-1057-05

Application of Double Antibody Sandwich ELISA for Detection of Trx of *Schistosoma Japonicum**

WU Yu-long^{1,2}, CHENG Mei³, LIU Chun-hui¹, GENG Li¹, ZHANG Zhen¹, DU Zhen-zhen¹, LI Bo-qing¹, LI Yong-long⁴

(1 Department of Pathobiology of Binzhou Medical University, Yantai, 264003, China; 2 Key lab of Antibody Technique of Health Ministry of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, China; 3 School of Nursing of Binzhou Medical University, Binzhou, 256603, China; 4 Department of parasitology of Tongji medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China)

ABSTRACT Objective: To establish a double antibody sandwich ELISA method for detection of Trx of *Schistosoma japonicum*. **Methods:** BALB/c mice were immunized with recombinant Trx (rTrx) of *Schistosoma japonicum*. The hybridomas that secreted high titer of monoclonal antibodies (mAbs) with high specificity were screened and used to establish the double antibody sandwich ELISA for the detection of rTrx. In order to evaluate the sensitivity of the method, the concentration of ES antigen and rTrx was detected, respectively. Serum samples from healthy people and patients with fasciolopsiasis, clonorchiasis, paragonimiasis, cysticercosis were examined by the same method to estimate the specificity. **Results:** Two hybridoma cell lines, McTrx1 and McTrx2, were developed for secreting mAbs against Trx. The McTrx1 was used as coating antibody, and HRP-labeled McTrx2 as secondary antibody. The double antibody sandwich ELISA detecting Trx was developed with a minimum concentration of 4.8 $\mu\text{g/mL}$ for ES of *Schistosoma japonicum* and 1.2 $\mu\text{g/mL}$ for Trx. An overall specificity of 96 % was determined. **Conclusion:** The double antibody sandwich ELISA based on McTrx1 as coating antibody and McTrx2 as secondary antibody has a high specificity.

Key words: *Schistosoma japonicum*; Monoclonal antibody; Trx; Double antibody sandwich ELISA

Chinese Library Classification(CLC): R383.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)06-1057-05

前言

血吸虫是一种经水传播、经皮肤感染,在人和动物的门脉-肠系膜静脉系统寄生的人兽共患寄生虫,距今已有 2000 余年的历史^[1,2]。其寄生所致的血吸虫病是一种严重的人兽共患寄生虫病。最近的调查显示全球约有 2 亿人感染血吸虫,7.5 亿人受血吸虫感染威胁^[3]。在中国血吸虫病也是一个严重的公共卫生

问题^[4],目前约有 325 824 病人,2 亿人受血吸虫感染威胁^[5]。目前血吸虫病的诊断主要依靠病原学诊断和抗体检测^[6,7]。但病原学诊断漏检率较高,且费时、费力^[8-12];抗体检测敏感性较高,但不能明确患者体内是否存在活虫感染。循环抗原检测从理论上讲可以解决这个问题^[13-18],建立高敏感性的循环抗原检测方法是目前血吸虫病防治中亟待解决的问题之一。

Trx 是一种小分子蛋白质,广泛存在于原核、真核生物中^[19]。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81072429)

作者简介:吴玉龙(1978-),男,硕士,副教授,主要研究方向:病原生物免疫学,电话:15954368650, E-mail: ylongwu@126.com

(收稿日期:2013-07-18 接受日期:2013-08-12)

笔者在前期研究中发现,血吸虫 Trx 在感染者治疗前的血清中高表达,治疗后半年即检测不到,如作为血吸虫病诊断候选靶分子可用于疗效价值考核。因此本研究采用前期研究工作获得的日本血吸虫 Trx 蛋白作为免疫原,制备特异性抗血吸虫 Trx 单克隆抗体,并建立以其为基础的双抗体夹心 ELISA 法。

1 材料与方法

1.1 细胞株和实验动物

小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 细胞由本实验室保存。雌性 BALB/c 小鼠(6~8 w 龄,体重 18~22 g)购自上海斯莱克实验动物中心。

1.2 血清样本来源

采自云南省大理白族自治州、江西省新建县和鄱阳县的血吸虫病阳性血清(粪便孵化法阳性)200 份由本室保存。布氏姜片吸虫病、华支睾吸虫病、卫氏并殖吸虫病患者血清各 20 份由本实验室保存。

1.3 主要试剂和仪器

Trx 蛋白由本实验室制备,50% 聚乙二醇(PEG4000)、辣根过氧化物酶(HRP,RZ>3.0)、次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶、牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)福氏完全和不完全佐剂购自美国 Sigma 公司,RPMI 1640 基础培养基、抗亚型多抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠多抗(HRP-GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3)购自 Gibco 公司,AKATA 蛋白纯化系统购自美国 GE Healthcare 公司,全波长酶标仪为美国 Thermo 公司产品。

1.4 抗 rTrx 单克隆抗体的制备

1.4.1 动物免疫 选择 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠,以 rTrx 于背部皮下多点注射免疫,第 1 次免疫使用 50% 福氏完全佐剂,免疫抗原剂量 100 μ g/只,此后每间隔 2 周加强 1 次。加强免疫使用福氏不完全佐剂,免疫剂量为 50 μ g/只,加强免疫 3 次。细胞融合前 3 d 加强免疫 1 次。无菌取脾,制备脾细胞,用于细胞融合。

1.4.2 细胞融合与杂交瘤细胞株的筛选 细胞融合按照 Kohler 和 Milstein 的方法进行^[20]。免疫小鼠脾细胞与 Sp2/0 骨髓瘤细胞按 1:10 融合,用 50% PEG4000 作融合剂,融合完毕后,用含 HAT 的完全 1640 培养基培养,7 d 后改为含 HT 的完全 1640 培养基,3 w 后换为完全 1640 培养基。以 5 μ g/mL (100 μ L/孔)rTrx 为包被抗原建立间接 ELISA 法筛选阳性克隆。筛选出阳性杂交瘤细胞后用有限稀释法进行亚克隆。待亚克隆后抗体检测阳性率为 100% 时,将细胞扩大培养收集培养上清并冻存细胞株。本实验共获得 4 株分泌抗 rTrx 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,选择亲和力高的 2 株进行实验,分别命名为 McTrx1 和 McTrx2。

1.4.3 抗 rTrx 单克隆抗体的制备及纯化 腹水、杂交瘤细胞培养上清的制备及纯化均按照常规方法进行^[21]。

1.5 抗 rTrx 单克隆抗体的免疫学特性鉴定

1.5.1 抗 rTrx 单克隆抗体免疫球蛋白类与亚类鉴定 采用间接 ELISA 法分析,将杂交瘤细胞培养上清加入包被好 rTrx 的酶标板中反应,酶标二抗为 HRP-GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3,重复 5 次。

1.5.2 抗 rTrx 单克隆抗体效价测定 采用间接 ELISA 法,重复 5 次。

1.5.3 抗体分泌稳定性测定 按常规方法进行,重复 5 次。

1.6 双抗体夹心 ELISA 法的初步建立

1.6.1 HRP 标记抗体 按照改良过碘酸钠法的常规流程对两株纯化的 IgM 抗体进行 HRP 标记,然后检测酶标抗体的 A_{280} 、 A_{405} 值,并计算克分子比(E/P)。同时用 ELISA 法测定酶标抗体的活性。

1.6.2 优化双抗体夹心 ELISA 反应条件的确定采用棋盘滴定法,包板单抗(McTrx1)浓度分别为 0.5、1、2、4、8 和 16 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C 封闭 4 h,0.05% 吐温-20/PBS(PBST,pH 7.4)洗涤 3 次,加不同稀释度的酶标抗体 McTrx2(1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600 和 1:3 200),37 $^{\circ}$ C 作用 30 min,洗涤后每孔加入底物(四甲基联苯胺,TMB)和过氧化氢(H_2O_2)各 50 μ L 显色 15 min,加入 2 mol/L H_2SO_4 50 μ L 终止显色;自动酶标仪检测 A_{450} 值,确定最终反应条件。

1.6.3 双抗体夹心 ELISA 法灵敏度评价 阳性钉螺逸出尾蚴,感染昆明种小鼠,喂养 40~45 天,处死小鼠,打开腹腔,游离肝脏、肠道,于肝门、肠系膜动静脉游离活的日本血吸虫成虫,0.9% 无菌生理盐水洗涤 3 次,37 $^{\circ}$ C 培养 30 min,15000 rpm 离心 5 min,弃沉渣,收集日本血吸虫 ES,经检测蛋白浓度为 9.6 mg/mL。分别将 ES 与 rTrx 稀释至 960、96、19.2、9.6、4.8、2.4、1.2、0.6 和 0.3 μ g/mL。以建立的双抗体夹心 ELISA 法进行检测,评价该方法的灵敏度。阴性对照为 9.6 mg/mL BSA。以 P/N>2.1 倍判为阳性。重复 5 次。

1.6.4 双抗体夹心 ELISA 法的敏感性和特异性评价 采用上述双抗体夹心 ELISA 法检测血吸虫病(200 份)、布氏姜片吸虫病(20 份)、华支睾吸虫病(20 份)、卫氏并殖吸虫病(20 份)和囊虫病(10 份)患者血清和健康人血清(200 份)标本,评价该方法的敏感性和特异性。以经灵敏度评价确定浓度为 1.2 μ g/mL rTrx 作为阳性对照,阴性对照为 9.6 mg/mL BSA。以 A_{450} 值>阴性对照 2.1 倍判为阳性。重复 5 次。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

1 次融合共铺 6 块 96 孔板,其中 541 孔有杂交瘤细胞生长,融合率为 93.9%。融合后第 7 天即检测到抗体。用有限稀释法对效价较高、细胞形态完整的克隆连续进行 4 次亚克隆,获得 4 株分泌抗 rTrx 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,选择其中 2 株亲和力高的杂交瘤细胞系进行实验,分别命名为 McTrx1 和 McTrx2。

2.2 单克隆抗体的免疫学特性鉴定

2.2.1 单克隆抗体免疫球蛋白亚类测定 检测结果表明,这 2 株单抗均为 IgM,未见有其他类和亚类的交叉反应。

2.2.2 单克隆抗体效价测定 杂交瘤细胞株 McTrx1 培养上清效价达 1:12 800,腹水效价为 1:51 200,均远高于杂交瘤细胞株 McTrx2 效价(1:6 400、1:12 800)。

2.2.3 抗体分泌稳定性 连续传代 3 个月后细胞仍生长旺盛,形态良好。间接 ELISA 检测结果显示,3 个月后,McTrx1 的 A_{450} 值仍保持在 1.8 左右,McTrx2 的 A_{450} 值保持在 1.0 左右,表明两株杂交瘤细胞具有稳定分泌抗体的能力(图 1)。

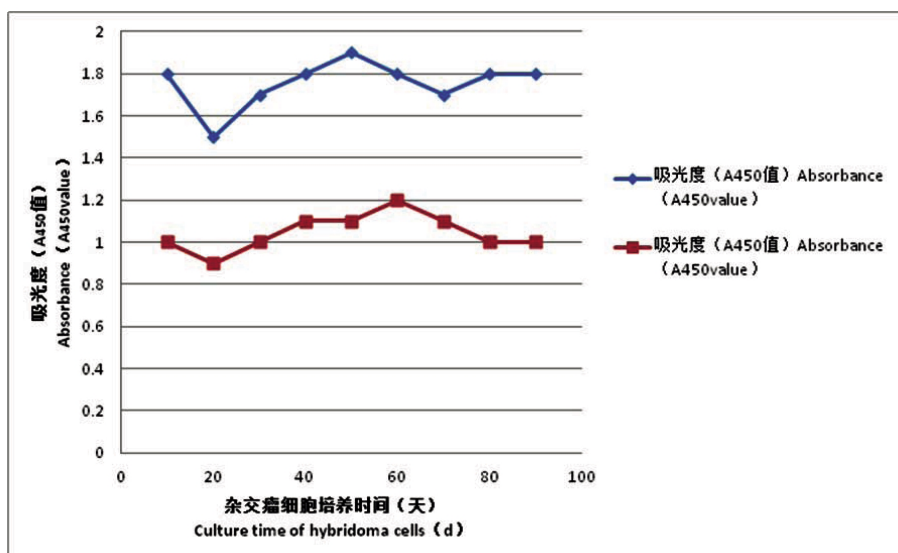


图1 抗体分泌稳定性

Fig.1 Secretion stability of monoclonal antibodies

2.3 双抗体夹心 ELISA 法的初步建立

2.3.1 抗体标记的结果 结果显示,HRP 标记的酶结合物的 E/P 为 1.81,符合酶免疫分析(EIA)标准(1~2);标记率为 0.50,

符合 EIA 0.3~0.6 为最佳的标准;在稀释到 1:12 800 时 HRP 标记的 2 株单抗与 rTrx 抗原仍具有较好的特异性结合能力,表明酶标记抗体仍保持较高的免疫活性(图 2)。

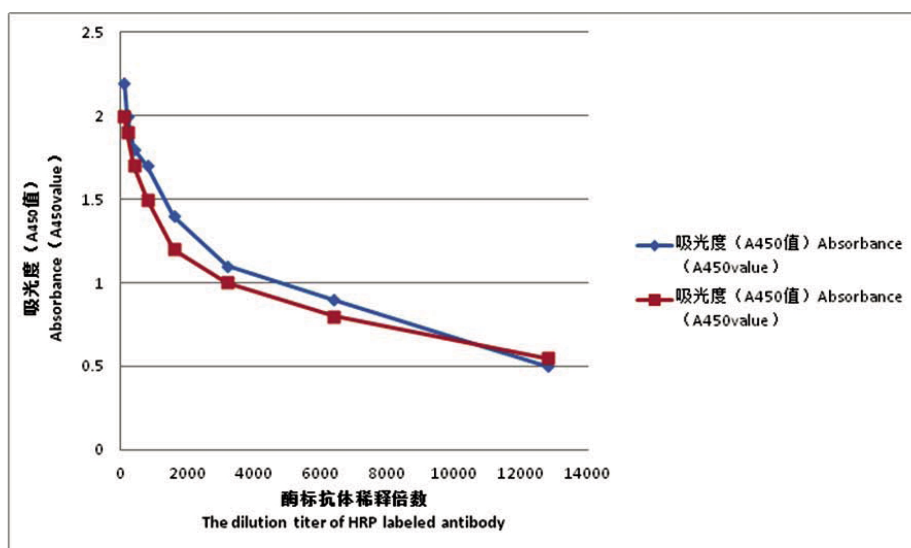


图2 酶标单抗的效价分析

Fig.2 Analysis of the HRP-labeled monoclonal antibodies titers

2.3.2 双抗体夹心 ELISA 法的优化结果 用单抗 McTrx1 包被,4℃ 孵育 16 h,0.05% PBST(pH7.4)洗涤 5 次;加入 5% PB-SM,37℃ 作用 2 h,0.05% PBST(pH7.4)洗涤 3 次;加入待检样品,37℃ 作用 2 h,0.05% PBST (pH7.4) 洗涤 5 次;加入 HRP-McTrx2,37℃ 作用 30 min,0.05% PBST (pH7.4) 洗涤 8 次;每孔加入 TMB、H₂O₂ 各 50 μL,37℃ 显色 15 min;加入 2 mol/L H₂SO₄ 50 μL 终止显色;自动酶标仪检测 A₄₅₀ 值。

2.3.3 双抗体夹心 ELISA 法灵敏度评价 采用上述 ELISA 法分别检测日本血吸虫 ES 与 rTrx,发现可检测出 ES 和 rTrx 的最低蛋白浓度分别为 4.8 μg/mL 和 1.2 μg/mL(表 1)。

2.3.4 双抗体夹心 ELISA 法敏感性和特异性评价 采用上述

ELISA 法分别检测不同寄生虫患者血清和健康人血清标本,200 份日本血吸虫粪便孵化阳性者血清中有 179 份检测结果为阳性,敏感性为 89.5%。与布氏姜片吸虫病(20 份)、华支睾吸虫病(20 份)、卫氏并殖吸虫病(20 份)、囊虫病(10 份)患者血清的交叉反应率分别为:5%、5%、10%、0%,健康人血清(200 份)检测结果均为 192 份阴性,该法的特异性为 96% (8/200)。

3 讨论

尽管目前有数种方案旨在控制感染、降低发病率,但血吸虫病仍然对流行区经济发展有重要影响。长期的监测表明在血

表 1 双抗体夹心 ELISA 法灵敏度评价

Table 1 Evaluation of the sensitivity of the double antibody sandwich ELISA

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	A450 value	
	ES	Trx
960	1.411	2.437
96	1.207	1.988
19.2	0.833	1.621
9.6	0.420	1.035
4.8	0.300	0.772
2.4	0.201	0.509
1.2	0.156	0.371
0.6	0.118	0.218
0.3	0.089	0.178

注: 阴性对照 A450 值为 0.109。

Note: Negative control: A450 value=0.109.

吸虫病流行区需要准确、快速的诊断方法。然而,在血吸虫病免疫诊断中,目前应用最多的是抗体检测法。自血清中或尿中检测血吸虫抗体,检出率较高,但基于抗体检测的血吸虫病诊断方法很难克服其固有的缺点:难以区分现症感染、既往感染和重复感染,试剂标准化、结果的表述和数据的正确解释比较困难。循环抗原检测理论上可以有助于解决上述问题。

血吸虫从童虫到发育为成虫大约需要 22 d,在这个时间段内没有虫卵排出体外,目前作为诊断靶标的抗原或抗体大部分尚未出现,所以很难针对这一时期的血吸虫感染作出诊断。本研究选择血吸虫 Trx 作为循环抗原的诊断靶点主要是因为 Trx 在血吸虫感染早期高表达而治疗后迅速下降。同时,由于 Trx 存在于血吸虫生活史中的大部分时期,因此,理论上讲以 Trx 作为靶抗原进行检测,其应用范围将非常广泛。将患者血清中的 Trx 作为诊断靶标既可以作血吸虫病早期诊断又可以区分现症感染、既往感染。

但由于从虫体中提取的天然 Trx 难以纯化,为了避免这个问题提高抗原纯度,前期研究中我们通过体外表达获得了 rTrx,经测序证实 rTrx 蛋白的核酸序列与 GenBank 公布的序

列同源性高达 100%。本研究用重组血吸虫 Trx(rTrx)免疫小鼠,按单克隆抗体制备常规方法获得了 4 株分泌抗 rTrx 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,选择其中 2 株亲和力和高的杂交瘤细胞系(McTrx1 和 McTrx2)进行实验。研究表明:McTrx1 和 McTrx2 均能与 rTrx 和天然 Trx 蛋白发生特异性反应;而且 HRP 标记后仍具有较高的免疫活性。因此,本研究以 McTrx1 作为包被抗体,HRP-McTrx2 作为酶标抗体,建立了检测日本血吸虫 Trx 循环抗原的双抗体夹心 ELISA 法。

研究结果显示本研究建立的双抗体夹心 ELISA 法检测出的最低 ES 蛋白浓度为 4.8 $\mu\text{g/mL}$,最低 rTrx 浓度为 1.2 $\mu\text{g/mL}$ 。这说明该法可用于血吸虫循环抗原 Trx 的检测。但是,通常双抗体夹心 ELISA 法检测抗原的浓度在 1 $\mu\text{g/mL}$ 以下,这也提示我们:在下一步研究中可通过优化反应条件及提高实验耗材、试剂质量等措施来提高方法的灵敏度。

研究证实,血吸虫 Trx 可以作为血吸虫早期感染(或急性感染)诊断的一个特异性较高的候选分子。我们在对检测方法的评价过程中,所用的 200 份粪便孵化阳性血吸虫病患者血清标本抗体检测结果如下(表 2)。

表 2 血清标本抗体检测结果

Table 2 Result of antibody detection in serum

	No.of positive serum with IgM	No.of negative serum with IgM
No.of positive serum with IgG	55	21
No.of negative serum with IgG	124	0

本实验结果与上述结果比较,发现 179 份血吸虫 IgM 抗体阳性的样品经本研究建立的方法检测结果亦为阳性,表明检测血吸虫 Trx 循环抗原与检测血吸虫特异性 IgM 抗体具有一致性。而 IgM 抗体在血清中的消长规律同样证实了我们的研究结果。本研究建立的方法检测健康人群、布氏姜片吸虫病、华支睾吸虫病、卫氏并殖吸虫病、囊虫病患者的血清,阳性率分别为 4 %、5 %、5 %、10 %、0 %。

本研究首次报道可通过血清中 Trx 的检测诊断血吸虫病,

本实验建立的检测血吸虫循环抗原 Trx 的双抗体夹心 ELISA 法,可用于血吸虫感染的早期临床诊断,为进一步应用该方法检测患者血清的循环抗原奠定了基础。为增加实验结果的可信性,进一步验证本研究所建立的检测方法在血吸虫感染中应用的可行性,下一步我们将扩大检测范围,改进试验方法,提高其可用性。

参考文献(References)

- [1] David RC.Schistosomiasis:overview of the history, biology, clinico-

- pathology, and laboratory diagnosis [J]. Clin Microbiol Newsl, 2005, 27: 163-169
- [2] Gryseels B, Polman K, Clerinx J, et al. Human schistosomiasis [J]. Lancet, 2006, 368: 1106-1118
- [3] Steinmann P, Keiser J, Bos R, et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk [J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6: 411-425
- [4] Zhu R, Darren JG, Trift AP, et al. A 5-year longitudinal study of schistosomiasis transmission in Shian village, the Anning River Valley, Sichuan Province, the Peoples' Republic of China [J]. Parasit Vectors, 2011, 43
- [5] 雷正龙, 郑浩, 张利娟, 等. 2010 年全国血吸虫病疫情通报 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(6): 599-604
- Lei Zheng-long, Zheng Hao, Zhang Li-juan, et al. Schistosomiasis situation in People's Republic of China in 2010 [J]. Chin J Schisto Control, 2011, 23(6): 599-604
- [6] Shazly SE, Saadany SE. Schistosomiasis [J]. Tanta Med Sci J, 2006, 1: 1-10
- [7] Feldmeier H, Poggensee G. Diagnostic techniques in schistosomiasis control [J]. A review. Acta Trop, 1993, 52: 205-220
- [8] Engels D, Sinzinkayo E, Gryseels B. Day-to-day egg count fluctuation in Schistosoma mansoni infection and its operational implications [J]. Am J Trop Med Hyg, 1996, 54: 319-324
- [9] Yu JM, de Vlas SJ, Yuan HC, et al. Variations in fecal Schistosoma japonicum egg counts [J]. Am J Trop Med Hyg, 1998, 59: 370-375
- [10] Utzinger J, Booth M, N'Goran EK, et al. Relative contribution of day-to-day and intra-specimen variation in faecal egg counts of Schistosoma mansoni before and after treatment with praziquantel [J]. Parasitology, 2001, 122: 537-544
- [11] Bergquist NR. Present aspects of immunodiagnosis of schistosomiasis [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992, 87 (Suppl 4): 29-38
- [12] Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni [J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1972, 14: 397-400
- [13] 吴玉龙, 张炜明, 刘文琪, 等. 抗 SEA 鸡卵黄抗体用于血吸虫循环抗原检测的初步研究 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(12): 2416-2418.
- Wu Yu-long, Zhang Wei-ming, Liu Wen-qi, et al. Detection of circulating schistosome antigen with anti-SEA chicken immunoglobulin Y [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(12): 2416-2418
- [14] 查任远, 沈继龙, 汪学龙. 抗 rSj14-3-3 单克隆抗体检测循环抗原及疗效考核价值的初步研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2004, 39(3): 204-207
- Cha Ren-yuan, Shen Ji-long, Wang Xue-long. Evaluation of anti-rSj14-3-3 monoclonal antibody on detection of circulating antigen [J]. Journal of Anhui Medical University, 2004, 39 (3): 204-207
- [15] 裴丽妹, 冯正, 张永红, 等. 多克隆与单克隆抗体夹心 ELISA 法检测日本血吸虫病患者血清循环抗原 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18(2): 92-93
- Qiu Li-shu, Feng Zheng, Zhang Yong-hong, et al. Circulating antigen detection in schistosomiasis japonica by sandwich ELISA using polyclonal and monoclonal antibodies [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2000, 18(2): 92-93
- [16] Wang Xiu-zhen, Li Shi-tao, Zhou Zao-xi. A rapid one-step method of EIA for detection of circulating antigen of Schistosoma japonicum [J]. Chin Med J, 1999, 112(2): 124-128
- [17] 蒋健敏, 张素娥, 施晓华, 等. 量化检测日本血吸虫循环抗原的初步研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(1): 65-67
- Jiang Jian-min, Zhang Su-e, Shi Xiao-hua, et al. Preliminary study on quantitative determination of circulating antigens of Schistosoma japonicum [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2006, 22(1): 65-67
- [18] 朱南昌, 管晓虹, 杨小红, 等. 抗 rSjCTPI 单克隆抗体检测血吸虫循环抗原的研究 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2000, 13(4): 285-287
- Zhu Yin-chang, Guan Xiao-hong, Yang Xiao-hong, et al. Study on detection of circulating schistosome antigen with anti-rSjCTPI monoclonal antibody [J]. Chin J Parasit Dis Con, 2000, 13 (4): 285-287
- [19] Nakamura H. Thioredoxin and its related molecules: update 2005 [J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(5-6): 823-828
- [20] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. Nature, 1975, 256: 495-497
- [21] Harlow E, Lane D. Monoclonal Antibodies. Harlow E, Lane D, eds. Antibodies: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 139-312

(上接第 1032 页)

- [19] Horiike N, Md Fazle Akbar S, Ninomiya T, et al. Activation and maturation of antigen presenting dendritic cells during vaccine therapy in patients with chronic hepatitis due to hepatitis B virus [J]. Hepatol Res, 2008, 23: 38-47
- [20] 王永华, 庄乾元, 胡志全, 等. B7-H1 阻断对 CD3AK 细胞体外生物学活性的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(8): 671-673
- Wang Yong-hua, Zhuang Qian-yuan, Hu Zhi-quan, et al. Effects of B7-H1 blockade on biological activity of CD3AK cells in vitro [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2009, 25(8): 671-673
- [21] Nakazawa A, Dotan I, Bifman J, et al. The expression and function of costimulatory molecules B7-2 and B7-H1 on colonic epithelial cells [J]. Gastroenterology, 2004, 126: 1347-1357
- [22] Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion [J]. Nat Med, 2002, 8: 793-800