

文章编号:1002-2694(2007)06-0527-05

适于 HIV-1 p24 抗原检测试剂的单抗制备与筛选*

郭永利,陈毅歆,黄德党,罗海峰,葛胜祥,程通,张军,夏宁邵

摘要:目的 制备抗 HIV-1 p24 单克隆抗体(单抗,McAb),并利用双抗体夹心 ELISA 法建立 HIV-1 p24 抗原检测试剂。方法 以基因工程原核重组抗原 HIV-1 p24 蛋白免疫 BALB/c 小鼠,利用常规杂交瘤技术和间接 ELISA 法制备单克隆抗体,单抗经纯化和 HRP 标记后,利用双抗体夹心 ELISA 筛选检测 p24 蛋白的最佳配伍单抗以期建立 HIV-1 p24 抗原检测试剂。结果 成功筛选到 16 株稳定分泌抗 HIV-1 p24 单抗的杂交瘤细胞株,并从中筛选出最佳单抗配伍组合“16G12 + 2F2b-HRP”,该组合对 p24 蛋白的检测灵敏度为 20 pg/mL,对感染性克隆 pNL4-3 表达的 HIV 病毒培养上清检测呈阳性,对 100 份 HIV 阴性人血清无非特异性反应,显示出良好的检测灵敏度和特异性。结论 本研究初步成功地建立了 HIV-1 p24 抗原的检测试剂,并为最终建立 HIV 第四代诊断试剂(HIV Ag/Ab Assay)奠定了坚实的基础。

关键词: HIV-1;p24 蛋白;单克隆抗体;夹心 ELISA

中图分类号: R376 **文献标识码:** A

Preparation and selection of the monoclonal antibody used for kits to detect the p24 antigen of HIV-1

GUO Yong-li, CHEN Yi-xin, HUANG De-dang, LUO Hai-feng,
GE Sheng-xiang, CHEN Tong, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development of Infectious Diseases,
The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering
of Xiamen University, Research Center of Medical Molecular Virology of Fujian Province,
School of Life science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: To prepare the monoclonal antibody (McAb) used for kits to detect the p24 antigen of HIV-1 by means of double-antibody sandwich ELISA assay, BALB/c mice were immunized with purified recombinant p24 protein of HIV-1, and by routine hybridoma technique, 16 hybridoma cell lines secreting potent McAb against HIV p24 antigen were obtained. The subtype of these 16 McAb was found to be IgG1 and their cross-blocking properties were analyzed, when they reacted with the p24 protein in direct ELISA in order to offer the valuable data for selecting feasible pair of McAb in the detection of the p24 antigen. All the McAbs were used for the detection of p24 antigen by double-antibody sandwich ELISA. In addition, the McAbs were purified and HRP-labelled in advance. Finally, we had successfully screened a pair of McAbs, i.e. 16G12 + 2F2b-HRP, which exhibited a sensitivity of 20 pg/ml for the detection of p24 antigen. Also, this pair of McAbs could specifically react with the supernatants of the cultured HIV-1 from pNL4-3 transfected clone, but it showed no reactivity with 100 negative sera of patients. It is evident that this pair of McAb shows excellent sensitivity and specificity for the detection of the HIV-1 p24 antigen.

KEY WORDS: HIV-1; p24; monoclonal antibody; Sandwich ELISA

人类免疫缺陷病毒(HIV)是一种含双拷贝单股正链 RNA 的包膜病毒,属逆转录病毒科慢病毒属灵长类免疫缺陷病毒亚属。已发现的人免疫缺陷病毒有两型:HIV-1 和 HIV-2,其中 HIV-2 毒力较弱,流行范围主要局限于西部非洲,而 HIV-1 则在全球广泛流行,也是引起我国 AIDS 流行的主要病原体。据 WHO 官方报道^[1],截止 2005 年 12 月,全球已有 HIV 感染者和 AIDS 患者 4 030 多万,2005 年有超

过 300 万 HIV 感染者死亡。据国家卫生部截止 2005 年底的统计数字^[2]显示,我国约有 HIV 感染者和 AIDS 患者 65 万,2005 年因 HIV 死亡约 2.5

*国家十五攻关项目(2004BA719A08),福建省科技重大专项(2004yz01-1)

通讯作者:夏宁邵,Email: nsxia@xmu.edu.cn

作者单位:厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,福建省医学分子病毒学研究中心,厦门 361005

万人,且 HIV 疫情在中国已呈现出由高危人群向一般人群扩散趋势。因此对 HIV 的日常监测和筛查已成为公共卫生的重要工作。目前我国 HIV 筛查仍以检测抗 HIV 抗体为主,但 HIV 抗体检测一般存在 4~6 周的窗口期^[5],在控制用血安全方面仍有一定缺陷。

HIV 衣壳蛋白 p24 在 HIV 感染后体内抗体阳转前的急性期即可大量产生,是患者体内 HIV 病毒复制和 HIV 病毒载量的重要指标^[4-6]。通过检测患者体内 p24 蛋白可以有效缩短 HIV 检测窗口期,并可作为临床 HIV 抗病毒治疗效果评估的依据。本研究利用自行表达的基因工程重组抗原 HIV-1 p24 蛋白作为免疫原筛选高亲和力抗 p24 单克隆抗体,并用于建立 HIV-1 p24 抗原检测试剂。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞、病毒、血清和动物 HIV 感染性克隆 pNL4-3,质粒 pTO-T7^[7],小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0-Ag14(Sp2/0),HIV 病毒培养上清,HIV 标准阳性血清、HIV 阴性人血清、BALB/c 小鼠等材料均为本实验室自行保藏或提供。*E. coli* ER2566 菌株购自 New England Biolabs 公司。

1.2 试剂 PEG1500、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基嘌呤、DMSO、HRP 等化学药品均购自 Sigma 公司。RPMI 1640 基础培养基购自 Gibco 公司。胎牛血清购自 Hyclone 公司。碱性磷酸酶二抗 (AP-GAH) 为 Protos 公司产品。抗亚型多抗和辣根过氧化物酶标记的抗亚型多抗 (HRP-GAM IgG 及 HRP-GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3) 购自 Becton Dickinson 公司。

1.3 HIV-1 p24 克隆的构建及表达 HIV-1 p24 基因源自 pNL4-3 质粒,以 pTO-T7 为表达载体构建非融合表达质粒 pTO-T7-p24,表达菌株采用 *E. coli* ER2566,表达产物经饱和硫酸铵沉淀及 HPLC 离子交换层析法纯化。克隆构建及蛋白的表达和纯化依据标准方法操作^[8]。

1.4 HIV-1 p24 蛋白印迹实验 (Western Blotting)

纯化的 HIV-1 p24 蛋白经 12% 的 SDS-PAGE 电泳分离,以 HIV 标准阳性血清为一抗,以 HIV 阴性血清为对照,AP-GAH 为酶标二抗,以常规方法操作^[8]。

1.5 单克隆抗体的制备 选用 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠,以 HIV-1 p24 蛋白经皮下注射免疫,初免与等量福氏完全佐剂混合,免疫剂量为 100 μ g/只,此后每隔两周加强一次,加强免疫与不完全福氏佐剂混合,免疫剂量为 50 μ g/只,加强免疫

四次。融合前 3 d 再以静脉注射 100 μ g p24 蛋白做最后加强免疫。细胞融合、克隆化、腹水制备及纯化均按照常规方法进行^[9]。

1.6 单抗一般特性的鉴定 杂交瘤细胞培养上清及腹水中单抗滴度的测定采用间接 ELISA 法。单抗类与亚型的鉴定采用间接 ELISA 法分析,将合适稀释度的单抗腹水加入预包被 p24 蛋白的微孔板中反应,酶标二抗为 HRP-GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3。

1.7 NaSCN 置换 ELISA^[10-11] 纯化后的 p24 抗原预先溶解于 20mmol/L 的醋酸盐缓冲液 (CB, pH 9.6) 中,按 100ng/孔包被于 96 孔聚苯乙烯微孔板 (微孔板) 上,37 $^{\circ}$ C 吸附 2h,4 $^{\circ}$ C 过夜;PBST 洗板 1 次,按 200 μ L/孔加入封闭液 (含 2% 明胶、0.2% 的酪蛋白和 2% 蔗糖的 PBS),37 $^{\circ}$ C 封闭 2h;扣干后按 100 μ L/孔加入纯化单抗 (20 μ g/mL, PBS),37 $^{\circ}$ C 温育 30min;PBST 洗板 3 次,扣干后按 100 μ L/孔分别加入 0、2 和 3 mol/L 的 NaSCN (Sodium thiocyanate) 溶液,室温温育 15min;PBST 洗板 5 次,扣干后加入 GAM 酶标二抗 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温育 30min;PBST 洗板 5 次,扣干后加入显色剂,37 $^{\circ}$ C 反应 15min 后终止、读值。最后用 2 和 3 mol/L NaSCN 处理孔反应值与 0 mol/L NaSCN 处理孔反应值的比值百分比来表示不同单抗对 NaSCN 的耐受能力,即单抗与 P24 抗原的亲合力,耐受浓度越高,亲合力也越大。

1.8 阻断 ELISA 单抗的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记采用改良过碘酸钠法^[12]。PBS 百倍稀释的单抗腹水 (对照为 PBS) 100 μ L/孔加入预包被 p24 抗原的微孔板中,37 $^{\circ}$ C 温育 30min;PBST 洗板 3 次,扣干后加入各合适浓度的 HRP-McAb 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温育 30min;PBST 洗板 5 次,扣干后显色读值。根据以下公式计算阻断率,阻断率 = (对照孔 OD 值 - 反应孔 OD 值) / 对照孔 OD 值 %,阻断率大于 50% 认为有阻断,以“+”表示;小于 50% 认为无阻断,以“-”表示。

1.9 双抗体夹心 ELISA 纯化单抗预先溶解于 20mmol/L 磷酸缓冲液 (PB, pH 7.4) 融解,按 100ng/孔包被于微孔板,4 $^{\circ}$ C 过夜,PBST 洗板一次后封闭 2h (方法同上);再加入含有 p24 蛋白的样品,37 $^{\circ}$ C 温育 30min;PBST 洗板 5 次,扣干后加入合适浓度的 HRP-McAb,37 $^{\circ}$ C 温育 30min;PBST 洗板 5 次,扣干后显色读值。

2 结果

2.1 重组 HIV-1 p24 蛋白的活性 重组 p24 蛋白

在表达和纯化后经 12% SDS-PAGE 蛋白电泳分离和 Western Blotting 鉴定。如图 1 所示,纯化蛋白位于约 25 kD 处,与理论值相符,其纯度在 98% 以上,与 HIV 标准阳性血清反应,与 HIV 阴性血清不反应。说明该重组 p24 蛋白的活性和纯度均满足单抗制备的需要。

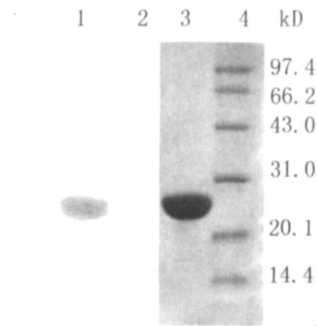


图 1 重组 HIV-1 p24 的蛋白电泳和蛋白印迹实验

Western Blotting: 1: HIV 阳性血清; 2: HIV 阴性血清; SDS-PAGE: 3: p24 蛋白; 4: 蛋白 marker

Fig. 1 Characterization of recombinant HIV-1 p24 by SDS-PAGE and Western Blotting

1. Western Blotting of p24 by HIV positive serum;
2. Western Blotting of p24 by HIV negative serum;
3. SDS-PAGE of purified recombinant p24;
4. protein marker

2.2 杂交瘤细胞株的建立 利用常规杂交瘤制备技术和间接 ELISA 法筛选到 16 株稳定分泌抗 HIV-1 p24 单抗的杂交瘤细胞,分别命名为: 1H1、1H3、1E4、1E7、2C7、2F2b、4G3、5C2、5F8、6F12、7D1、7F12、8F1、9D6、11F11 和 16G12。上述单抗分别经腹腔诱导法制备高滴度特异性的单抗腹水。

2.3 单抗滴度和亚型 采用间接 ELISA 法检测系列稀释的杂交瘤培养上清及腹水中单抗的滴度。结果培养上清滴度为 $10^3 \sim 10^4$, 腹水滴度为 $10^5 \sim 10^7$ 。分型结果显示, 16 株单抗均属 IgG1。

2.4 单克隆抗体的活性 采用蛋白印迹实验分别检测 16 株单抗与沸水浴处理 10min 的 p24 蛋白的反应性,结果如图 2 所示, 16 株单抗对热处理变性后的 p24 蛋白均有特异性反应,表明这 16 株单抗的识别表位是一种不依赖于 p24 蛋白空间结构的线性表位。值得注意,不同单抗对 p24 蛋白的聚体带和降解带的反应存在差别,说明不同单抗识别的表位结构性质可能有别。

2.5 单抗与 p24 抗原的亲合力 利用 NaSCN 置换 ELISA 分析各单抗结合 p24 抗原亲合力的高低。结果发现, 2F2b、5C2 和 16G12 等 3 株单抗对 2 mol/L 和 3 mol/L NaSCN 的耐受能力均接近 100%,

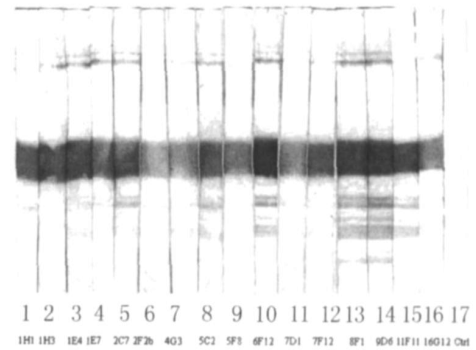


图 2 抗 p24 单抗与 p24 抗原的蛋白印迹实验, p24 蛋白在电泳前经沸水浴热处理 10min. Ctrl = control

Fig. 2 Western blotting of anti p24 McAbs against p24 antigen, p24 protein were treated in boiled water bath for 10 min before electrophoresis. Ctrl = control

说明此 3 株单抗亲合力最高;其次是单抗 1H3,其耐受 2 mol/L 和 3 mol/L NaSCN 的能力约 80%;再次是 1H1、2C7 和 9D6 等 3 株单抗,仅能耐受 2 mol/L NaSCN 约 60%;其余 9 株单抗均不耐受 2 mol/L NaSCN,说明其结合 p24 抗原的亲合力最弱。

2.6 单抗间相互阻断情况 利用阻断 ELISA 分析 16 株不同单抗间的相互阻断情况(表 1),结果显示, 5C2 能阻断 14 株, 8F1、9D6 和 1H3 等 3 株单抗分别能阻断 13 株, 1H1 阻断 11 株, 11F11 阻断 10 株, 5F8 阻断 9 株, 7F12 阻断 8 株, 而 1E7 和 1E4 均可阻断 3 株, 4G3、2F2b 和 16G12 等 3 株单抗只阻断 2 株, 7D1、6F12 和 2C7 等 3 株单抗均只阻断 1 株,提示后八株单抗更适宜建立检测 p24 蛋白的双抗体夹心 ELISA。

2.7 HIV-1 p24 抗原检测试剂的建立 将 16 株单抗进行一一配对建立检测 HIV-1 p24 抗原的双抗体夹心 ELISA 法,结果发现, 1E4、2F2b、16G12、1E7、4G3 和 7D1 等 6 株单抗的多数配伍组合检测 p24 蛋白的灵敏度可达 100 pg/mL。其中 1E4、2F2b 和 16G12 等 3 株单抗组成的 6 种配伍组合较好,对 p24 蛋白的检测灵敏度均可达 20 pg/mL(图 3);而 1H3、11F11、5C2、2C7、9D6 和 8F1 等 6 株单抗配伍组合较差,部分组合检测 p24 蛋白的灵敏度仅达 4 000 pg/mL;其余 4 株单抗 1H1、5F8、7F12 和 6F12 的配伍组合最差,检测 p24 蛋白的灵敏度均低于 4 000 pg/mL。

为进一步比较 1E4、2F2b 和 16G12 等 3 株单抗组成的 6 种配伍组合检测 p24 蛋白的灵敏度,将 HIV 感染性克隆 pNL4-3 表达的 HIV 培养病毒灭活后进行系列稀释检测(表 2),结果可见,最佳单抗

表 1 抗 p24 单抗的交叉阻断 ELISA

Tab.1 Cross-blocking ELISA among the anti-p24 McAbs

McAb	Anti-p24 McAb- HRP																No
	5C2	8F1	9D6	1H3	1H1	11F11	5F8	7F12	1E7	1E4	4G3	2F2b	16G12	7D1	6F12	2C7	
5C2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	14
8F1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	13
9D6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	13
1H3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	13
1H1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	11
11F11	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	10
5F8	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	9
7F12	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	8
1E7	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	3
1E4	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	3
4G3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
2F2b	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
16G12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	2
7D1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
6F12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
2C7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1

No: 16 株单抗阳性阻断某一特定单抗的个数; +: 有阻断效果; -: 无阻断效果; - -: 有增强效果

No: the number of 16 McAbs which can block positively any given McAb in this test; +. positive block; -. negative block; - -. reactivity of 2C7 with p24 antigen was enhanced

配伍组合“16G12 + 2F2b-HRP”(前者表示包被单抗,后者表示酶标单抗)的检测灵敏度达 1 : 3 200。同时,用 100 份 HIV 阴性人血清分析上述 6 种配伍组合的检测特异性,由表 3 可知,配伍组合“16G12 + 2F2b-HRP”和“1E4 + 2F2b-HRP”的特异性最好,都无非特异性反应;其余 4 种配伍组合都有 2% ~ 4% 的非特异性反应。综上结果可知,单抗配伍组合“16G12 + 2F2b-HRP”具有最好的检测灵敏度和特异性,适合用于 HIV-1 p24 抗原检测试剂的研制。

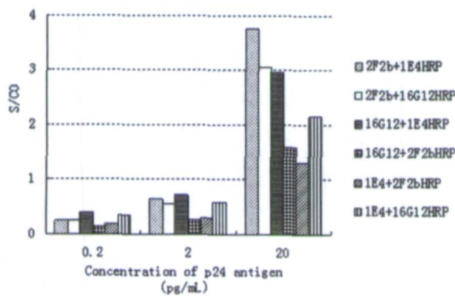


图 3 双抗体夹心 ELISA 检测 p24 蛋白的灵敏度
S/CO: 样品 OD 读值与 cutoff OD 读值之比,比值大于 1 判定为阳性。

Fig.3 Sensitivity in detecting p24 antigen by Sandwich ELISA
S/CO: sample-to-cutoff ratios, positive when the value exceed 1

表 2 双抗体夹心 ELISA 比较六种抗 p24 单抗配伍组合检测 HIV 培养病毒稀释液的灵敏度

Tab.2 Sensitivity comparison of six pairs of anti-p24 McAb in detecting serial diluted HIV culture viruses by double antibody Sandwich ELISA

McAb	2F2b-HRP	1E4-HRP	16G12-HRP
2F2b	Nd	1600 *	1600
1E4	800	nd	800
16G12	3200	1600	nd

*: 检测 HIV 培养病毒稀释液的最大稀释倍数; nd: 未检测

*: Maximum diluted times of HIV culture virus which indicate positive in the test; nd. Not detected

表 3 双抗体夹心 ELISA 比较六种 p24 单抗配伍组合对 100 份 HIV 阴性人血清的特异性

Tab.3 Specificity of six pairs of anti-p24 McAbs in detecting 100 human HIV negative sera by double antibody Sandwich ELISA

McAb	2F2b-HRP	1E4-HRP	16G12-HRP
2F2b	/	4	4
1E4	0	/	3
16G12	0	2	/

3 讨论

本研究利用自行表达的基因工程重组蛋白 p24 作为免疫原,成功筛选出 16 株稳定分泌抗 HIV-1

p24 单抗的杂交瘤细胞株,通过阻断实验和双抗体夹心 ELISA 一一配对筛选,最终筛选到 1 对最佳单抗配伍组合“16G12 + 2F2b-HRP”,其检测 p24 蛋白的灵敏度可达 20 pg/mL,且对 1 份倍比稀释的灭活 HIV 培养病毒检测灵敏度最高,而对 HIV 阴性人血清无非特异性反应,提示这对单抗用于 HIV-1 p24 抗原检测试剂的研制具有较好的灵敏性和特异性。

快速有效筛选最佳单抗配伍组合是建立 HIV-1 p24 抗原检测试剂的难点。本研究总结了如下 3 点经验:第一、单抗间交叉阻断 ELISA 是 1 个直接有效的筛选方法,交互阻断率低的单抗所组成的配伍在双抗体夹心 ELISA 中会有较好的灵敏度。第二、间接 ELISA 中反应性较好的单抗未必适于建立双抗体夹心 ELISA,这可能与 p24 蛋白在不同反应体系中的表位暴露情况有关。间接 ELISA 是将 p24 蛋白直接包被于固相板上,天然多聚体 p24 在包被后可能解聚,这是 1 种固相反应体系;而双抗体夹心 ELISA 不会破坏 p24 蛋白的天然多聚体,是 1 种液相反应体系。显然,此两种反应体系中的 p24 蛋白所暴露的抗原表位是不同的,故存在单抗 2F2b、1E4 和 16G12 在双抗体夹心 ELISA 中检测 p24 蛋白灵敏度最高,但在间接 ELISA 中与 p24 蛋白的反应性却非最高这一现象。第三、NaSCN 置换 ELISA 分析单抗亲和力有助于单抗配伍组合的筛选但不是决定性因素,如本研究最终确定的单抗配对 2F2b 和 16G12 均可耐受 3 mol/L NaSCN 溶液,但并非所有耐受 3 mol/L NaSCN 的单抗(如单抗 5C2 和 1H3)均可适用于双抗体夹心 ELISA,此两株单抗在双抗体夹心中灵敏度较低。

参考文献:

[1] World Health Organization. AIDS Epidemic Update [R/OL]: December 2005. <http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/epiupdate2005/en/>

- [2] 卫生部,联合国艾滋病规划署和世界卫生组织. 2005 年中国艾滋病疫情与防治工作进展. http://www.moh.gov.cn/news/more_index.aspxvtp_class=C602&url_addr=/news/sub_index.aspx
- [3] Hashida S, Hashinaka K, Nishikata I, et al. Shorting of the window period in diagnosis of HIV-1 infection by simultaneous detection of p24 antigen and antibody IgG to p17 and reverse transcriptase in serum with ultrasensitive enzyme immunoassay [J]. *Journal of Virological Methods*, 1996, 62: 43-53.
- [4] Stramer S, Heller J, Coombs R, et al. Markers of HIV infection prior to IgG antibody seropositivity [J]. *JAMA*, 1989, 262: 64-69.
- [5] Allain J P, Laurian Y, Paul D A, et al. Serological markers in early stages of HIV infection in hemophilicacs [J]. *Lancet*, 1986, ii: 1233-1236.
- [6] Alter H J, Epstein J S, Swenson S G, et al. Prevalence of human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen in U. S. blood donors—an assessment of the efficacy of testing in donor screening [J]. *New England Journal of Medicine*, 1990, 323:1312-1317.
- [7] 罗文新,张军,杨海杰,等.一种带增强子的原核高校表达载体的构建及初步应用 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16:53-57.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁,等译. 2 版. 北京: 科学出版社, 1993: 880-897.
- [9] 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.
- [10] Pullen G R, Fitzgerald M G, Hosking C S. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution [J]. *J Immunol Meth*, 1986, 86:83-87.
- [11] Ross T M, Xu Yan, Bright R A, et al. C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge [J]. *Nature Immunology*, 2000, 1(2): 27-131.
- [12] Tijssen P, Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays [J]. *Anal Biochem*, 1984, 136:451-457.

收稿日期:2006-10-26;修回日期:2007-01-29