

文章编号: 1000-7423(2010)-05-0343-05

【论著】

双抗夹心 ELISA 法检测弓形虫核苷三磷酸脱氢酶- II 型蛋白的研究

胡昕¹, 诸葛青云², 李亚飞¹, 潘长旺², 谭峰^{2*}

【摘要】 目的 建立双抗夹心 ELISA 法检测弓形虫核苷三磷酸脱氢酶- II 型(NTPase- II)蛋白。方法 用重组弓形虫 NTPase- II (rTgNTPase- II)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夹心 ELISA 法。通过检测弓形虫速殖子全虫蛋白与 rTgNTPase- II 的浓度评价该方法的敏感性。通过对疟疾(7 例)、日本血吸虫病(12 例)、并殖吸虫病(14 例)和脑囊尾蚴病(10 例)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 rTgNTPase- II 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 MNT1 和 MNT2。蛋白质印迹分析(Western blotting)显示, 2 株单克隆抗体均能特异性识别弓形虫 rTgNTPase- II 蛋白和弓形虫速殖子全虫蛋白。以 MNT1 为包被抗体, MNT2 为酶标抗体, 建立的双抗夹心 ELISA 可检测出全虫蛋白的最低浓度为 6 $\mu\text{g/ml}$, 检测出 rTgNTPase- II 的最低浓度为 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 。该方法的特异性为 100%。结论 以抗 rTgNTPase- II 蛋白单克隆抗体 MNT1 与 MNT2 为基础建立的双抗夹心 ELISA 法具有较高的特异性。

【关键词】 刚地弓形虫; 单克隆抗体; 核苷三磷酸脱氢酶- II 型蛋白; 双抗夹心 ELISA

中图分类号: R531.8 文献标识码: A

Application of Double Antibody Sandwich ELISA for Detection of Nucleoside Triphosphate Hydrolase- II Protein of *Toxoplasma gondii*

HU Xin¹, ZHUGE Qing-yun², LI Ya-fei¹, PAN Chang-wang², TAN Feng^{2*}

(1 School of Medical Laboratory Science and School of Life Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 2 School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

【Abstract】 **Objective** To establish a double antibody sandwich ELISA method for detection of nucleoside triphosphate hydrolase- II (NTPase- II) protein of *Toxoplasma gondii*. **Methods** BALB/c mice were immunized with recombinant NTPase- II (rTgNTPase- II) protein of *T. gondii*. 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 rTgNTPase- II. In order to evaluate the sensitivity of the method, the concentration of whole-tachyzoite lysate and rTgNTPase- II was detected, respectively. Serum samples from patients with malaria (7 cases), schistosomiasis (12 cases), paragonimiasis (14 cases) and cysticercosis (10 cases) were examined by the same method. **Results** Two hybridoma cell lines, MNT1 and MNT2, were developed for secreting mAbs against rTgNTPase- II. Western blotting analysis showed that the two mAbs specifically recognized rTgNTPase- II and whole-tachyzoite lysate. The MNT1 was used as coating antibody, and HRP-labeled MNT2 as secondary antibody. The double antibody sandwich ELISA detecting rTgNTPase- II was developed with a minimum concentration of 6 $\mu\text{g/ml}$ for whole-tachyzoite lysate and 1.5 $\mu\text{g/ml}$ for rTgNTPase- II. An overall specificity of 100% was determined. **Conclusion** The double antibody sandwich ELISA based on MNT1 as coating antibody and MNT2 as secondary antibody has a high specificity.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; Monoclonal antibody; Nucleoside triphosphate hydrolase- II protein; Double antibody sandwich ELISA

Supported by the Social Development Fund of Science and Technology Department of Zhejiang Province (No. 2009C33035)

* Corresponding author, E-mail: tanfengsong@163.com

基金项目: 浙江省科技厅面上社会发展项目 (No. 2009C33035)

作者单位: 1 温州医学院生命科学学院、检验医学院, 温州 325035; 2 温州医学院基础医学院, 温州 325035

* 通讯作者, E-mail: tanfengsong@163.com

刚地弓形虫是一种专性细胞内寄生的机会致病性原虫,在人和动物的有核细胞内寄生和繁殖,引起人兽共患弓形虫病。在弓形虫速殖子膜表面存在核苷三磷酸脱氢酶(nucleoside triphosphate hydrolase, NTPase),该酶是弓形虫为适应宿主细胞内环境获得嘌呤的寄生机制而产生的,对弓形虫的寄生和繁殖具有重要意义^[1]。

弓形虫 NTPase 蛋白有 NTPase- I 和 NTPase- II 两个亚型^[2,3]。编码 NTPase 基因的核苷酸序列由 3 个连续的开放读码框架(ORF)组成,分别为 NTP1、NTP2 和 NTP3。其中 NTP2 不具备编码蛋白的能力,而 NTPase- I 和 NTPase- II 是分别与编码基因 NTP3 和 NTP1 相对应的一组同工酶。其中 NTPase- I 仅存在于有毒株,而 NTPase- II 几乎存在于所有弓形虫虫株^[1]。以 NTPase- II 蛋白作为靶抗原进行检测将具有更广泛地应用前景。因此,本研究采用前期研究工作获得的重组弓形虫 NTPase- II (rTgNTPase- II)蛋白作为免疫原,制备特异性抗弓形虫 NTPase- II 单克隆抗体,并以两株单克隆抗体为基础建立双抗体夹心 ELISA 法。

材料与方 法

1 材 料

1.1 虫株、细胞株和实验动物 刚地弓形虫 RH 株由浙江省医学科学院寄生虫病研究所惠赠,于温州医学院寄生虫学实验室进行小鼠腹腔常规接种传代。Sp2/0 骨髓瘤细胞由本室保存。雌性 BALB/c 小鼠购自上海斯莱克实验动物中心,6~8 周龄,20 g 左右。

1.2 血清来源 5 份弓形虫 DNA 阳性者血清(2 份为弓形虫 IgM、IgG 抗体阳性,1 份为弓形虫 IgM 抗体阳性而 IgG 抗体阴性,另外 2 份则为弓形虫 IgG 抗体阳性而 IgM 抗体阴性)和 15 份健康人血清(符合弓形虫 IgM、IgG 抗体阴性和弓形虫 DNA 阴性),由浙江省诸暨市人民医院检验科骆方军主任提供。7 份疟疾患者血清、10 份脑囊尾蚴病患者血清、12 份日本血吸虫病患者血清和 14 份并殖吸虫病患者血清由温州医学院寄生虫学教研室保存。

1.3 主要试剂和仪器 重组 rTgNTPase- II 由本室制备^[5],福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂、50%聚乙二醇[PEG,相对分子质量(M_r)为 1 500]、HAT 培养液和单克隆抗体免疫球蛋白亚类检测试剂盒(ISO2)购自美国 Sigma 公司,蛋白 A 亲和层析柱(nprotein A sepharose 4FF)购自美国 GE Healthcare 公司,表达载体 pBAD-HisB 购自美国 Invitrogen 公司。辣根过氧化物酶(HRP, RZ>3.0)购自上海西宝生物科技有限公司,镍-次氨基三乙酸(Ni-NTA)树脂和 Ni²⁺-NTA 层析柱

购自上海申能博彩生物科技有限公司。全自动酶标仪(Elx 800 型)为奥地利 KIALAB 公司产品。

2 方 法

2.1 单克隆抗体的制备

2.1.1 动物免疫 重组蛋白 rTgNTPase- II 与佐剂乳化后,于背部皮下多点免疫 BALB/c 小鼠,每次抗原免疫剂量 50 μ g/只,注射 100 μ l,共免疫 3 次,每次间隔 2 周。其中,第 1 次免疫使用福氏完全佐剂,后 2 次使用福氏不完全佐剂。细胞融合前 3 d 用 PBS 稀释纯化的 rTgNTPase- II (250 μ g/只)再次腹腔注射免疫小鼠。3 d 后无菌取脾,制备脾细胞,用于细胞融合。

2.1.2 细胞融合与筛选 免疫小鼠脾细胞与 Sp2/0 骨髓瘤细胞按 1:5 融合,融合剂为 50% PEG,以 HAT 培养液进行选择培养。以 5 μ g/ml(100 μ l/孔) rTgNTPase- II 为包被抗原建立间接 ELISA 法筛选阳性克隆。对阳性杂交瘤细胞进行有限稀释法克隆。待 3 次亚克隆后抗体检测阳性率为 100%时,将细胞扩大培养。取经产 BALB/c 小鼠制备腹水,收集备用。同时对阳性杂交瘤细胞进行常规培养,待上清液变黄,收集上清液备用。本实验共获得两株分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,将其命名为 MNT1 和 MNT2。

2.1.3 单克隆抗体纯化 杂交瘤细胞培养上清和腹水用 0.2 μ m 孔径的微孔膜过滤,除去较大的凝块和脂肪滴。将处理过的样品分别依次用 50%、33%饱和硫酸铵沉析 1 次,再通过蛋白 A 亲和层析柱,收集、合并洗脱液中含蛋白的部分,浓缩后贮存备用。

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鉴定 采用单克隆抗体免疫球蛋白试剂盒的亚类检测试剂盒测定单克隆抗体阳性的杂交瘤细胞培养上清,重复 3 次。

2.2.2 单克隆抗体效价测定 将杂交瘤细胞培养上清与腹水以 1:100~1:102 400 进行倍比稀释,间接 ELISA 法检测所分泌的 IgG 抗体效价,重复 3 次。

2.2.3 抗体分泌稳定性测定 两株杂交瘤细胞连续传代 3 个月及液氮冻存后复苏,间接 ELISA 法检测两株杂交瘤细胞所分泌的 IgG 抗体效价,重复 3 次。

2.2.4 蛋白质印迹(Western blotting)分析 将 rTgNTPase- II、含表达载体 pBAD-HisB 的 BL-21/DE3 细菌裂解液、弓形虫 RH 株速殖子全虫抗原经 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至硝酸纤维素膜,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜后,分别与杂交瘤细胞上清、Sp2/0 细胞上清进行 Western blotting 分析。含 pBAD-HisB 的 BL-21/DE3 细菌裂解液为阴性对照,弓形虫 RH 株速殖子全虫抗原为阳性对照。试验重复 3 次。

2.3 双抗体夹心 ELISA 法的初步建立

2.3.1 辣根过氧化物酶标记抗体 采用改良过碘酸钠法, 将两株纯化的 IgG2a 抗体标记辣根过氧化物酶后, 检测酶标抗体吸光度 (A_{280} 、 A_{403} 值), 计算克分子比 (E/P)。同时将酶标抗体以 1:100~1:12 800 进行倍比稀释后, 加入已包被抗原的反应板, 37 °C 反应 1 h 后显色读取吸光度 (A_{450} 值)。

2.3.2 优化双抗体夹心 ELISA 反应条件 采用方阵滴定法, 将纯化的单抗 MNT1 稀释成 0.5、1、2、5、10 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 等 6 个浓度包被酶标板, 37 °C 封闭 2 h, 0.05% 吐温-20/PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次, 加不同稀释度的酶标抗体 MNT2 (1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600 和 1:3 200), 37 °C 作用 45 min, 洗涤后加入四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色 2 h, 在未变色的条件下选择尽可能大的包被抗体和酶标抗体工作浓度。根据上述指标的测定, 确定最终反应条件。

2.3.3 双抗体夹心 ELISA 法灵敏度评价 将弓形虫 RH 株速殖子反复冻融后超声裂解虫体, 提取速殖子全虫蛋白, 经检测蛋白浓度为 1 200 $\mu\text{g/ml}$ 。分别将全虫蛋白与 rTgNTPase- II 稀释至 120、12、6、3、1.5、0.75 和 0.375 $\mu\text{g/ml}$ 。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 1 200 $\mu\text{g/ml}$ 牛血清白蛋白。以 A_{450} 值 > 阴性对照 2.1 倍判为阳性。重复 3 次。

2.3.4 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 法检测弓形虫病 (5 份)、疟疾 (7 份)、日本血吸虫病 (12 份)、并殖吸虫病 (14 份) 和囊虫病 (10 份) 患者血清和健康人血清 (15 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 1.5 $\mu\text{g/ml}$ rTgNTPase- II 作为阳性对照, 阴性对照为 1 200 $\mu\text{g/ml}$ 牛血清白蛋白。以 A_{450} 值 > 阴性对照 2.1 倍判为阳性。重复 3 次。

结 果

1 杂交瘤细胞株的建立

1 次融合共铺 6 块 96 孔板, 其中 534 孔有杂交瘤细胞生长, 融合率为 92.7%。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 3 次克隆, 筛选出 2 株高亲和力的杂交瘤细胞系, 分别命名为 MNT1 和 MNT2。

2 单克隆抗体的免疫学特性鉴定

2.1 单克隆抗体免疫球蛋白亚类测定 检测结果表明, 这 2 株单抗属于相同类和亚类, 均为 IgG2a, 未见有其他类和亚类的交叉反应。

2.2 单克隆抗体效价测定 杂交瘤细胞株 MNT1 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 MNT2 效价 (1:6 400、1:12 800)。

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, MNT1 的 A_{450} 值仍保持在 1.9 左右, MNT2 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)。

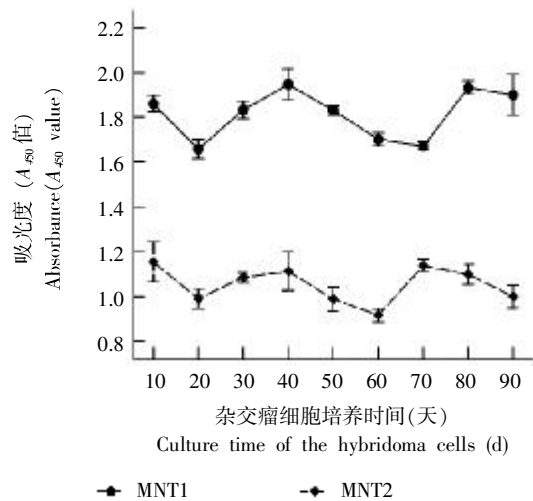
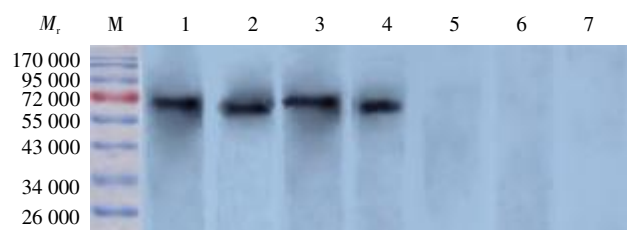


图 1 抗体分泌稳定性
Fig.1 Secretion stability of monoclonal antibodies

2.4 Western blotting 分析 结果显示, MNT1 和 MNT2 两株单抗与 rTgNTPase- II 在约 M_r 70 000 处发生特异性结合, 与全虫抗原在约 M_r 63 000 处发生特异性结合。而两株单抗与两个阴性对照组 (Sp2/0 细胞培养上清、BL-21/DE3 细菌裂解液) 均未发生反应 (图 2)。



M: 蛋白质标志物; 1: 纯化 rTgNTPase- II 与 MNT1 反应; 2: 全虫抗原与 MNT1 反应; 3: 纯化 rTgNTPase- II 与 MNT2 反应; 4: 全虫抗原与 MNT2 反应; 5: 纯化 rTgNTPase- II 与 Sp2/0 上清反应; 6: 全虫抗原与 Sp2/0 上清反应; 7: 含 pBAD-HisB 的 BL21 裂解液与两株单抗+ Sp2/0 上清的混合液反应。
M: Protein marker; 1: Purified rTgNTPase- II reacted with MNT1; 2: Whole-tachyzoite lysate reacted with MNT1; 3: Purified rTgNTPase- II reacted with MNT2; 4: Whole-tachyzoite lysate reacted with MNT2; 5: Purified rTgNTPase- II reacted with Sp2/0 cell supernatant; 6: Whole-tachyzoite lysate reacted with Sp2/0 cell supernatants; 7: BL21 cell lysate containing pBAD-HisB reacted with a pool of supernatants from two hybridoma cells and Sp2/0 cell.

图 2 MNT1 和 MNT2 单抗的 Western blotting 鉴定结果
Fig.2 Western blotting identification of MNT1 and MNT2 monoclonal antibodies

3 双抗体夹心 ELISA 法的初步建立

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 1.76, 符合酶免疫分析 (EIA) 标准 (1~2); 标记率为 0.54, 符合 EIA 0.3~0.6 为最佳的标准。将 HRP 标记的 2 株 IgG2a 型抗体进行系列稀释、反应。测得的 A_{450} 值显示 HRP 标记的 2 株单抗均保留了与 rTgNTPase-II 抗原特异性结合能力, 表明酶标记抗体仍保持较高的免疫活性(图 3)。

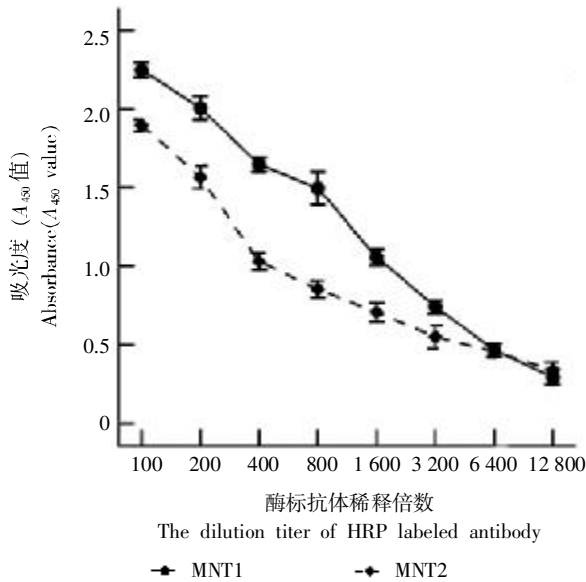


图 3 酶标单抗的效价分析

Fig.3 Analysis of the HRP-labeled monoclonal antibodies titers

3.2 双抗体夹心 ELISA 法的优化结果 对双抗体夹心 ELISA 法进行优化, 即用单抗 MNT1 包被, 4 °C 孵育 12 h, 洗涤液 (0.05%吐温 20/PBS, pH 7.4) 洗涤 3 次; 加入 5%小牛血清, 37 °C 作用 60 min, 洗涤液洗涤 3 次; 加入待检样品, 37 °C 作用 45 min, 洗涤液洗涤 5 次; 加入酶标抗体 MNT2, 37 °C 作用 45 min, 洗涤液洗涤 5 次; 加入 TMB 底物, 37 °C 显色 15~20 min; 加入 2 mol/L H_2SO_4 终止显色; 自动酶联仪检测 A_{450} 值。

3.3 双抗体夹心 ELISA 法灵敏度评价 采用上述 ELISA 法分别检测弓形虫速殖子全虫蛋白与 rTgNTPase-II, 发现可检测出全虫蛋白和 rTgNTPase-II 的最低蛋白浓度分别为 6 $\mu\text{g/ml}$ 和 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (表 1)。

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病患者血清和健康人血清标本, 5 份弓形虫 DNA 阳性者血清中有 3 份检测结果为阳性, 敏感性为 3/5。与疟疾(7份)、日本血吸虫病(12份)、并殖吸虫病(14份)和囊虫病(10份)患者血清无交叉反应, 健康人血清 (15份) 检测结果均为阴性, 该法的特异性为 100% (0/58)。

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

浓度 ($\mu\text{g/ml}$) Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	A_{450} 值 A_{450} value	
	全虫蛋白 Whole-tachyzoite lysate	rTgNTPase-II
1 200	1.203	2.695
120	0.774	1.956
12	0.400	1.047
6	0.289	0.756
3	0.202	0.413
1.5	0.176	0.295
0.75	0.128	0.211
0.375	0.097	0.198

注: 阴性对照 A_{450} 值为 0.118。

Note: Negative control: A_{450} value=0.118.

讨 论

在弓形虫病免疫诊断中, ELISA 法是当前应用最广的检测技术。采用间接 ELISA 法检测弓形虫抗体, 检出率较高, 但由于患者机体的抗体应答被抑制、早期抗体水平低、有交叉反应以及无法进行现症感染诊断和疗效考核等因素的影响, 使得通过检测血清抗体诊断弓形虫病尚不可靠, 应用范围受到限制。若直接检测弓形虫循环抗原, 则有助于解决上述问题。

本研究选择弓形虫 NTPase 作为循环抗原的诊断靶点基于以下几点: ① 依赖二硫苏糖醇 (DTT) 激活的 NTPase 仅存在于刚地弓形虫和犬新孢子虫体内, 而迄今为止尚无人感染犬新孢子虫的文献报道^[6,7], 因此, 这应该是目前诊断弓形虫感染的一个特异性较高的指标; ② NTPase 基因在弓形虫速殖子阶段高表达而在缓殖子阶段被下调^[8], 利用该特性可将其用于弓形虫早期感染 (或急性感染) 特异性诊断; ③ NTPase 是弓形虫速殖子时期的主要蛋白, 占整个虫体蛋白的 2%~8%^[6], 且 NTPase 是弓形虫速殖子侵入宿主细胞后才分泌至血液中成为循环抗原^[9]。由于弓形虫急性感染患者血清中可能含有大量可被宿主免疫系统所识别的 NTPase 抗原, 具有作为诊断抗原的潜力。Kikuchi 等^[10]用一株特异性抗 NTPase 单克隆抗体建立的生物素-亲和素夹心 ELISA 法, 可分别检测出弓形虫 RH 株与 ME49 株感染小鼠血清中的 NTPase 含量。

由于弓形虫 NTPase-II 存在于包括弱毒株的绝大多数速殖子内, 因此, 理论上讲, 以 NTPase-II 作为靶抗原进行检测, 其应用范围将更加广泛。但由于天然 NTPase-II 需从虫体中提取, 难以纯化, 因此, 本研究采用重组弓形虫 NTPase-II (rTgNTPase-II) 作为免疫原, 制备了两株特异性单克隆抗体 (MNT1 和 MNT2)。这两株单抗均能与 rTgNTPase-II 和天然 NT-

Pase-Ⅱ蛋白发生特异性反应,且已有研究证实,rTg-NTPase-Ⅱ蛋白的核酸序列与 GenBank 公布的序列同源性高达 100%^[5],说明这两株单抗可特异性识别弓形虫 NTPase-Ⅱ蛋白。而且这两株单抗在 HRP 标记后仍具有较高的免疫活性,因此,本研究以 MNT1 作为包被抗体,酶标 MNT2 作为酶标抗体,建立了检测弓形虫 NTPase-Ⅱ循环抗原的双抗体夹心 ELISA 法。

通常,双抗体夹心 ELISA 法检测抗原的浓度在 1 μg/ml 以下。然而,本研究检测出的最低全虫蛋白浓度为 6 μg/ml,最低 rTgNTPase-Ⅱ浓度为 1.5 μg/ml。其结果一方面证实该法可用于弓形虫 NTPase-Ⅱ循环抗原的检测,但另一方面也说明本实验所检测出的最低蛋白浓度尚未达到双抗体夹心 ELISA 法可检测到的最低量。其原因可能与酶标板的质量、包被抗体与酶标抗体浓度、反应时间以及 HRP 质量等因素有关,因此,在下一步研究中可通过选用国外研制的酶标板和 HRP,以及通过优化反应条件等措施来提高方法的灵敏度。

如前所述,弓形虫 NTPase 应该是目前诊断弓形虫感染的一个特异性较高的指标,应用建立的双抗夹心 ELISA 法进行敏感性和特异性评价,所用 5 份弓形虫 DNA 阳性者的血清标本中,有 2 份为弓形虫 IgM、IgG 抗体阳性,1 份为弓形虫 IgM 抗体阳性而 IgG 抗体阴性,另外 2 份则为弓形虫 IgG 抗体阳性而 IgM 抗体阴性。本实验结果与上述结果比较,发现 3 份弓形虫 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,表明检测弓形虫 NTPase-Ⅱ循环抗原与检测弓形虫特异性 IgM 抗体具有一致性。本研究建立的方法检测健康人群、疟疾、日本血吸虫病、并殖吸虫病和脑囊尾蚴病患者血清,均无阳性结果,表明该方法具有较高的特异性,可用于弓形虫早期感染(或急性感染)的特异性诊断。

本实验建立了检测弓形虫 NTPase 循环抗原的双抗体夹心 ELISA 法,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,有利于弓形虫感染的早期临床诊断。

致谢 感谢浙江省诸暨市人民医院检验科骆方军主任提供弓形虫感染患者阳性血清与健康人血清。

参 考 文 献

- [1] Bermudes D, Peck KR, Afifi MA, *et al.* Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*[J]. J Biol Chem, 1994, 269(46): 29252-29260.
- [2] Asai T, Miura S, Sibley LD, *et al.* Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*[J]. J Biol Chem, 1995, 270(19): 11391-11397.
- [3] Asai T, Kim TJ, Kobayashi M, *et al.* Detection of nucleoside triphosphate hydrolase as a circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii* [J]. Infect Immun, 1987, 55(5): 1332-1335.
- [4] Asai T, Mizuno F, Kojima S, *et al.* High correlation in antibody titers between the Sabin-Feldman dye test and an enzyme-linked immunosorbent assay detecting immunoglobulin G antibodies to the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(5): 1291-1293.
- [5] Sha D, Tan F, Pan CW, *et al.* Expression and antigenicity analysis of NTPase gene of *Toxoplasma gondii*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(6): 447-450. (in Chinese)
(沙丹, 谭峰, 潘长旺, 等. 弓形虫三磷酸核苷水解酶基因克隆、表达与鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(6): 447-450.)
- [6] Asai T, Kanazawa T, Kobayashi S, *et al.* Do protozoa conceal a high potency of nucleoside triphosphate hydrolysis present in *Toxoplasma gondii*[J]. Comp Biochem Physiol, 1986, 85(2): 365-367.
- [7] Asai T, Howe DK, Nakajima K, *et al.* *Neospora caninum*: tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase[J]. Exp Parasitol, 1998, 90(3): 277-285.
- [8] Ferguson DJ, Cesbron-Delauw MF, Dubremetz JF, *et al.* The expression and distribution of dense granule proteins in the enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat[J]. Exp Parasitol, 1999, 91(3): 203-211.
- [9] Sibley LD, Niesman IR, Asai T, *et al.* *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into parasitophorous vacuole[J]. Exp Parasitol, 1994, 79(3): 301-311.
- [10] Kikuchi T, Furuta T, Kojima S. Kinetics of the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii* in mice with acute and chronic toxoplasmosis[J]. Ann Trop Med Parasitol, 2002, 96(1): 35-41.

(收稿日期: 2010-01-20 编辑: 杨频)