DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2004.0029



# 华支睾吸虫的一个 μ 型 GST 基因的表达、纯化与免疫反应性鉴定

伍忠銮，余新炳，吴 德，徐 劲，吴忠道，胡旭初
（中山大学基础医学院寄生虫学教研室，广东 广州 510080）

**摘 要**：【目的】扩增华支睾吸虫一个 μ 型谷胱甘肽转移酶（mu-class glutathione transferase of *Clonorchis sinensis*, CsGSTM）基因，明确是否存在内含子，进行原核表达，纯化其表达产物，鉴定免疫反应性。【方法】用 PCR 方法从成虫 cDNA 文库和基因组中扩增出目的基因，测序，定向克隆到原核表达载体 pET-30a(+)，在大肠杆菌 BL21/DE3 表达，按照 Ni-NTA agarose 说明书纯化重组蛋白，用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）、薄层色谱（thin-layer chromatography, TLC）和免疫印迹（Western blotting）分析。【结果】*CsGSTM* 基因全长 657 bp，没有内含子，构建的原核表达质粒 pET-30a(+)-CsGSTM 在大肠杆菌中得到了有效表达，$M_{r,\text{pET-30a(+)-CsGSTM}} = 31 \times 10^3$。重组蛋白达总蛋白的 39%，纯化后的重组蛋白纯度为 98%，重组蛋白在纯化前后均有免疫反应性。【结论】*CsGSTM* 基因没有内含子，在大肠杆菌中能有效表达，纯化前后的重组蛋白都具有免疫反应性。

**关键词**：华支睾吸虫；谷胱甘肽转移酶；基因表达；免疫印迹；纯化
**中图分类号**：R383.2+2 **文献标识码**：A **文章编号**：1672-3554(2004)02-0105-05

# Expression, Purification and Immunoreactivity Identification of a mu-class Glutathione Transferase Gene of *Clonorchis sinensis*

WU Zhong-luan, YU Xin-bing, WU De, XU Jin, WU Zhong-dao, HU Xu-chu
(Department of Parasitology, Basic Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To amplify the *CsGSTM* gene of adult *Clonorchis sinensis*, determine whether it has intron or not, express it in *Escherichia coli* (*E. coli*), purify the recombinant protein and identify its immunoreactivity. 【Method】 The gene encoding CsGSTM was obtained from the cDNA (plasmid) library and genomic DNA of adult *Clonorchis sinensis* by PCR and was sequenced. The coding Seguence was cloned into the prokaryotic expression vector pET-30a(+) and expressed in *E. coli* BL21/DE3. The recombinant protein was purified according to the protocol of Ni-NTA Agarose (QIAGEN, Germany). It was analyzed by SDS-PAGE, TLC and Western blotting. 【Result】 The full length of the gene encoding *CsGSTM* was 657 bp. It has no intron. The recombinant plasmid pET-30a(+)-CsGSTM was efficiently expressed in *E. coli*, $M_{r,\text{pET-30a(+)-CsGSTM}} = 31 \times 10^3$. The recombinant protein occupied 39% of total bacterial protein. The purity of the purified recombinant protein was 98%. The recombinant protein has immunoreactivity before and after purification. 【Conclusion】 The *CsGSTM* gene of *Clonorchis sinensis* has no intron. Its high efficient expression has been achieved in *E. coli*. The recombinant *CsGSTM* has immunoreactivity before and after purification.

**收稿日期**：2003-08-12
**基金项目**：广东省自然科学基金首批科研团队基金资助项目（2001 年）；广东省科技厅社会发展攻关计划基金资助项目（2002B31005）；广州市科技攻关计划基金资助项目（200223－E4022）
**作者简介**：伍忠銮（1970－），瑶族，女，湖南江华人，博士生；余新炳，教授，通讯作者. E-mail：jmfang@gzsums.edu.cn

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

**Key words:** *Clonorchis sinensis;* glutathione transferase; gene expression; Western blotting; purification

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(2): 105-109]

华支睾吸虫病是广东省目前最严重的寄生虫病，严重威胁人民的身体健康，是迫切需要解决的一个公共卫生问题[1]。寻找有诊断和药物靶标研究价值的蛋白质是采取综合防治措施消灭华支睾吸虫病的重要切入点之一。为此，我室建立了华支睾吸虫成虫 cDNA 质粒文库并进行了大规模的筛选、测序，获得了大量的 EST 和全长基因。谷胱甘肽转移酶(glutathione transferases, GSTs)(EC 2.5.1.18)是一组由多个基因编码的、具有多种功能、广泛存在于从原虫到脊椎动物的各种生物体内的同工酶。它以膜结合形式或胞浆内二聚体形式存在，寄生性蠕虫胞浆内的 GSTs 居多。胞浆内 GSTs 分为 $\alpha$、$\mu$、$\pi$、$\sigma$ 和 $\theta$ 型，各型又分为不同的亚型。Cs-GSTM 属于胞浆内 GSTs，主要位于成虫的皮层(tegument)和实质(parenchyma)。其中皮层细胞胞体最多，输卵管的皮层和卵巢次之，与华支睾吸虫的代谢和生殖有关[2]，且与其他吸虫无交叉免疫反应性[3]，可能是一个理想的诊断和药物靶标分子。本文报告关于 *CsGSTM* 基因的扩增、克隆、在大肠杆菌中的表达、纯化及免疫反应性鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 虫体、血清、文库、质粒和菌株 华支睾吸虫成虫从市场购买的新鲜猫肝中获取，华支睾吸虫病人血清取自粪检阳性的华支睾吸虫病人。cDNA 质粒文库由本室构建，克隆载体为 pBluescript Ⅱ Sk 的改造载体（上海联众科技研究院），含 Sfi ⅠA 和 Sfi ⅠB 接头序列，酶切后可定向插入 cDNA 片段(Sfi ⅠA→Sfi ⅠB)。原核表达质粒 pET-30a(+)由香港中文大学冯明钊教授惠赠。大肠杆菌 DH5$\alpha$、BL21/DE3 由本室保存。

1.1.2 主要试剂和工具酶 TaKaRa Ex *Taq*™ 酶(含 dNTP)、*Eco*R Ⅰ、*Sal* Ⅰ、DNA 标准(DL15000、DL2000)、T4 DNA 连接酶购自大连宝生物工程公司，异丙基硫代-$\beta$-D-半乳糖苷(isopropylthiogalactoside, IPTG)购自美国 promega 公司。Ni-NTA Agarose (Cat. No. 30210) 购自德国 QIAGEN 公司。羊抗人 IgG-过氧化物酶购自武汉博士德生物工程有限公司。二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)购自北京鼎国生物技术有限公司。蛋白质分子标准购自广州威佳科技公司(中科院上海生化研究所产品)。DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、SDS、丙烯酰胺、亚甲双丙烯酰胺、过硫酸胺等试剂购自上海申友生物技术公司。

1.1.3 引物合成 扩增 *CsGSTM* 基因的引物由上海生工生物工程技术公司合成。

### 1.2 方 法

1.2.1 cDNA 文库的筛选及 *CsGSTM* 基因的获得 华支睾吸虫 cDNA 文库经转化 DH5$\alpha$ 感受态细胞，蓝白斑筛选阳性克隆，送上海联众科技研究院测序。那些同时含有 Sfi ⅠA 和 Sfi ⅠB 接头序列的基因是已经测通的基因。用 NCBI 的 ORF FINDER 程序寻找所测序列的完整的阅读框，再用 blastx 程序判定所得到的序列是已知基因还是新基因。其中一个序列(编号为 001c07a)的可读框(ORF)与华支睾吸虫的已知基因— *CsGSTM*(GenBank 的登录号为 L47992)完全一样。

1.2.2 *CsGSTM* 基因的扩增、原核表达质粒的构建及鉴定 根据已测序的 *CsGSTM* 基因的全长编码区序列，利用 DNAclub 和 pcrdesign 软件设计引物。上游引物 P1 为 5′CGGAATTCATGGCTCCCG-TATTGGG 3′，引入了 *Eco*R Ⅰ酶切位点；下游引物 P2 为 5′CGGTCGACTTTAGGGATGCAGGGG3′，引入了 *Sal* Ⅰ酶切位点。两条引物的退火温度相近并且不相互配对，P2 是根据 *CsGSTM* 基因终止密码子后面的第 40-55 位碱基序列设计的。按文献[4]方法提取华支睾吸虫成虫基因组。分别以 CsGSTM 文库质粒和基因组为模板，用 TaKaRa Ex *Taq*™ 酶扩增 *CsGSTM* 基因的反应条件如下：95 ℃预变性 3 min，94 ℃变性 1 min，59 ℃退火 50 s，72 ℃延伸 1 min，共 30 个循环，最后 72 ℃延伸 8 min。PCR 产物用 12 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析后，基因组的 PCR 产物送上海申友生物技术公司测通，文库的 PCR 产物回收，进行 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切，与进行同样双酶切的原核表达载体 pET-30a(+) 按物质量比 3-4∶1 用 T4 DNA 连接酶于 16 ℃连接 18 h。连接产物转化 BL21/DE3 感受态细胞，卡那霉素筛选阳性克隆。对阳性质粒进行 PCR、双酶切和测序鉴定(送上海申友生物技术公司测序)。

1.2.3 *CsGSTM* 基因在大肠杆菌 BL21/DE3 的

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

诱导表达　以含空质粒 pET-30a(+)的 BL21/DE3 为阴性对照。含重组质粒 pET-30a(+)-CsGSTM 的 BL21/DE3 接种于含有卡那霉素的培养基，37 ℃振荡培养过夜后按 10 mL/L 比例转接，在 37 ℃振荡培养至 $A_{600}=0.6$，取出 1.5 mL 菌液作为诱导前样品，加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L) 诱导培养 4 h，取出 1.5 mL 菌液作为诱导后样品。所有样品离心后收集菌体，加入 100 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液裂解后，煮沸 3 min，取 15 μL 行 SDS-PAGE(分离胶 150 g/L，浓缩胶 50 g/L)，用考马斯亮蓝染色，观察有表达后，进行大量表达及纯化。

1.2.4　*CsGSTM* 基因在大肠杆菌 BL21/DE3 的大量诱导表达及在非变性条件下的纯化　参照 Ni-NTA Agarose 说明书进行。37 ℃振荡培养过夜的菌液按 20 mL/L 比例转接至 600 mL 培养液中，在 37 ℃振荡培养至 $A_{600}=0.6$，取出 1.5 mL 菌液作为诱导前样品，加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L) 诱导培养 4 h，取出 1.5 mL 菌液作为诱导后样品。余下菌液 4 000× *g* 离心 20 min，收集沉淀，称重后 -20 ℃过夜。次日将收集的菌体置冰上溶 15 min，每克菌重加入 5 mL 裂解缓冲液重悬后加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL，冰上放置 30 min 后冰上超声破碎(功率 150 W，持续 1 s，停 2 s，共 12 min)，4 ℃ 10 000× *g* 离心 30 min，收集上清，取上清(可溶蛋白)和沉淀(不溶蛋白)分别加入 4 × SDS-PAGE 上样缓冲液和 1 ×SDS-PAGE 上样缓冲液，同前处理样品。每 4 mL 上清加入 1 mL Ni-NTA Agarose，4 ℃ 250 r/min 摇 1 h 后，全部加入层析柱，用 4 mL 洗涤缓冲液洗 2 次后，每次用 1 mL 洗脱缓冲液洗脱，共洗脱 4 次，收集洗脱液(含纯化的重组蛋白)。取洗脱液加入 4 × SDS-PAGE 上样缓冲液，同前处理、电泳及染色，送本校分析测试中心进行 TLC 分析重组蛋白的相对量。

1.2.5　重组蛋白纯化前、后的免疫反应性鉴定　免疫印迹实验按文献[5]方法进行，SDS-PAGE 的分离胶为 180 g/L，浓缩胶为 50 g/L，蛋白分子标准用氨基黑染色。华支睾吸虫病人血清先用饱和的含 pET-30a(+) 的大肠杆菌 BL21/DE3 的菌体蛋白进行初步的纯化后作一抗，稀释度为 1∶500，二抗羊抗人 IgG- 过氧化物酶按说明书稀释，底物显色系统为 DAB-$H_2O_2$。

## 2　结　果

### 2.1　CsGSTM 基因的扩增

用 P1、P2 从文库和基因组中扩增的 PCR 产物在 12 g/L 的琼脂糖凝胶上都是位于 750 bp 与 500 bp 之间的单一条带(图 1)，与预期的大小一致。基因组的 PCR 产物测通后表明 *CsGSTM* 基因没有内含子。

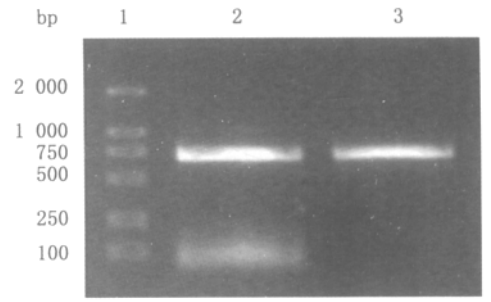



**图 1　从基因组 DNA 和 cDNA 文库 PCR 扩增的 CsGSTM 产物**

**Fig. 1　PCR products of CsGSTM from genomic DNA and cDNA library**

Lane 1: Marker DL2 000; lane 2: PCR product of *GsGSTM* from genomic DNA; lane 3: PCR product of CsGSTM from cDNA library

### 2.2　重组质粒 pET-30a(+)-CsGSTM 的鉴定

PCR、双酶切鉴定(图 2)和测序结果表明原核表达重组质粒 pET-30a(+)-CsGSTM 克隆成功。

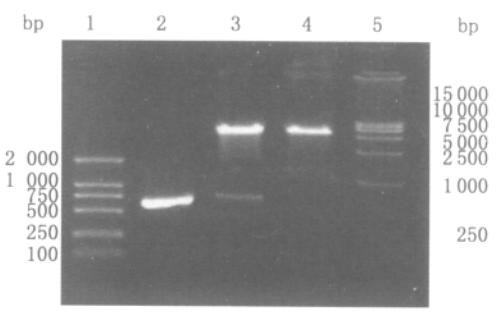



**图 2　原核表达质粒 pET-30a(+)－CsGSTM 的双酶切和 PCR 鉴定**

**Fig. 2　Prokaryotic expression plasmid pET-30(a)－CsGSTM was identified by double enzyme digestion and PCR**

Lane 1: Marker DL2 000; lane 2: PCR product of the recombinant plasmid; lane 3: Recombinant plasmid pET-30a(+)－CsGSTM digested with *Eco*R Ⅰ and *Sal* Ⅰ; lane 4: plasmid pET(30a(+) digested with *Eco*R Ⅰ and *Sal* Ⅰ; lane 5: Marker DL 15 000

### 2.3　CsGSTM 基因在 BL21/DE3 中的表达、纯化

IPTG 诱导后 4 h，重组菌体在 $M_r$ 为 $31\times10^3$ 附近有一新的、浓染的蛋白质条带，而诱导前和空质粒菌体无，重组蛋白在菌体沉淀和裂解上清都较多，得到了较好的纯化(图 3)。TLC 分析显示重组蛋白在细菌总蛋白占 39%，在菌体不溶蛋白中占 28%，在菌体可溶蛋白中占 26%，纯化蛋白的纯度

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

达 98%。

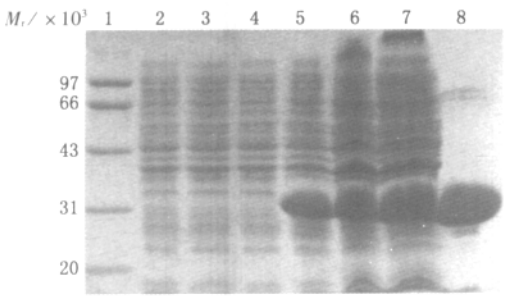



**图 3 pET-30a(+)-CsGSTM 在大肠杆菌的表达产物及其纯化产物的 150 g/L SDS-PAGE 分析**

**Fig. 3 The expressed product of pET-30α(+)-CsGSTM in *E. coli* and its purified product analyzed by 150 g/L SDS-PAGE**

Lane 1: Protein marker; lane 2: pET-30a(+) transformants without IPTG induction; lane 3: pET-30a(+) transformants with IPTG induction for 4 h; lane 4: pET-30a(+)-CsGSTM transformants without IPTG induction; lane 5: pET-30a(+)-CsGSTM transformants with IPTG induction for 4 h; lane 6: insoluble protein of pET-30a(+)-CsGSTM transformants; lane 7: soluble protein of pET-30a(+)-CsGSTM transformants; lane 8: purified product of soluble protein of pET-30a(+)-CsGSTM transformants

### 2.4 重组蛋白纯化前、后的免疫反应性鉴定

重组蛋白在纯化前、后都能被华支睾吸虫病人血清识别(图 4),表明它在纯化前后都具有免疫反应性。

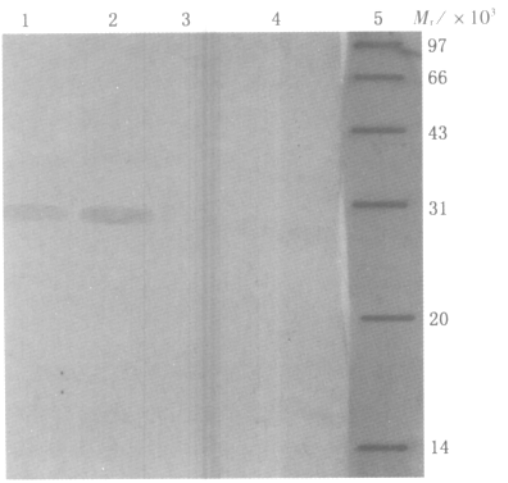



**图 4 pET-30a(+)-CsGSTM 在大肠杆菌的表达产物及其纯化产物的免疫印迹分析**

**Fig. 4 The expressed product of pET-30a(+)-CsGSTM in *E. coli* and its purified product analyzed by Western blotting**

Lane 1: purified product of soluble protein pET-30a(+)-CsGSTM transformants; lane 2: pET-30a(+)-CsGSTM transformants with IPTG induction for 4 h; lane 3: pET-30a(+)-CsGSTM transformants without IPTG induction; lane 4: pET-30a(+) transformants with IPTG induction for 4 h; lane 5: Protein marker

## 3 讨 论

人[6]、恶性疟原虫[7]的 *GSTs* 基因有内含子,血吸虫不同株间的 *GSTs* 基因结构不同,埃及血吸虫 *GSTs* 没有内含子[8]。本研究结果表明 *CsGSTM* 基因没有内含子,华支睾吸虫的其他的 GSTs 以及其他吸虫的 *GSTs* 基因有无内含子尚未见报道。

恶性疟原虫的 GSTs 是潜在的药物靶标,并且带组氨酸标签的重组 GST-26 在大肠杆菌中表达有催化活性[9]。蠕虫的 GSTs 参与对由虫体代谢和宿主免疫系统所产生的脂质过氧化物和细胞毒性的羰基的解毒,也被认为是免疫疗法和化学疗法的一个潜在的靶标[10]。其中,主要定位于成虫实质的血吸虫 GST-26 和 GST-28[11],是 WHO 提出的 6 个最具潜力的候选疫苗分子之一[12];华支睾吸虫的 GST-26 和 GST-28 编码基因在原核表达也有催化活性[3],并且重组 GST-26 可用于检测 IgG 和 IgE 抗体[13]。因而,原核表达有活性的重组 GST 是可行的,并且易于得到大量的重组蛋白以用于功能和应用研究。

原核表达载体 pET-30a(+) 在其 *N*-末端携带了一个组氨酸标签/凝血酶/S 标签/肠肽酶构型的序列,*C*-末端带有一个可供选用组氨酸标签序列,可以对重组蛋白进行纯化。组氨酸标签不影响重组蛋白的免疫反应性,但在研究重组蛋白的三维构象(如 MRI)时就必须去掉这个标签。因此,我们在设计下游引物时没有去掉终止密码子,只利用 *N*-末端的组氨酸标签,既便于纯化,又可以在必要时用凝血酶切掉组氨酸标签。$M_{r,\ CsGSTM} = 25.1 \times 10^3$[3],重组质粒 pET-30a(+)-CsGSTM 的标签序列 $M_{r,\ pET\text{-}30a(+)} = 6 \times 10^3$(www.expasy.org 在线计算所得),$M_{r,pET\text{-}30a(+)\text{-}CsGSTM} = 31.1 \times 10^3$。图 2 第 5、6、7、8 泳道显示的重组蛋白条带与预期的大小是一致的,TLC 分析证明它在细菌总蛋白占 39%,说明 *CsGSTM* 基因得到了有效表达。重组蛋白在菌体可溶蛋白中占 26%,与 CsGSTM 属于胞浆 GSTs 是相符的。纯化蛋白的纯度达 98%,并且重组蛋白在纯化前后都具有免疫反应性,为重组蛋白的免疫诊断和免疫原性研究提供了条件,也为进一步纯化用作活性分析奠定了基础。

**参考文献:**

[1] 马健强,何伟潮. 顺德市人群华支睾吸虫感染及其预防控制工作回顾[J]. 热带医学杂志, 2001, 1(1):

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

91-100.

[2] Hong S J, Kim T Y, Kang S Y, *et al. Clonorchis sinensis:* immunolocalization of 26 kDa glutathione *S*-transferase in adult worms[J]. Exp Parasitol, 2002, 102(3-4): 191-3.

[3] Hong S J, Lee J Y, Lee D H, *et al.* Molecular cloning and characterization of a mu-class glutathione *S*-transferase from *Clonorchis sinensis*[J]. Mol Biochem Parasitol, 2001, 115(1): 69-75.

[4] 张锡林，徐文岳，段建华，等．斯氏肺吸虫和华支睾吸虫基因组多态 DNA 的初步分析[J]．第三军医大学学报，2000，22(9)：865-7.

[5] 卞国武，余新炳，吴忠道，等．日本血吸虫(中国大陆株)Sj16 基因的原核表达[J]．中国血吸虫病防治杂志，2001，13(6)：333-6.

[6] 周宏灏．遗传药理学[M]．北京：科学出版社，2001. 171.

[7] Liebau E, Bergmann B, Campbell A M, *et al.* The glutathione *S*-transferase from plasmodium falciparum[J]. Mol Biochem Parasitol, 2002, 124(1-2): 85-90.

[8] Trottein F, Godin C, Pierce R J, *et al.* Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione *S*-transferases [J]. Mol Biochem Parasitol, 1992, 54 (1): 63-72.

[9] Harwaldt P, Rahlfs S, Becker K. Glutathione *S*-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: characterization of a potential drug target[J]. Biol Chem, 2002, 383(5): 821-30.

[10] Vibanco-Perez N, Landa-Piedra A. Glutathione S-transferase in helminth parasites[J]. Rev Latinoam Microbiol, 1998, 40(1-2): 73-85.

[11] Gobert G N, Stenzel D J, McManus D P. Immunolocalisation of the glutathione *S*-transferases, GST-26 and GST-28, within adult *Schistosoma japonicum*[J]. Int J Parasitol, 1998, 28(9): 1437-43.

[12] Bergquist N R, Colley D G. Schistosomiasis vaccines: research to development[J]. Parasitol Today, 1998, 14 (3): 99-104.

[13] Hong S J, Yun-Kim T, Gan X X, *et al. Clonorchis sinensis*: glutathione *S*-transferase as a serodiagnostic antigen for detecting IgG and IgE antibodies[J]. Exp Parasitol, 2002, 101(4): 231-3.

（编辑　张敏瑞）

（上接 104 页　form page 104）

研究结果相似。

**本文结果提示**：K7A$\beta_{36\text{-}42}$ 疫苗与 A$\beta_{42}$ 疫苗相比，免疫大鼠同样能产生高滴度抗体。其对细胞的毒性作用小，免疫后血清能明显抑制 Aβ 对 PC12 细胞的毒性。表明多重抗原肽系统技术能较好的解决短肽疫苗抗原性弱的问题，可广泛用于肽疫苗研制。这为 AD 免疫治疗可能提供新途径。有关 K7A$\beta_{36\text{-}42}$ 免疫接种 AD 患者是否有细胞毒性，以及是否产生合适滴度的抗体，能否用来替代 A$\beta_{42}$ 疫苗用于 AD 的临床试验治疗正在做进一步的研究。

**参考文献：**

[1] Schenk D. Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning[J]. Nat Rev Neurosci, 2002, 3(10): 824-8.

[2] Hock C, Konietzko U, Streffer J R, *et al.* Antibodies against β-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease[J]. Neuron, 2003, 38(4): 547-54.

[3] 林　贤，汪华侨，徐　杰，等．A$\beta_{42}$ 及其 C 端亚单位疫苗接种正常大鼠后产生高滴度的抗 A$\beta_{42}$ 抗体[J]．解剖学报，2003，34(3)：231-5.

[4] Schenk D, Barbour R, Dunn W, *et al.* Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse[J]. Nature, 1999, 400 (6740): 173-7.

[5] Sigurdsson E M, Scholtzova H, Mehta P D, *et al.* Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid-beta homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice[J]. Am J Pathol, 2001, 1599(2): 439-47.

[6] 司徒镇强，吴军正．细胞培养[M]．北京：世界图书出版社，2001. 138－40.

[7] Yankner B A, Dawes L R, Fisher S, *et al.* Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease[J]. Science, 1989, 245(4916): 417-20.

[8] 汪华侨，谢　瑶，袁群芳，等．TA9902 对加速老化小鼠(SAM-P/8)脑 Aβ 样颗粒沉积的影响[J]．中山大学学报(医学科学版)，2003，24(3)：206-10.

[9] 姚志彬．以 Aβ 为靶的老年性痴呆治疗策略[J]．科技导报，1998，9：27－8.

[10] Janus C, Pearson J, McLaurin J, *et al.* A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease[J]. Nature, 2000, 408(6815): 979-82.

[11] 胡金家，汪华侨，林　贤，等．铝佐剂 A$\beta_{42}$ 及其亚单位疫苗可有效诱导大鼠产生特异性抗体[J]．中山大学学报(医学科学版)，2004，25(1)：39-44.

（编辑　张恩健）

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net