

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000175

多克隆及单克隆 P24 抗体在石蜡组织切片上检测 BDV-P24 蛋白质的应用

张鸿志¹, 李 丹², 雷 阳¹, 邓 婧¹, 陈世刚¹, 黄 华¹, 李文娟¹,陈建军¹, 王 啸¹, 张 亮¹, 黄荣忠¹, 刘 霞¹, 谢 鹏¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科、重庆医科大学神经科学研究中心、重庆市神经生物学重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:验证本课题组前期制备的多克隆及单克隆 P24 抗体能否在石蜡组织切片上检测博尔纳病病毒(Borna disease virus, BDV)磷蛋白(P24 蛋白质)以及探索其运用的条件。**方法:**选择出生 24 h 内的 SD 大鼠 20 只作为实验组颅内注射 BDV 病毒液, 对照组大鼠 20 只在相同部位注射磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), 未经注射的 SD 大鼠和 C57 小鼠各 40 只作为阴性实验对照, 饲养到 60 d 取脑石蜡包埋制片; 免疫组化染色用 Envision 两步法, 一抗为多克隆或单克隆 P24 抗体, 以 PBS 代替一抗作为空白对照, P24 抗体的稀释浓度分别从 1:50、1:100、1:200、1:400 直到 1:5 000; 以高倍镜下神经细胞胞质呈棕黄色或棕褐色颗粒为阳性, 将每张切片阳性细胞比例评分乘以阳性强度评分计算总分。**结果:**多克隆 P24 和单克隆 P24 抗体分别在 BDV 感染大鼠实验组与阴性对照组的染色评分差异有统计学意义(多克隆抗体 $Z=-3.108, P=0.000$; 单克隆抗体 $Z=-4.605, P=0.000$); 在多克隆 P24 抗体稀释度中, 1:200、1:400 的敏感性好而背景着色较轻, 在单克隆 P24 抗体稀释度中, 1:100、1:200、1:400 的敏感性好而无背景着色。**结论:**多克隆及单克隆 P24 抗体在石蜡组织切片上能检测出 BDV P24 蛋白质; 并且多克隆 P24 抗体推荐的浓度为 1:200 和 1:400, 单克隆 P24 抗体的推荐浓度为 1:100、1:200 和 1:400。

【关键词】多克隆 P24 抗体; 单克隆 P24 抗体; 博尔纳病病毒; 免疫组化染色

【中图分类号】R373.3¹

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-07-07

Application of the antigen-antibody (P24 polyclonal and monoclonal antibody) binding in detecting BDV-P24 protein in paraffin tissue sections

Zhang Hongzhi^{1,2}, Li Dan³, Lei Yang¹, Deng Jing¹, Chen Shigang¹, Huang Hua¹, Li Wenjuan¹, Chen Jianjun¹,Wang Xiao¹, Zhang Liang¹, Huang Rongzhong¹, Liu Xia¹, Xie Peng¹

(1. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Neuroscience Research Center of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology; 2. Teaching and Research Section of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To verify the antigen-antibody (P24 polyclonal and monoclonal antibody) binding in detecting Borna disease virus (BDV)-P24 protein in paraffin tissue sections and to explore the work conditions. **Methods:** Forty Sprague-Dawley rats born within 24 h were intracranially (i.c.) inoculated in the right cerebral hemisphere with either BDV solution or phosphate-buffered saline (control; sham inoculated). Forty Sprague-Dawley rats and 40 C57 rats without injection were chosen as negative controls. The brains of rats on 60 d after birth were perfused and were subsequently embedded into paraffin. Then the immunohistochemical staining was performed following Envision two-step protocol. The primary antibody was chosen as P24 polyclonal and monoclonal antibody and the dilution ranged from 1:50 to 1:5 000. The primary antibody was replaced by PBS as blank control. The brownish yellow or brown particles distributing in the cells were considered as positive and total score was got by multiplying positive cell proportion score and posi-

tive intensity score. **Results:** There were significant differences in staining scores between experimental group and control group (polyclonal P24 group $Z=-3.108, P=0.000$, monoclonal P24 group $Z=-4.605, P=0.000$. It showed a high sensitivity with slightly stained background in dilution 1:200, 1:400 using polyclonal P24 staining while a high sensitivity without stained background

作者介绍: 张鸿志, Email: zhzh0518@qq.com,

研究方向: 急性脑血管病。

通信作者: 谢 鹏, Email: xiepeng@cqmu.edu.cn。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(编号: 2009CB918302);

国家自然科学基金资助项目(编号: 31271189)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000175.html>

in dilution 1:100, 1:200, 1:400 using monoclonal P24 staining. **Conclusion:** BDV P24 polyclonal and monoclonal antibody can bind the antigen distributed in paraffin sections of BDV infectious rat. The recommended dilution of polyclonal P24 antibody is 1:200 and 1:400. The recommended dilution of monoclonal P24 antibody is 1:100, 1:200 and 1:400.

【Key words】polyclonal P24 antibody; monoclonal P24 antibody; Borna disease virus; immunohistochemical staining

博尔纳病病毒(Borna disease virus, BDV)是一种有包膜的、非节段性的、单股负链的 RNA 病毒,隶属于单股负链 RNA 病毒目博尔纳病毒科博尔纳病毒属^[1]。该病毒具有高度嗜神经性,能广泛感染从鸟类到灵长类的多种恒温动物,并引起以中枢神经系统功能障碍为特征的临床表现^[2]。流行病学调查显示,人类的神经精神疾病如精神分裂症、慢性疲劳综合症、迟发型运动障碍等^[3],特别是抑郁症^[4]也与人感染 BDV 有关。

BDV 基因序列全长 8 910 bp, 包含 6 个开放读码框, 分别编码核蛋白(P40)、磷蛋白(P24)、基质蛋白(gp18)、糖蛋白(P57)、1 个 L-多聚酶和 1 个 X 蛋白(P10)^[5]。体内外实验均已证实 P24 和 P40 分别在感染细胞的胞浆和胞核中表达水平较高,可作为检测的主要目标抗原^[6],其他蛋白由于表达水平较低,故少见有相关报道。

目前实验室检测 BDV 感染的主要方法有:①直接通过组织匀浆培养或活体动物培养分离病毒;②逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 BDV-RNA;③血清学检测,包括间接免疫荧光试验(IFA)、免疫印迹(Western blot)和酶联免疫吸附试验(ELISA);④通过免疫组化染色的方法直观地检测 BDV 的主要抗原 P24 和 P40 蛋白。前 3 种方法需要新鲜标本,收集比较困难,而免疫组化研究材料是石蜡组织切片,易于筛查脑外科手术患者是否存在 BDV 感染以及进行 BDV 感染与某些疾病(比如肿瘤)发病的相关性研究^[7-10]。

BDV 免疫组化染色需要特有抗体,但国际上尚无商品化的 P24 抗体,本课题组前期已利用动物免疫技术、细胞杂交-杂交瘤技术制备出抗 BDV P24 的多克隆和单克隆抗体^[11](正在申请专利)。因此,本实验的主要目的就是验证本课题组前期制备的多克隆和单克隆 P24 抗体能否在石蜡组织切片上检测出 BDV P24 蛋白质以及探索其运用的条件(包括抗体最佳稀释度、抗原修复、实验结果的判断等),以便为今后临床病例脑组织的病理石蜡切片行

BDV 感染筛查提供依据。

1 材料与方法

1.1 BDV 病毒株

精神分裂症病人大脑中分离得到病毒株 BDV Hu(由德国柏林自由大学 Hanns Ludwig 教授惠赠)感染的 OL 细胞株,经过反复冻融的方式获得 BDV 病毒液。将病毒浓缩后用 PBS 重悬细胞, -80 ℃ 保存。

1.2 BDV 感染大鼠

选择出生 24 h 内的 SD 大鼠, BDV 感染组大鼠(20 只)右半球颅内注射入 30 μ l 滴度为 8×10^4 TU/ml 的 BDV 病毒液, PBS 阴性对照组大鼠(20 只)在相同部位颅内注射入 30 μ l PBS ($n=20$)。新生大鼠在母鼠喂养下饲养到 60 d 灌注取脑[BDV 感染组大鼠雄性 11 只, 体质量(305 ± 12) g; 雌性 9 只, 体质量(217 ± 15) g; PBS 阴性对照组大鼠雄性 8 只, 体质量(313 ± 14) g; 雌性 12 只, 体质量(222 ± 12) g]。

同时购入动物中心饲养的其他未经注射的 SD 大鼠(以下简称“普通 SD 大鼠”)40 只, C57 小鼠(以下简称“普通 C57 小鼠”)40 只, 取脑组织作为阴性实验对照[普通 SD 大鼠雄性 20 只, 体质量(310 ± 12) g; 雌性 20 只, 体质量(224 ± 10) g; 普通 C57 小鼠雄性 22 只, 体质量(23 ± 1) g, 雌性 18 只, 体质量(20 ± 1) g]。

1.3 病理组织切片的制备、免疫组化染色分组及阳性判断标准

将所有实验大鼠和小鼠用 4% 多聚甲醛溶液灌注取全脑组织, 所取脑组织沿矢状面(大脑中线、嗅球中线)切开, 并用 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后, 沿矢状面取材后行石蜡包埋病理制片, 切免疫组化白片厚度为 5 μ m, 待免疫组化染色用。

免疫组化染色用 Envision 两步法, 一抗为本课题组自制的兔多克隆 P24 抗体或小鼠单克隆 P24 抗体, 以 PBS 代替一抗作为空白对照; 抗原修复液为 1 mmol/L pH6.0 的枸橼酸缓冲液, 热抗原修复分别采用微波热抗原修复和高压锅热抗原修复。

BDV 感染大鼠 20 例的脑组织用德国柏林自由大学 Hanns Ludwig 教授惠赠的单克隆及多克隆 P24 抗体进行了阳性对照验证。每只大鼠选取部分脑组织制成病理石蜡切片经免疫组化染色阳性验证, 同时每只大鼠冻存脑组织行 Western blot 阳性验证。

切片分组: ①多克隆 P24 抗体组 BDV 感染大鼠 20 只;

阴性对照;PBS 阴性对照大鼠 20 只,普通 SD 大鼠 40 只,普通 C57 小鼠 40 只。免疫组化染色用 Envision 两步法,一抗为本课题组自制的兔多克隆 P24 抗体,抗原修复液为 1 mmol/L pH 6.0 的枸橼酸缓冲液,热抗原修复分别采用微波热抗原修复和高压锅热抗原修复;②单克隆 P24 抗体组 BDV 感染大鼠 20 只;阴性对照:PBS 阴性对照大鼠 20 只,普通 SD 大鼠 40 只,普通 C57 小鼠 40 只。免疫组化染色用 Envision 两步法,一抗为本课题组自制的小鼠单克隆 P24 抗体,抗原修复液为 1 mmol/L pH 6.0 的枸橼酸缓冲液,热抗原修复分别采用微波热抗原修复和高压锅热抗原修复。

一抗兔多克隆 P24 抗体和小鼠单克隆 P24 抗体的稀释浓度分别为 1:50、1:100、1:200、1:400、1:600、1:800、1:1 000、1:1 200、1:1 400、1:1 600、1:1 800、1:2 000、1:5 000。

DAB 染色;显微镜下适时终止,显示时间一般为数秒。

P24 阳性判断标准:以神经细胞细胞质呈淡黄色、棕黄色或棕褐色颗粒为阳性信号。在高倍镜下的脑区内选择 10 个代表性的视野($400\times$)观察阳性细胞数比例并分级评分,未见细胞阳性为阴性即 0 级(0 分),1%~25%记为 I 级(1 分),26%~50%记为 II 级(2 分),51%~75%记为 III 级(3 分),76%~100%记为 IV 级(4 分)。同时按阳性信号强度也分级并评分:未见细胞阳性为阴性即 0 级(0 分),淡黄色为弱阳性即 I 级(1 分),棕黄色为中等度阳性即 II 级(2 分),棕褐色为强阳性即 III 级(3 分)。每张切片将阳性细胞比例评分乘以阳性强度评分计算为总分。

1.4 统计分析

使用 SPSS 21.0 软件包对数据进行统计分析。计量资料采用中位数 $\pm$ 四分位间距($M\pm Q$)表示,多克隆 P24 和单克隆 P24 抗体分别在 BDV 感染大鼠与阴性对照组的染色评分结果统计分析采用非参数检验 Mann-Whitney Test 进行分析。所有统计分析均为双侧检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 多克隆 P24 抗体免疫组化结果及统计分析

将免疫组化结果记录在表 1 中。

重点观察大鼠的大脑、海马及小脑等脑区神经元或神经胶质细胞的阳性细胞数比例或阳性强度,并观察脑组织背景着色情况。BDV 感染大鼠组 20 只中,依据不同的抗体稀释度,分别观察每只大鼠的阳性比例并计算平均评分,分别观察每只大鼠的阳性强度并计算平均评分,最后将二者相乘并计算平均总分。阴性对照组中,PBS 阴性对照大鼠 20 只、普通 SD 大鼠 40 只、普通 C57 小鼠 40 只,依据不同的抗体稀释度,分别观察每只大鼠的阳性比例并计算平均评分,分别观察每只大鼠的阳性强度并计算平均评分,最后将二者相乘并计算平均总分。

多克隆 P24 抗体在 20 只 BDV 感染大鼠组脑组织均呈阳性,在所有实验的抗体稀释浓度中,1:200、1:400 的敏感性

好而无背景着色,为最理想的稀释浓度;而 1:50、1:100 虽然敏感性好但轻度背景着色,不宜推荐使用;1:600 至 1:5 000 等,虽然也有阳性信号,但很弱,也不宜使用。在 PBS 阴性对照大鼠 20 只、普通 SD 大鼠 40 只、普通 C57 小鼠 40 只中,除外 1:50 浓度有弱阳,其余所有稀释浓度均为阴性(见图 2)。

经 Shapiro-Wilk 检验,2 组评分均非正态分布($P_{BDV 感染组}=0.003$, $P_{对照组}=0.000$),故采用 Mann-Whitney Test 非参数检验,结果多克隆 P24 抗体在 BDV 感染大鼠组得分为 8 ± 8 ,PBS 阴性对照组得分为 0 ± 0 ,差异有统计学意义($Z=-3.108$, $P=0.000$),且 BDV 感染组评分高于对照组评分。

2.2 单克隆 P24 抗体免疫组化结果及统计分析

将免疫组化结果记录在表 1 中。

表 1 多克隆和单克隆 P24 抗体免疫组化得分
Tab.1 Immunohistochemical score of polyclonal and monoclonal P24 antibody

组别	多克隆抗体			单克隆抗体		
	得分 $M\pm Q$	Z 值	P 值	得分 $M\pm Q$	Z 值	P 值
BDV 感染组	8 ± 8	3.108	0.000	8 ± 8	4.605	0.000
PBS 阴性对照组	0 ± 0			0 ± 0		

和多克隆抗体组一样,单克隆组仍然是重点观察大鼠的大脑、海马及小脑等脑区神经元或神经胶质细胞的阳性细胞数比例或阳性强度,以及脑组织背景着色情况,并按照同样的原则进行评分。

单克隆 P24 抗体在 20 只 BDV 感染大鼠组脑组织均呈阳性,在所有实验的抗体稀释浓度中,1:100、1:200、1:400 的敏感性好而无背景着色(图 1),为最理想的稀释浓度;而 1:50 虽然敏感性好但轻度背景着色,不宜推荐使用;1:600 至 1:5 000 等,虽然也有阳性信号,但很弱,也不宜使用。在 PBS 阴性对照大鼠 20 只、普通 SD 大鼠 40 只、普通 C57 小鼠 40 只中,除外 1:50 浓度有弱阳性,其余所有稀释浓度均为阴性(图 2)。

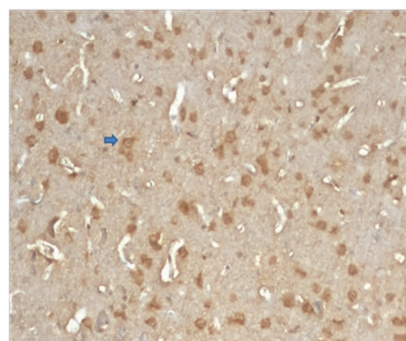


图 1 神经细胞质 P24 阳性表达(单克隆 P24 抗体稀释度 1:200, Envision 两步法 $200\times$)

Fig.1 Positive expression of P24 in nerve cytoplasm
(The dilution of P24 monoclonal antibody 1:200,
Envision two-step method)

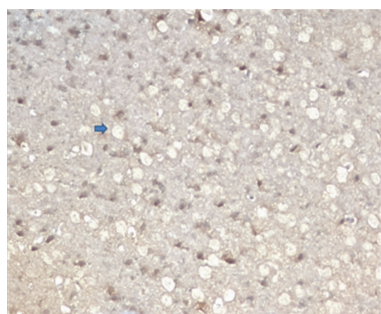


图2 神经细胞质 P24 阴性表达 (单克隆 P24 抗体稀释度 1:200, Envision 两步法 200×)

Fig.2 Negative expression of P24 in nerve cytoplasm
(Dilution of P24 monoclonal antibody 1:200, Envision two-step method)

经 Shapiro-Wilk 检验, 2 组评分均非正态分布 ($P_{BDV \text{ 感染组}} = 0.003$, $P_{\text{对照组}} = 0.000$), 故采用 Mann-Whitney Test 非参数检验, 结果单克隆 P24 抗体在 BDV 感染大鼠组得分为 8 ± 8 , PBS 阴性对照组得分为 0 ± 0 , 差异有统计学意义 ($Z = -4.605$, $P = 0.000$), 且 BDV 感染组评分高于对照组评分。

3 讨论

在现有的各种检测方法中, 病毒分离是公认的“金标准”, 但人感染 BDV 时病毒含量很低, 需要新鲜人脑组织, 而且操作费时费力, 不适宜临床普遍筛查^[12-13]; 目前对检测 BDV-RNA 主要是针对新鲜组织行 RT-PCR, 这种方法灵敏度高, 但对样本要求高, 也有假阳性^[14], 且由于血液存在着肝素、血红蛋白等 PCR 的抑制剂, BDV 病毒滴度过低、RNA 保存过程反复冻融以及用固定的引物不一定检测得出新出现的变异病毒株等, 所以也会出现假阴性^[15]; 对血清学检测的方法, IFA 和 ELISA 都会出现由于 BDV 感染患者的血清抗体滴度相对较低而与背景区分困难, 也少有阳性的报道^[13]; Western blot 则是操作费时、价格昂贵, 不适于大规模、快速的血清学筛查试验^[16]。而免疫组化的方法省时、方便, 临床上的病理组织标本 (如肿瘤组织) 也多是切片形式保存而很少以新鲜组织的形式保存, 所以本实验选取免疫组化的方法, 同时设有对照组并采用统计学分析表明实验组和对照组的表达差异有统计学意义, 使得抗体的特异性得以保证, 可广泛用于临床 BDV 感染的筛查。

在热抗原修复的过程中本实验还发现组织切片的情况高压锅抗原修复法比微波抗原修复法要好, 但是最终染色的结果没有太大的差异。

本实验还进行了抗体浓度的摸索, 从 1:50、

1:100、1:200、1:400、直到 1:5 000 等浓度分别进行免疫组化染色。结果表明兔多克隆 P24 抗体以 1:200、1:400 稀释度下组织切片的效果最好; 而小鼠单克隆 P24 抗体在 1:100、1:200、1:400 稀释度下组织切片效果最好。

因为目前国内外多克隆和单克隆 P24 抗体均未形成商品化生产, 一般都是通过将重组纯化的蛋白对兔进行免疫获得多克隆 P24 抗体^[17]; 单克隆 P24 抗体则是由重组的蛋白质免疫小鼠后取小鼠脾细胞与骨髓细胞进行融合, 建立稳定的分泌抗 BDV P24 抗体的杂交瘤细胞株后获得^[18]。而 Horimoto 等^[19]及杨爱英等^[20]国内外研究者研究中所用的多克隆和单克隆抗体均是受赠于其他合作实验室。实验者希望通过本实验的验证以及经 ELISA 或 Western blot 等实验进一步验证之后 (接下来将由本课题组其他人员跟进完成), 本课题组前期所制备的多克隆和单克隆 P24 抗体能广泛的运用于 BDV 的相关研究中, 有较高的敏感性和特异性。

参考文献

- [1] Ludwig H, Bode L. Borna disease virus: new aspects on infection disease, diagnosis and epidemiology [J]. Rev Sci Tech, 2000, 19(1): 259-288.
- [2] Dietzel J, Kuhel H, Stahl T, et al. Morphometric analysis of the retina from horses infected with the Borna disease virus [J]. Vet Pathol, 2007, 44(1): 57-63.
- [3] Iwata Y, Takahashi K, Peng X, et al. Detection and sequence analysis of borna disease virus P24 RNA from peripheral blood mononuclear cells of patients with mood disorders or schizophrenia and of blood donors [J]. J Virol, 1998, 72(12): 10044-10049.
- [4] Bode L, Ludwig H. Borna disease virus infection, a human mental-health risk [J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(3): 534-545.
- [5] De la Torre JC. Molecular biology of Borna disease virus and persistence [J]. Front Biosci, 2002, 7: d569-d579.
- [6] Watanabe M, Zhong Q, Kobayashi T, et al. Molecular ratio between Borna disease viral-P40 and -P24 proteins in infected cells determined by quantitative antigen capture ELISA [J]. Microbiol Immunol, 2000, 44(9): 765-772.
- [7] Flower RL, Kamhieh S, Mclean L, et al. Human Borna disease virus infection in Australia: serological markers of infection in multi-transfused patients [J]. APMIS Suppl, 2008(124): 89-93.
- [8] Hagiwara K, Tsuge Y, Asakawa M, et al. Borna disease virus RNA detected in Japanese macaques (Macaca fuscata) [J]. Primates, 2008, 49(1): 57-64.
- [9] Nunes SO, Itano EN, Amarante MK, et al. RNA from Borna disease virus in patients with schizophrenia, schizoaffective patients, and in their biological relatives [J]. J Clin Lab Anal, 2008, 22(4): 314-320.
- [10] Matsunaga H, Tanaka S, Fukumori A, et al. Isotype analysis of human anti-Borna disease virus antibodies in Japanese psychiatric and

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000100

人尿液蛋白质的超滤离心制备及其双向凝胶电泳分析

彭 扬,周林科,吴 波,杨涌涛,詹 远,陈建军,谢 鹏

(重庆医科大学神经科学研究中心,重庆 400016)

【摘要】目的:优化尿液蛋白质制备方法以获得蛋白点数多且分辨率高的尿液双向凝胶电泳(two dimensional gel electrophoresis, 2-DE)图谱,为尿液蛋白质组学研究提供技术支撑。**方法:**首先,使用 6 种不同方法制备尿液蛋白质后比较蛋白质得率,并分析这些方法的 2-DE 谱蛋白点数及 3 次重复匹配率,进行统计分析计算 P 值;最后利用 2 种固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)胶条和不同的聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)胶浓度进行 2-DE 分析,比较所得蛋白图谱的蛋白点数及分辨率。**结果:**与其他方法相比,超滤离心法制备尿液蛋白能获得更多的蛋白总量 $[(791 \pm 17) \mu\text{g}, P=0.000]$,得到的电泳图谱蛋白点数也更多 $[(724 \pm 29) \text{个}, P=0.000]$;利用 pH 3~10 IPG 胶条和 12.5% PAGE 分离有利于尿液蛋白质的整体分析,特别是酸性和碱性蛋白质点信息,而 pH 4~7 IPG 胶条能使等电点为 4~7 蛋白质的 2-DE 谱分辨率更高($P<0.05$)。**结论:**建立了与 2-DE 兼容的尿液蛋白质制备方法,获得了更为全面的尿液蛋白点信息,为临床生理和疾病的尿液蛋白质组学研究奠定了基础。

【关键词】尿液;蛋白质;双向凝胶电泳;超滤离心法**【中图分类号】**R446.12**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-02-28

Ultrafiltration and two-dimensional gel electrophoresis analysis of human urinary protein

Peng Yang, Zhou Linke, Wu Bo, Yang Yongtao, Zhan Yuan, Chen Jianjun, Xie Peng

(Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To optimize urinary protein preparation method, to obtain a two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) map with more urinary protein spots and higher resolution, and to provide technical supports for urinary proteomic researches. **Methods:** Firstly, urinary protein was extracted by 6 different preparation methods and then the total protein content between them were compared; secondly, protein spots as well as three-time repeated matching rate of 2-DE maps of these six methods were ana-

作者介绍:彭 扬, Email: pengyang.1989@163.com,

研究方向:尿液蛋白质组学。

通信作者:谢 鹏, Email: xiepeng58@21cn.com。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(编号:2009CB918300)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000100.html>

general population[J]. J Clin Virol, 2008, 43(3): 317-322.

[11] 徐晓艳, 金 戈, 张 亮, 等. 抗博尔纳病毒核蛋白多克隆抗体的制备和鉴定[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(3): 212-215.

[12] Staeheli P, Sauder C, Hausmann J, et al. Epidemiology of Borna disease virus[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt9): 2123-2135.

[13] Bode L. Human infections with Borna disease virus and potential pathogenic implications[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1995, 190: 103-130.

[14] Staeheli P, Sauder C, Hausmann J, et al. Epidemiology PCR of Borna disease virus[J]. J Gen Virol, 2000, 81(7): 2123-2135.

[15] 徐鸣明, 张英英, 展群岭, 等. 博尔纳病毒生物学特点以及检测方法[J]. 医学教育探索, 2010, 9(10): 1419-1424.

[16] Yamaguchi K, Sawada T, Yamane S, et al. Synthetic peptide-based electrochemiluminescence immunoassay for anti-Borna Disease Virus P40 and P24 antibodies in rat and horse serum[J]. Ann Clin Biochem,

2001, 38(Pt 4): 348-355.

[17] Ibrahim MS, Watanabe M, Palacios JA, et al. Varied persistent life cycles of Borna disease virus in a human oligodendroglioma cell line[J]. J Virol, 2002, 76(8): 3873-3880.

[18] Furrer E, Bilzer T, Stitz L, et al. Neutralizing antibodies in persistent Borna disease virus infection: prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis[J]. J Virol, 2001, 75(2): 943-951.

[19] Horimoto T, Takahashi H, Sakaguchi M, et al. A reverse-type sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Borna disease virus[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(7): 1661-1666.

[20] 杨爱英, 张凤民, 李均辉, 等. 用蛋白印迹试验检测精神分裂症患者血清中博尔纳病毒 P24 抗体的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, 17(1): 85-87.

(责任编辑: 冉明会)