

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.14.004

免疫磁珠技术分离唾液 A/B 血型抗原并用于吸附血清 A/B 抗体 *

宋晶晶¹ 罗萍¹ 王娇¹ 周水梅¹ 沈长新^{1,2Δ}

(1 武汉大学中南医院基因诊断中心 湖北 武汉 430071; 2 武汉大学中南医院输血科 湖北 武汉 430071)

摘要 目的:应用免疫磁珠分离技术获得具有良好抗原性的 A/B 血型抗原,并探究其作为 ABO 血型抗体吸附剂去除 A/B 抗体的可行性。**方法:**将含有血型物质的唾液进行预处理,再与包被了抗体的磁珠混合,分离出纯度较高的 A/B 抗原,运用酶联免疫及凝集抑制试验验证所得抗原的抗原性及是否存在交叉反应。用未纯化 A/B 抗原和纯化 A/B 抗原包被磁珠,对含有抗 A/B IgM、IgG 的血清进行抗体吸附,用纯化 A/B 抗原对 100 份来自 O 型血孕妇的临床血清样本进行抗体吸附,分别评价其吸附效果。**结果:**纯化抗原与对应抗体反应后,其吸光度显著高于对照组(A 抗原与 A 抗体 0.85 ± 0.12 vs. 0.27 ± 0.03 , $P < 0.01$; B 抗原与 B 抗体 0.86 ± 0.09 vs. 0.24 ± 0.06 , $P < 0.01$),与其它类型抗体反应后的吸光度值与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。进行红细胞凝集抑制试验时,纯化抗原可显著抑制相应抗体与红细胞的凝集反应,对其它类型抗体与红细胞的凝集没有抑制作用。血清抗体吸附实验表明纯化抗原的吸附效率比未纯化抗原的高 (97.00 % vs. 88.00 %, $P < 0.001$)。临床样本抗体吸附实验显示,纯化 A 抗原对抗 A IgM/IgG 的吸附效率分别为 96.88 %、98.44 %;纯化 B 抗原对抗 B IgM/IgG 的吸附效率分别为 96.88 %、98.44 %。**结论:**磁珠纯化抗原能特异性地与对应抗体结合,有效吸附血清中的血型抗体,有望作为合成 A/B 抗原的替代品。

关键词:磁性免疫分离;血型抗原 A;血型抗原 B;免疫吸附

中图分类号:R-33;Q64;R446.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)14-2617-06

Separation of Blood Group Antigen A/B by Immunomagnetic Separation and Utilization of the Adsorption Blood Group A/B Antibodies*

SONG Jing-jing¹, LUO Ping¹, WANG Jiao¹, ZHOU Shui-me¹, SHEN Chang-xin^{1,2Δ}

(1 Genetic Diagnosis Center, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430071, China;

2 Department of Blood Transfusion, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430071, China)

ABSTRACT Objective: To obtain A/B blood group antigen by immunomagnetic separation technique and explore whether the purified antigens could be as an ABO blood group antibodies adsorbent to remove anti-A/B in serum. **Methods:** Magnetic beads coated with antibody were mixed with the pretreated saliva containing blood group materials to purify A/B antigen. The antigenicity and purity were confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay and agglutination inhibition assay. The antibody adsorption effect of acquired antigens were evaluated by using unpurified antigens and purified antigens coated beads to adsorb antibodies in the serums which containing A/B antibodies, and using purified antigens coated beads to adsorb antibodies in the serums which from O-type pregnant woman. **Results:** The absorption value of wells adding purified antigen and the corresponding antibody were significantly high than the control wells (A antigen and anti-A 0.85 ± 0.12 vs. 0.27 ± 0.03 , $P < 0.01$; B antigen and anti-B 0.86 ± 0.09 vs. 0.24 ± 0.06 , $P < 0.05$), while the difference between test well and control was not statistical significance when purified antigen reacted with other type antibodies. In the erythrocyte agglutination inhibition experiment, the antigen we purified could inhibit the reaction between the corresponding antibody and erythrocytes completely, but had no effect on the reaction of other type antibodies and erythrocytes. Then when we did serum antibody adsorption test, we found that purified antigen had higher adsorption efficiency than unpurified antigen (97.00 % vs. 88.00 %, $P < 0.001$). In serum antibody adsorption test of clinical samples, the adsorption efficiency of purified A antigens against anti-A IgG/IgM were 96.88 %, 98.44 % respectively, purified B antigen against anti-B IgM/IgG were 96.88 %, 98.44 % respectively. **Conclusion:** The purified antigens could specifically bind to anti-A or anti-B to adsorb blood group antibodies in serum with good effect, which were expected to be used as substitutes for the synthetic A/B antigen.

Key words: Immunomagnetic separation; Blood group A antigen; Blood group B antigen; Immunoabsorption

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q64; R446.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)14-2617-06

前言

在进行器官移植时,通常会遇到 ABO 血型不合的情况,此

* 基金项目:湖北省卫生计生委采供血专项基金项目(WJ2015CB005)

作者简介:宋晶晶(1991-),硕士研究生,主要研究方向:血型免疫,电话:15071441120, E-mail: jingbmmzz@126.com

Δ 通讯作者:沈长新,博士,副教授,主要研究方向:血型免疫, E-mail: shencx1975@sina.com

(收稿日期:2017-10-13 接受日期:2017-11-08)

术前特异性去除患者血清中的 A/B 抗体是预防超急性排斥反应、避免移植失败的有效方法^[1-3]。特异性去除血清中的 A/B 抗体需用到内含 A/B 抗原的免疫吸附柱,而 A/B 抗原合成困难^[4],造成免疫吸附柱价格昂贵,很大程度上增加了患者的经济压力。目前,合成 A/B 抗原的主要方法是化学合成法和酶合成法。以化学合成法生产 A/B 抗原时,单糖单元之间较难形成具有准确立体构象的糖苷键^[5],以至于合成效率不高。而酶合成法中,活性糖供体和相应的糖基转移酶是关键试剂,两者都价格不菲^[6]。因此,找到一种效率高、成本低的方法来生产 A/B 抗原就十分必要。我们建立了一种基于免疫磁珠技术分离唾液 A/B 血型抗原并可用于血清抗体吸附的方法,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

BeaverBeads™ Magrose NHS 试剂盒及磁力架(BEAVER, 苏州),抗 A 单克隆抗体 NaM87-1F6 (BD Biosciences, 美国),抗 B 单克隆抗体 HEB-29(SIGMA-ALDRICH, 美国),抗人 IgG 抗体、四甲基联苯胺(TMB)、终止液(EUROIMMUN, 德国),抗 H 单克隆抗体、2-Me(上海血液生物医药有限责任公司),Coombs 微柱凝胶卡、中性卡(Diagnostic Grifols, 西班牙),分光光度计(Nano Drop2000, 美国),超微量分光光度计(Nano Drop2000c, 美国),微柱凝胶卡专用离心机(Grifols, 西班牙)。

1.2 样本来源

本研究所使用的临床血清样本来源于武汉大学中南医院 2016 年 5 月至 2017 年 4 月用于血型鉴定和产前孕妇抗 A/B IgG 检测的标本。纳入标准:(1)血型符合实验要求;(2)血清中含实验所需的抗体。排除标准:溶血、脂血、不规则抗体阳性、患有自身免疫性疾病者。

本研究所入选研究对象均知情并自愿签署知情同意书,研究方案经武汉大学中南医院伦理委员会批准。

1.3 含糖蛋白类 A/B 抗原唾液的预处理

从分型型 A/B 型血的健康志愿者中收集新鲜唾液。提取过程如下:取 5-10 mL 唾液冷冻数天以去除粘液,1300× g 离心 10 min。将上清煮沸 10 min,再离心 10 min,取上清,即获得含有 A/B 抗原的原始试剂。

1.4 免疫磁珠的包被及抗原纯化

分别使用单克隆抗体 A/B 作为偶联试剂,各取 50 μL 与洗涤过的磁珠(50 μL, 20% (v/v), 20~30 μmol/mL)混合。该磁性微粒直径 30~100 μm,在其琼脂糖外壳的表面固定有 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)偶联基团。混合物于 1.5 mL EP 管中摇晃混匀 2 h(全部操作均在室温下进行),然后用 3 M 乙醇胺(pH 9.0)封闭 2 h,并与经过预处理的唾液(0.1 mL)混合孵育 1 h。洗涤数次后,用洗脱缓冲液(0.1 M 甘氨酸-HCl, 2 M 尿素, pH 2.9)洗脱 10 min,在外加磁场的作用下,分离出上清液即为纯化的抗原物质。免疫磁珠分离的流程图及原理图如图 1 所示。

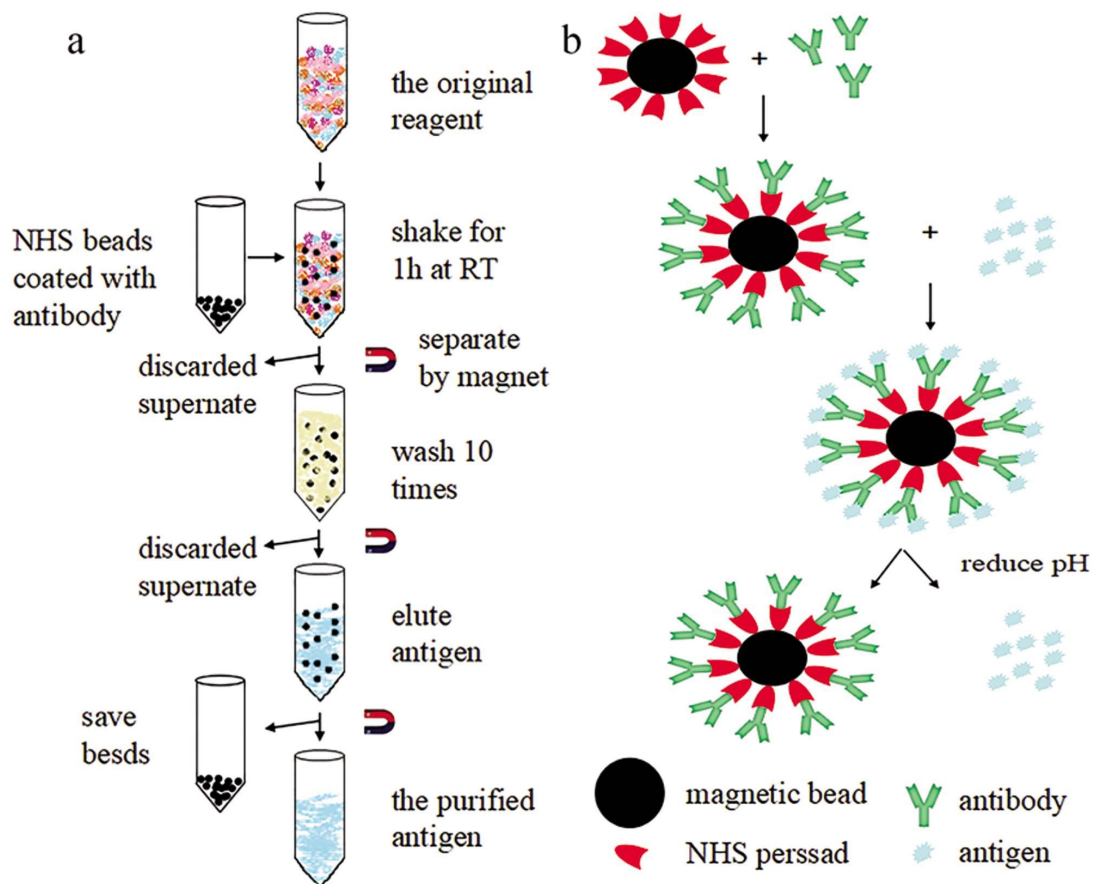


图 1 免疫磁珠分离的流程图和原理图

Fig. 1 The flow diagram and schematic diagram of IMS

a, flow diagram; b, schematic diagram.

1.5 纯化抗原的特异性检测

1.5.1 酶联免疫吸附测定(ELISA) 用所得抗原物质(包括未纯化的抗原和纯化后抗原) 分别包被 96 孔板, 用含 1 % BSA 的 TBS 封闭, 随后将 100 μ L 不同血型的血清(A 型、B 型或 AB 型, 分别含有 B 抗体、A 抗体以及不含 A/B 抗体)加入反应孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。用含有 0.5 % Tween-20 的 TBST 洗涤除去未结合的抗体, 加入 HRP 标记的抗人 IgG 抗体和底物 TMB, 再加入终止液, 用分光光度计测定每孔 450 nm 处的吸光度(OD Value)。选择 TBS 包被的微孔作为空白对照。所有的实验均重复两次。

1.5.2 红细胞凝集抑制试验 通过倍比稀释法确定 A/B/H 抗体的效价, 并以此为稀释倍数配制抗体备用。然后将 50 μ L 抗体和 50 μ L 抗原孵育 30 min, 再加入 50 μ L 与抗体类型相对应的洗涤红细胞(2 %), 反应 30 min 后, 移入微柱凝胶卡中, 85 g 离心 10 min。不含抗原的反应孔作为对照。

1.6 磁珠循环使用实验

理论上包被好抗体的磁珠在保存妥当的情况下可重复使用, 为验证其重复使用性能, 以包被有单克隆抗 A 抗体的磁珠为代表, 循环使用七次进行原始试剂的纯化实验, 其中每轮用于获得 A 抗原的原始试剂为同一样本。用微量分光光度计测定每次洗脱液中抗原的浓度, 以第一轮洗脱抗原浓度为百分比, 计算各轮洗脱抗原的浓度百分比。

1.7 血清抗体吸附

以未纯化的原始抗原 A/B 和纯化抗原 A/B 分别包被磁性微粒, 制成吸附抗体用磁珠, 以 1: 10 的体积比, 与上述 O 型血

血清混合孵育 1 h。磁性分离磁珠, 洗脱掉抗体后保存。采用盐水法, 确定吸附后各血清样本 IgM 抗 A/B 的效价。2-Me 破坏 IgM 后, 微柱凝胶法测定 IgG 抗 A/B 效价, 并计算各类型抗原的吸附效率(adsorption efficiency)。所有实验重复两次。吸附效率 = 1 - (吸附后抗体效价 / 吸附前抗体效价)。

1.8 统计学分析

本研究的数据分析应用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 5.0。数据以均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)或者中位数(四分位间距)的形式表示。吸光度的比较用配对 t 检验; 吸附前后抗体效价作对数转换后, 再用配对 t 检验比较, 不同组吸附效率的比较用 Kruskal-Wallis 检验, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 未纯化抗原和纯化抗原的 ELISA 检测结果

用未纯化的 A/B 抗原和纯化的 A/B 抗原包被微孔板, 分别与 A 型血清(含抗 B 抗体)、B 型血清(含抗 A 抗体)、AB 型血清(不含抗 A 和抗 B 抗体)反应, 测定各孔的吸光度。图中横坐标代表所加入的血清类型。每两个孔为一组, 前者包被有相应抗原, 后者则包被等量 TBS, 作为前者的阴性对照。结果显示: 纯化抗原仅与含有对应抗体的血清反应, 其吸光度明显高于对照孔($P < 0.001$), 和其它类型血清反应时, 与对照孔相比差异无统计学意义(图 A2、B2), 说明纯化的抗原特异性较好, 不存在交叉反应。而未纯化抗原与三种血清反应时, 吸光度值都明显高于对照孔($P < 0.001$, 图 A1、B1), 说明未纯化抗原与血清的反应无特异性, 存在明显的交叉反应。

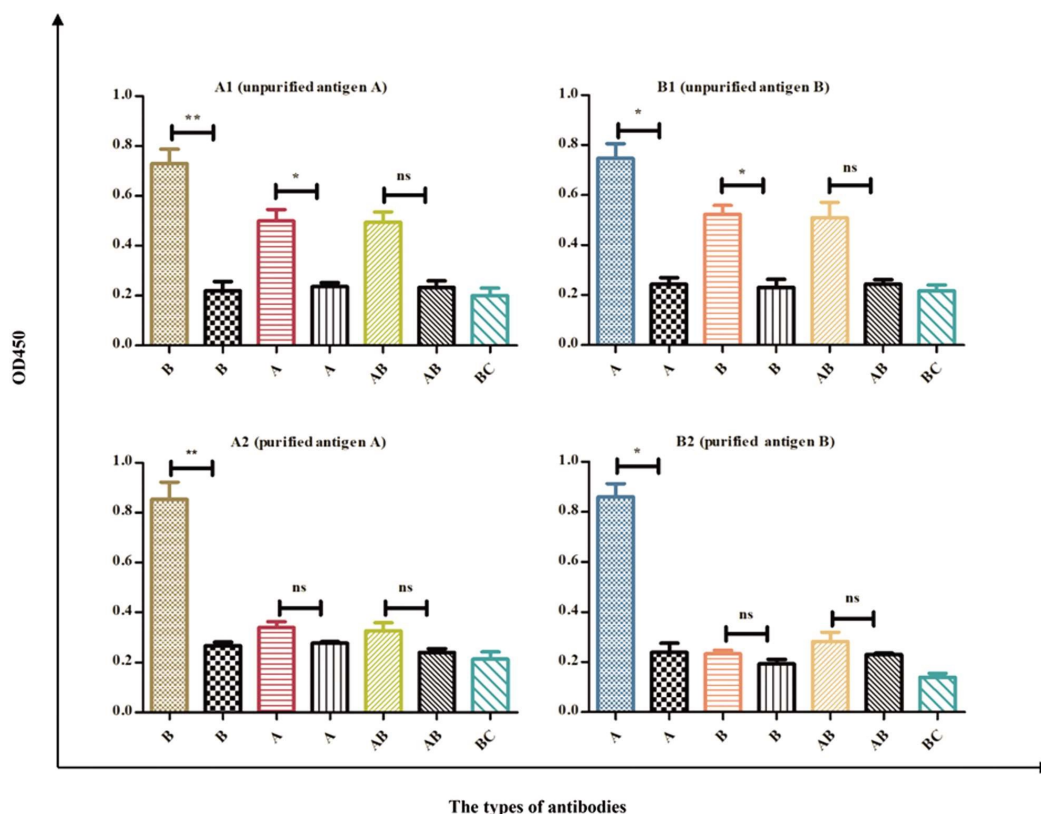


图2 ELISA 结果

Fig.2 The results of ELISA

Every two wells were defined as a group. The former coated the corresponding antigen, and the latter coated TBS as the negative control of the former.

BC, blank control; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, $P > 0.05$, without statistical significant compared with the control well.

2.2 未纯化抗原和纯化抗原红细胞凝集抑制试验

用未纯化 A/B 抗原和纯化 A/B 抗原分别与抗 A、抗 B、抗 H 抗体孵育,再加入与抗体类型一致的红细胞,检测抗原是否能抑制红细胞的凝集。每两个孔为一组,前者含有相应抗原,后者则加入等量生理盐水,作为前者的阴性对照。结果显示:纯化

后的 A 抗原可抑制抗 A 抗体与 A 型红细胞的反应,对其它类型抗体及红细胞的凝集没有抑制作用(图 A2);同样的纯化 B 抗原也只能抑制抗 B 抗体与 B 型红细胞的凝集反应(图 B2);相比之下未纯化抗原对抗体的抑制作用较弱(图 A1、B1)。

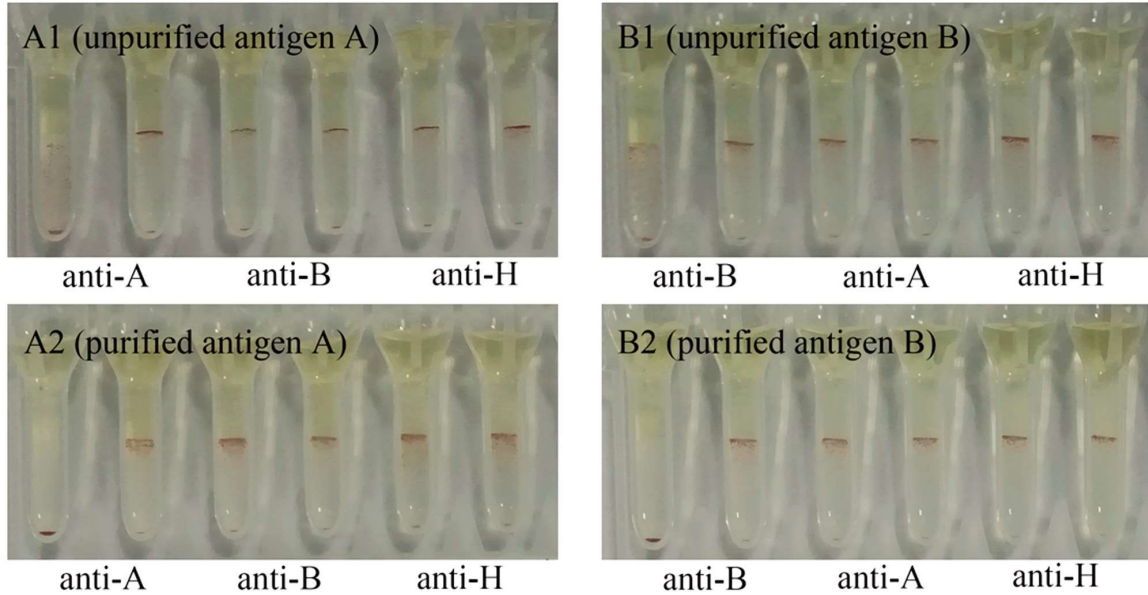


图3 凝集抑制实验结果

Fig.3 The results of hemagglutination inhibition test

Every two wells were defined as a group. The former coated the corresponding antigen, and the latter coated TBS as the negative control of the former.

2.3 磁珠的循环使用性能

用包被有抗体的磁珠纯化抗原,磁珠循环使用 7 次,以第一次洗脱的抗原浓度为百分之百,计算每轮的洗脱效率。实验结果显示:重复使用 7 次后,所得纯化抗原的浓度还能维持在初次使用的 80 %以上,见图 4。

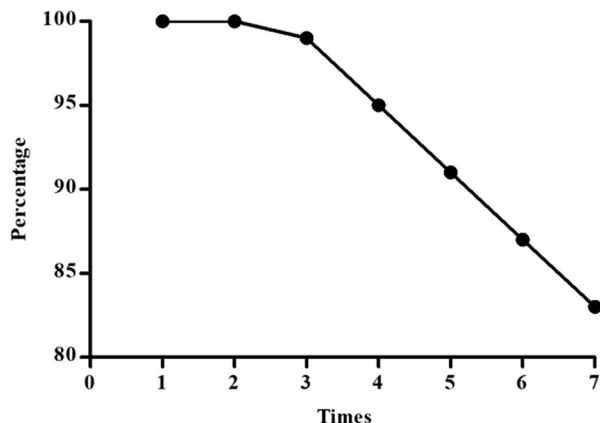


图4 磁珠循环使用的实验结果

Fig.4 The result of cyclic utilization of the magnetic beads

2.4 纯化抗原与未纯化抗原对同一样本吸附效果的比较

在已知抗体效价的 O 型血清中(抗 A 效价 IgM 128, IgG 256, 抗 B 效价 IgM 64, IgG 128),分别加入未纯化 A/B 抗原和纯化 A/B 抗原,记录各类型抗原吸附后血清中抗 A/B 抗体的效价及吸附效率。实验重复 10 次,表中所示的数据为 10 次实验的中位数(四分位间距)。结果显示:抗原纯化后具有更强的吸

附能力,对抗 A/B IgM 的吸附效率为 96.88 %,对 IgG 的吸附效率为 98.44 %(表 1)。总体而言,纯化抗原的吸附效率为 97.00 %,而未纯化抗原的吸附能力较弱,为 88.00 %,两者比较差异有统计学意义($P < 0.001$,表 2)。

2.5 纯化抗原对临床样本抗体的吸附效果

取 100 份来自 O 型孕妇的、均含有抗 A/B IgM、IgG 的血清样本,用纯化抗原 A 吸附血清中抗 A IgM、IgG,用纯化抗原 B 吸附血清中抗 B IgM、IgG,分别检测并记录吸附前后各类型抗体的效价。结果显示:经纯化抗原吸附后样本抗体效价均明显下降($P < 0.001$)。总体而言,纯化抗原对各类型抗体的吸附效率均在 96.00 %以上,纯化抗原对 IgG 类抗体的吸附效率比 IgM 类显著升高($P < 0.001$),见表 3。

3 讨论

Landsteiner 最早在 20 世纪初发现了 ABO 血型系统。此后,随着技术的进步和人类基因组计划的完成,目前已经鉴定出 35 个血型系统,共包括 300 多个血型抗原^[7-9]。其中,A/B 抗原在医学中最为重要,机体普遍存在针对 A/B 抗原的免疫应答。在 ABO 血型不合的器官移植中,需要大量的 A/B 抗原吸附患者血清中的抗 A/B 抗体,但目前 A/B 抗原合成困难、价格昂贵,造成此类患者医疗负担沉重。

免疫磁珠分离(immunomagnetic separation, IMS)是一种以抗体与靶标生物标志物的相互作用为基础的分选纯化技术^[10],具有简单、高效、分离迅速及不引入化学污染等优点^[11]。这种固相分离技术可与其它技术相结合,广泛应用于许多生物分子的

测定^[12-14]。进行 IMS 时,首先需将抗体固定在磁珠的表面,制备出可与靶标分子特异性结合的吸附磁珠。通常使用的磁珠直径处于微米和纳米级别,这有利于提高吸附粒子的表面积体积比。在合适的条件下,使得携带有抗体的吸附粒子能够从原材

料中更有效和快速地提取、纯化和浓缩靶分子。随后使用外部磁体回收磁珠,并通过降低 pH 等措施降低抗原抗体结合力,使目标抗原从磁珠表面释放。

表 1 纯化抗原与未纯化抗原对四种类型抗体吸附效率的比较

Table 1 The comparison of adsorption efficiency of unpurified antigen and purified antigen to four kinds of antibodies

Antigen	Antibody	Antibody titer before adsorption	Antibody titer after adsorption (Mean± SD)	Adsorption efficiency
				Median (25 Percentiles, 75 Percentiles)
Unpurified antigen A	Anti-A IgM	128	19.70 ± 1.40	87.50 % (78.13 %, 87.50 %)
	Anti-A IgG	256	5.28 ± 1.43	93.75 % (93.75 %, 93.75 %)
Purified antigen A	Anti-A IgM**	128	16.00 ± 1.39	96.88 % (93.75 %, 96.88 %)
	Anti-A IgG**	256	3.73 ± 1.25	98.44 % (98.44 %, 98.44 %)
Unpurified antigen B	Anti-B IgM	64	6.06 ± 1.43	87.50 % (87.50 %, 92.81 %)
	Anti-B IgG	128	2.00 ± 1.39	87.50 % (87.50 %, 87.50 %)
Purified antigen B	Anti-B IgM**	64	17.15 ± 1.25	96.88 % (96.87 %, 96.87 %)
	Anti-B IgG**	128	2.46 ± 1.39	98.44 % (97.27 %, 87.50 %)

Adsorption efficiency = 1 - (Antibody titer after adsorption / Antibody titer before adsorption)

**, P<0.01.

表 2 纯化抗原与未纯化抗原总体吸附效率的比较

Table 2 The comparison of the overall adsorption efficiency of unpurified antigen and purified antigen

Antigen	Adsorption efficiency	Median (25 Percentiles, 75 Percentiles)	
		Z	P
Unpurified antigen	88.00 % (88.00 %, 94.00 %)	-5.468	< 0.001
Purified antigen***	97.00 % (97.00 %, 98.00 %)		

表 3 纯化抗原的吸附效率

Table 3 The adsorption efficiency of purified antigens

Antibody	Antibody titer		Adsorption efficiency		
	Before (Mean ± SD)	After (Mean ± SD)	Median (25 Percentiles, 75 Percentiles)	Z	P
Anti-A IgM	139.10 ± 2.52	3.05 ± 3.10	96.88 % (96.88 %, 98.44 %)	-8.698	< 0.001
Anti-A IgG	474.41 ± 2.45	8.51 ± 2.01	98.44 % (96.88 %, 98.44 %)	-8.702	< 0.001
Anti-B IgM	90.51 ± 2.14	2.16 ± 3.29	96.88 % (96.88 %, 98.44 %)	-8.694	< 0.001
Anti-B IgG	207.94 ± 2.68	4.06 ± 2.76	98.44 % (96.88 %, 98.44 %)	-8.697	< 0.001
IgM	-	-	96.88 % (96.88 %, 98.44 %)	-3.639	< 0.001
IgG	-	-	98.44 % (96.88 %, 98.44 %)		

红细胞膜上的 A/B 抗原为糖脂类,是由特定基因编码的糖基转移酶催化合成^[15,16]。A/B 抗原的前体都是 H 抗原,A 基因编码的 N-乙酰半乳糖胺转移酶能把 H 抗原转化成 A 抗原,B 基因编码的半乳糖转移酶能把 H 抗原转化成 B 抗原^[17]。这种碳水化合物分离后不宜保存,并且不易与磁珠偶联,而唾液中的 A/B 抗原为糖蛋白,易与 NSH 磁珠偶联且保存时间久,故本研究选用唾液作为抗原来源。

为了探究所获得的血型物质是否具有特异性结合相应抗体的能力,我们用 ELISA 方法来验证,结果表明纯化后的抗原物质,均能与对应抗体特异结合,且纯度相对较高,不存在与其它血型抗体之间的交叉反应,而未纯化抗原交叉反应明显,这

与唾液中还存在其它系统的血型物质有关,如 Lewis 抗原等^[18-20]。红细胞凝集抑制试验再次验证了获得抗原与对应抗体的结合能力,且纯化抗原具有较强的抗原性,可以抑制对应抗体与红细胞的结合。本研究的一大特色为磁珠的循环使用性能。可重复使用的磁珠及简便快捷的分离、洗脱过程,使抗原纯化的经济成本和时间成本都大大降低。磁珠的循环使用性能实验结果表明重复使用 7 次后,所得纯化抗原的浓度还能维持在初次使用的 80 % 以上。我们在 O 型血清中分别加入 4 种不同的抗原,与血清中的血型抗体反应,观察不同抗原对血型抗体的去除效果,结果表明纯化抗原对抗体的吸附效率比未纯化抗原更强。在临床样本吸附实验中,纯化抗原对不同抗体的吸附效率

均在 96.00 % 以上,吸附效果理想,且纯化抗原对 IgG 类抗体的吸附效率要高于 IgM,这可能与 IgM 类抗体为五聚体,在同等浓度的条件下可结合更多抗原有关。

进行大批量纯化抗原生产时,可召集符合要求的志愿者进行有偿或无偿的唾液采集。采集样本前,志愿者只需提前刷牙并漱口 3 次,便可自行采集样本。采集容器可选择带盖子的宽口洁净瓶子。整个采集过程简单、快捷、无创、可自助完成。无特殊情况,志愿者可每周采集一次,相比献血而言,采集间期大大缩短。采集的新鲜唾液可于 -20 °C 长期保存。

本研究表明用免疫磁珠分离技术可从唾液中获得纯化 A/B 抗原,并可以此作为血清中 ABO 血型抗体吸附剂。该技术具有操作简便快捷,无需特殊仪器,瞬时分离及磁珠可循环使用等优点,为制备血型抗原提供了新的思路及方法,具有很大的研究价值和应用前景。

参考文献(References)

- [1] Norden G, Briggs D, Cockwell P, et al. Abo-incompatible live donor renal transplantation using blood group a/b carbohydrate antigen immunoadsorption and anti-cd20 antibody treatment[J]. *Xenotransplantation*, 2006, 13(2): 148-153
- [2] Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant [J]. *The New England journal of medicine*, 1999, 341(23): 1725-1730
- [3] Morath C, Zeier M, Dohler B, et al. Abo-incompatible kidney transplantation[J]. *Frontiers in immunology*, 2017, 8(2): 234-247
- [4] Tyden G. The european experience [J]. *Transplantation*, 2007, 84(12 Suppl): S2-3
- [5] Ryzhov IM, Korchagina EY, Popova IS, et al. Block synthesis of a tetrasaccharides (types 1, 3, and 4) related to the human abo blood group system[J]. *Carbohydrate research*, 2012, 351(3): 17-25
- [6] Yi W, Shao J, Zhu L, et al. Escherichia coli o86 o-antigen biosynthetic gene cluster and stepwise enzymatic synthesis of human blood group b antigen tetrasaccharide [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(7): 2040-2041
- [7] Ewald DR, Sumner SC. Blood type biochemistry and human disease [J]. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*, 2016, 8(6): 517-535
- [8] Patnaik SK, Helmberg W, Blumenfeld OO. Bgmut database of allelic variants of genes encoding human blood group antigens [J]. *Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, 2014, 41(5): 346-351
- [9] Yu Y, Ma C, Sun X, et al. Frequencies of red blood cell major blood group antigens and phenotypes in the chinese han population from mainland china[J]. *International journal of immunogenetics*, 2016, 43(4): 226-235
- [10] Tang M, Wen CY, Wu LL, et al. A chip assisted immunomagnetic separation system for the efficient capture and in situ identification of circulating tumor cells[J]. *Lab on a chip*, 2016, 16(7): 1214-1223
- [11] Gilardoni LR, Fernandez B, Morsella C, et al. Mycobacterium paratuberculosis detection in cow's milk in argentina by immunomagnetic separation-pcr[J]. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 2016, 47(2): 506-512
- [12] Rosenbaum A, Bleck E, Schneider M, et al. Assessment of direct versus indirect magnetic bead-based t-cell isolation procedures followed by magnetic bead-based DNA isolation[J]. *Lupus science & medicine*, 2016, 3(1): e000167- e000173
- [13] Yoon JG, Kang JS, Hwang SY, et al. Magnetic bead-based nucleic acid purification kit: Clinical application and performance evaluation in stool specimens[J]. *Journal of microbiological methods*, 2016, 124(6): 62-68
- [14] Waller D, Hew B, Holdaway C, et al. Rapid detection of bacillus anthracis spores using immunomagnetic separation and amperometry[J]. *Biosensors*, 2016, 6(4): 61-72
- [15] Takahashi Y, Kubo R, Sano R, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress abo transcription in vitro, leading to reduced expression of the antigens[J]. *Transfusion*, 2016, 5(4): 36-44
- [16] Westman JS, Benktander J, Storry JR, et al. Identification of the molecular and genetic basis of px2, a glycosphingolipid blood group antigen lacking on globoside-deficient erythrocytes[J]. *The Journal of biological chemistry*, 2015, 290(30): 18505-18518
- [17] Kuhlmann FM, Santhanam S, Kumar P, et al. Blood group o-dependent cellular responses to cholera toxin: Parallel clinical and epidemiological links to severe cholera [J]. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2016, 95(2): 440-443
- [18] Carmona-Vicente N, Allen DJ, Rodriguez-Diaz J, et al. Antibodies against lewis antigens inhibit the binding of human norovirus gii.4 virus-like particles to saliva but not to intestinal caco-2 cells[J]. *Virology journal*, 2016, 13(2): 82-91
- [19] Hong YJ, Hwang SM, Kim TS, et al. Significance of lewis phenotyping using saliva and gastric tissue: Comparison with the lewis phenotype inferred from lewis and secretor genotypes [J]. *BioMed research international*, 2014, 2014(3): 573-582
- [20] Corvelo TC, de Loiola Rdo S, Aguiar DC, et al. The lewis histo-blood group system: Molecular analysis of the 59t > g, 508g > a, and 1067t > a polymorphisms in an amazonian population [J]. *PloS one*, 2013, 8(7): e69908- e69914

(上接第 2630 页)

- [17] 向斌. 食品包装中塑化剂问题解析 [J]. *中国包装*, 2011, 31(09): 51-53
Xiang Bin. Analysis of plasticizer in food packaging [J]. *Chinese packaging*, 2011, 31(09): 51-53
- [18] 鲍佳沁,王敏,高曦,等.邻苯二甲酸酯类暴露风险评估研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 35(23): 337-341
Bao Jia-Qin, Wang Min, Gao Xi, et al. Progress in risk assessment of human phthalate ester exposure [J]. *Food Science*, 2014, 35 (23): 337-341
- [19] 李银聪,阚建全,柳中.食品抗氧化剂作用机理及天然抗氧化剂[J]. *中国食物与营养*, 2011, 17(02): 24-26
Li Yin-cong, Kan Jian-quan, Liu Zhong. Mechanism of antioxidant in food and natural antioxidant [J]. *Food and Nutrition in China*, 2011, 17(02): 24-26
- [20] 李兴太,纪莹.线粒体氧化应激与天然抗氧化剂研究进展[J]. *食品科学*, 2015, 36(07): 268-277
Li Xing-tai, Ji Ying. Recent advances in mitochondrial oxidative stress and natural antioxidants [J]. *Food Science*, 2015, 36 (07): 268-277