

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.06.012

## 重组 EBV 壳抗原 BALF4 蛋白的制备及其在鼻咽癌患者检测中的应用

盛平<sup>1</sup>, 贺华<sup>1</sup>, 黄鑫<sup>2</sup> (1. 第二军医大学附属长征医院 神经外科 上海神经外科研究所, 上海 200003; 2. 上海大学环境与化学工程学院, 上海 200444)

**[摘要]** 目的: 制备重组 EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)壳抗原(viral capsid antigen, VCA)BALF4 蛋白, 并探讨其在鼻咽癌检测中的应用价值。方法: 采用 PCR 法从 EBV DNA 序列中扩增 BALF4 基因, 酵母表达载体 pPICZαA 连接, 重组 pPICZαA-BALF4 载体转染 GS115 酵母菌, 甲醇诱导重组 BALF4 蛋白表达并纯化。重组 BALF4 蛋白经 SDS-PAGE、Western blotting 鉴定后作为包被抗原, 制备 ELISA 试剂, 检测鼻咽癌患者 EBV-IgA 抗体。结果: 成功构建 pPICZαA-BALF4 表达载体, 并在 GS115 酵母菌中高效地表达重组 BALF4 蛋白。重组 BALF4 蛋白相对分子质量为 52 000, 经 Western blotting 证实重组 BALF4 蛋白具有免疫原性。重组 BALF4 蛋白作为包被抗原, 检测鼻咽癌患者和正常对照血清(各 300 份)中 EBV-IgA 抗体的灵敏度和特异性分别为 81% 和 94%。结论: 成功制备重组 EB 病毒壳抗原 BALF4 蛋白, 该蛋白在鼻咽癌血清筛选具有较高的敏感度及特异性。

**[关键词]** 鼻咽肿瘤; EB 病毒; 壳抗原; BALF4

**[中图分类号]** R739.63; R446.62; R730.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2010)06-0648-05

## Preparation of recombinant Epstein-Barr virus viral capsid antigen BALF4 protein and its application in nasopharyngeal carcinoma diagnosis

SHENG Ping<sup>1</sup>, HE Hua<sup>1</sup>, HUANG Xin<sup>2</sup> (1. Department of Neurosurgery & Shanghai Institute of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. School of Environment and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare recombinant BALF4 protein of VCA (viral capsid antigen) in Epstein-Barr virus and analyze its application in detection of nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods:** BALF4 gene was amplified from EBV DNA sequence by PCR and then inserted into pPICZαA pichia pastoris expression vector. Recombinant pPICZαA-BALF4 plasmid was transfected into GS115 yeast cells, and corresponding recombinant BALF4 protein was induced by methanol. The recombinant BALF4 protein was identified by SDS-PAGE and Western blotting analysis, and used as coating antigen for detection of EBV-IgA antibody in NPC patients by ELISA. **Results:** pPICZαA-BALF4 expression vector was successfully constructed, and recombinant BALF4 protein was effectively expressed in GS115 yeast cells. The molecular weight of recombinant BALF4 protein is approximately 52 000, and the recombinant BALF4 protein showed good immunoreactivity as detected by Western blotting analysis. Recombinant BALF4 protein was used as coating antigen in detecting EBV-IgA antibody levels in serum samples collected from NPC patients and healthy controls, and the sensitivity and specificity of VCA-BALF4 in the test were 81% and 94%, respectively. **Conclusion:** The recombinant BALF4 protein has been successfully prepared and it has satisfying sensitivity and specificity in serum screening of NPC patients.

**[Key words]** nasopharyngeal neoplasmas; Epstein-Barr virus; viral capsid antigen; BALF4

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(6): 648-652]

**[基金项目]** 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(No. 37-0111-08-003); 上海大学创新基金(No. 11-0111-09-08)。Project supported by the Special Scientific Foundation for Outstanding Young Teachers in Shanghai Higher Education Institutions(No. 37-0111-08-003), and the Innovation Foundation of Shanghai University(No. 11-0111-09-08)

**[作者简介]** 盛平(1980-), 女, 湖南省衡阳市人, 硕士, 主要从事肿瘤的分子生物学机制方面的研究。E-mail: shengping2005@yahoo.com.cn

**[通信作者]** 黄鑫(HUANG Xin, corresponding author), E-mail: huangxin\_china@163.com

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国及东南亚地区常见的一种恶性肿瘤, I ~ IV期鼻咽癌患者的5年生存率分别为95%、78%、49%和23%, IV期患者的平均生存时间则不到2年<sup>[1-3]</sup>。研究证实, EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)是鼻咽癌的重要诱发因子, 其相关抗体的检测作为鼻咽癌的辅助诊断及流行病学的筛查指标, 已成为常规实验室检查项目。

EBV是一种双链DNA病毒, 正常人群中90%以上的个体在3~5岁时就曾感染, 且终生携带<sup>[4]</sup>。现已发现多种人类肿瘤与EBV相关, 如Burkitt淋巴瘤、霍奇金病、鼻咽癌等, 其中以EBV与鼻咽癌发病的关系最受关注。EBV的各抗原中, 以EBV壳抗原(viral capsid antigen, VCA)是最早应用于鼻咽癌检测的诊断抗原, 在鼻咽癌患者血清中的检出率最高。VCA至少由30种不同的蛋白组成, 成分复杂, 针对鼻咽癌患者VCA-IgA抗体的相关靶抗原分子仍无法充分定位<sup>[5]</sup>。为及时而准确地对鼻咽癌患者进行早期诊断和治疗, 利用DNA重组技术寻找理想的基因工程EBV-VCA抗原用于制备诊断试剂, 已成为亟待解决的问题。gp125是VCA的主要抗原多肽, 由EBV基因组中BALF4基因编码。本研究选择BALF4基因片段(aa302~802)进行体外重组, 重组质粒转化毕赤酵母系统表达重组BALF4蛋白, 并对BALF4蛋白在鼻咽癌检测中的敏感性与特异性进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

300份病理确诊为NPC患者的血清样本来自中山大学附属肿瘤医院、江苏省肿瘤医院。男性121例、女性179例, 平均年龄(45±25)岁, 均为首次发病, 未经治疗。300份健康对照人员标本来自上海长征医院健康体检者, 男性172例、女性128例, 平均年龄(43±22)岁。所有参试人员均经证实无EBV相关疾病并签署知情同意书, 报医院伦理委员会批准。

### 1.2 细胞株和主要实验材料

B95-8淋巴细胞用含10% FCS、100 U/ml青霉素及10 μg/ml链霉素的RPMI 1640培养液在37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养, 每周换液2次, 于对数增殖期提取细胞全序列DNA。大肠杆菌DH5α及含EBV病毒全基因序列的B95-8细胞购于中山大学基础医学院, 载体pPICZα购自Invitrogen公司, 限制性内切酶EcoR I、Not I、Pme I购自华美公司,

TaqDNA聚合酶、T4DNA连接酶购自Promega公司, DNA回收及纯化试剂盒购自基因公司, 蛋白胨及YNB购自Difco公司, 碱性磷酸酶标记的兔抗人IgA抗体及HRP标记的羊抗人IgA等均购于福州迈新生物有限公司。其余试剂均为分析纯试剂。

### 1.3 pPICZα-BALF4重组质粒的构建

根据已知EBV全基因序列设计BALF4(1413 bp)基因扩增引物, P1为5'-GGAATTCATGGTGGGCATAGAGCTCCCGG-3'; P2为5'-CGGCGGC-CGCATGCAGCGCTAACATGATGGC-3'(下划线部分为EcoR I和Not I酶切位点)。引物由上海博亚公司合成。以EBV病毒全基因序列为模板, 按以下条件进行扩增: 94℃预变性5 min, 然后94℃变性1 min, 58℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 经35个循环后, 72℃延伸10 min。PCR产物与载体质粒pPICZα用EcoR I、Not I双酶切, 然后以T4 DNA连接酶4℃连接过夜。连接产物转化至感受态大肠杆菌DH5α, 在含Zeocin(终质量浓度为2.5 μg/μl)的低盐LB平板上倒置培养过夜。次日挑取单个菌落于含Zeocin的低盐LB液体培养基中扩增, 提取质粒pPICZα-BALF4, EcoR I和Not I双酶切鉴定, 重组质粒送上海博亚公司测序做鉴定。

### 1.4 pPICZα-BALF4质粒转染酵母菌及重组BALF4蛋白的诱导表达

pPICZα-BALF4重组质粒用Pme I线性化, 电穿孔法转染酵母菌GS115(mut<sup>+</sup> His<sup>-</sup>), 涂菌于含25 μg/ml Zeocin™ YPDS平板上, 30℃培养3~10 d, PCR法筛选阳性重组子。mut<sup>+</sup>表型筛选使用MMH和MDH平板。将重组酵母菌株接种于BMYG液体培养基中, 30℃250×g约16~18 h, 当D<sub>600</sub>值为2~6时离心收获细胞, 并重悬于BMMY液体培养基中, 29℃250 r/min振荡培养, 每24 h补充甲醇到终体积分数为0.5%诱导表达。甲醇诱导表达后的24、48、72、96和120 h各时间点分别取样1 ml于1.5 ml离心管中离心, 分离培养上清, 用于检测各时间点总蛋白含量和目的蛋白效价, 从而确定最佳的诱导表达时间。

### 1.5 重组BALF4蛋白的纯化

细胞培养上清中的重组BALF蛋白经饱和硫酸胺盐析后, 过SephadexG-25葡聚糖凝胶柱脱盐, 更换为起始缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L NaCl, pH 7.0), 用DEAE-Sepharose Fast Flow琼脂糖阴离子交换柱纯化, 柱体积(16 mm×25 mm), 在FPLC层析装置上流速2 ml/min, 走纸速度10 mm/min。平衡液及样品缓冲液为50 mmol/L Tris-

HCl (pH 7.0), 不连续梯度洗脱, NaCl 浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6 和 1 mol/L, 过分子筛, 然后 Western blotting 和 ELISA 检测蛋白活性和效价。

### 1.6 Western blotting 检测重组 BALF4 蛋白

收集含有重组 BALF4 蛋白的上清进行 SDS-PAGE, 然后转至 PVDF 膜, 膜经洗涤封闭后加入 EBV 阳性血清, TBST 洗涤 2 次, 然后加入碱性磷酸酶标记的兔抗人 IgA 抗体, 将底物 DAB 加入 PVDF 膜中, 待其显色进行检测。

### 1.7 ELISA 法检测重组 BALF4 蛋白的效价

用包被缓冲液将待测重组 BALF4 蛋白做一系列的倍比稀释(1:10, 1:20, 1:40, ……1:40 960, 1:81 920), 用 ELISA 法测定重组 BALF4 蛋白的效价。将稀释好的 BALF4 蛋白包被聚丙烯板条, 每个浓度 4 孔, 100 μl/孔, 4 °C 吸附过夜。进行封闭、上样(EBV 阳性血清与正常人血清各 2 孔)、洗涤, 加入 HRP-羊抗兔 IgA 及 DAB, 显色、比色。选取阳性样本 D 值大于正常对照组均值加上 2 倍标准差的最大稀释比例, 即为该重组 BALF4 蛋白的效价。

### 1.8 间接法 ELISA 检测鼻咽癌患者血清中 BALF4-IgA 抗体

稀释纯化后的重组 BALF4 蛋白作为检测抗原, 100 ng/100 μl 每孔包被聚丙烯反应板。牛血清封闭后加入检测对象血清(经病理确诊鼻咽癌患者及健康体检人群血清各 300 例)。孵育、洗涤, 加入 HRP 标记的羊抗人 IgA Fab 段[goat F(ab)<sub>2</sub> anti-human IgA-HRP]及 BAD 显色, 450 nm 波长处测定光密度 D 值, 检测血清中 BALF4-IgA 抗体水平。样品 D 值大于正常对照组均值加上 2 倍标准差判断为阳性, 否则为阴性。灵敏度 = 鼻咽癌患者血清中阳性检出例数/患者血清总例数, 特异性 = 健康对照组中阴性检出例数/对照组血清总例数。

## 2 结果

### 2.1 pPICZα-BALF4 重组质粒的构建和鉴定

以 EBV 全基因序列为模板, 用设计合成的引物扩增 BALF4 基因, 所得扩增产物以 EcoR I 和 Not I 双酶切后经溴化乙啶染色, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在 1 413 bp 处可见到清晰条带, 与理论上 BALF4 基因的大小完全符合(图 1)。

PCR 扩增 BALF4 基因片段与 pPICZαA 载体连接并转化大肠杆菌, 将挑选的单菌落扩大培养, 提取质粒, EcoR I 和 Not I 双酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示空载体为一条 3 593 bp 的条带, 重组质粒被内切酶分为两个条带: 一条 3 593 bp 左右的带为载

体质粒, 另一条带为 1 413 bp, 与 BALF4 基因的 PCR 产物大小一致(图 2)。由此证明, pPICZαA-BALF4 重组载体构建成功。DNA 序列分析结果表明插入的基因片段与 GenBank 中的 BALF4 基因片段序列一致, 扩增过程中未出现碱基错配且读码框架正确。

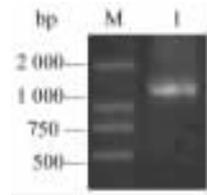


图 1 PCR 扩增 BALF4 基因

Fig.1 Amplification of BALF4 gene by PCR  
M: DL2000 DNA marker; 1: pPICZα-BALF4

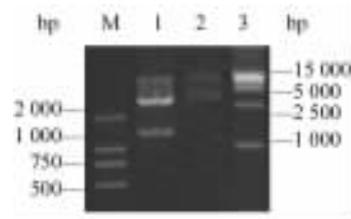


图 2 pPICZα-BALF4 重组质粒的双酶切鉴定  
Fig.2 Identification of pPICZα-BALF4 recombinant plasmid by double endonuclease digestion

M: DL2000 DNA marker; 1: pPICZα-BALF4;  
2: pPICZαA and Not I; 3: DL15000 DNA marker

### 2.2 重组 BALF4 蛋白的酵母表达

经鉴定插入方向正确且无突变的 pPICZα-BALF4 质粒用 Pme I 酶切线性化并电击转入 GS115 酵母细胞, 于含 Zeocin(终质量浓度 10 μg/μl)的 YPDS 平板上生长, 数日后平板上可见白色圆形独立克隆的菌落形成。所得阳性克隆破壁后做 PCR 扩增鉴定转化子, PCR 扩增产物经琼脂糖电泳显示 1 413 bp 处有清晰条带出现(图 3), 说明 pPICZα-BALF4 质粒成功转入酵母细胞内。分别将甲醇诱导后重组 BALF4 蛋白上清、含空质粒的 GS115 酵母菌以及未经诱导的含重组 pPICZα-BALF4 质粒的 GS115 酵母上清进行 SDS-PAGE(图 4)。经诱导的重组 BALF4 蛋白在 52 000 处有相应条带出现, 而未诱导及空质粒泳道则无相应蛋白条带出现。

### 2.3 重组 BALF4 蛋白的纯化

纯化后的重组 BALF4 蛋白经 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色后可见杂带明显消失, 于 52 000 处出现一条特异性清晰条带(图 5)。

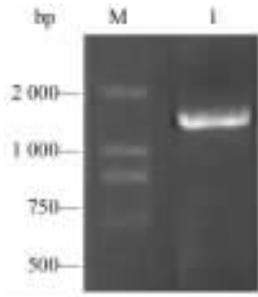


图3 PCR 鉴定 pPICZ $\alpha$ -BALF4 质粒成功转染酵母细胞

Fig. 3 pPICZ $\alpha$ -BALF4 plasmid was successfully transfected into yeast as identified by PCR

M: DL2000 DNA marker; 1: BALF4

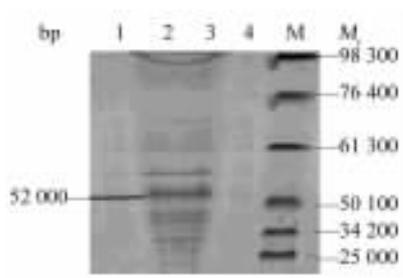


图4 重组 BALF4 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant BALF4 protein

1: Induced pPICZ $\alpha$ -BALF4-GS115 supernatant;  
2: Induced pPICZ $\alpha$ -GS115 supernatant;  
3: pPICZ $\alpha$ -BALF4-GS115 supernatant; M: Marker

#### 2.4 重组 BALF4 蛋白的免疫原性鉴定

将纯化的重组 BALF4 蛋白产物进行 SDS-PAGE 后,电转移到 PVDF 膜上进行 Western blotting 分析(图6)。结果显示,重组表达蛋白与 EBV 阳性血清反应,在相对分子质量约 52 000 处出现一条特异性条带。

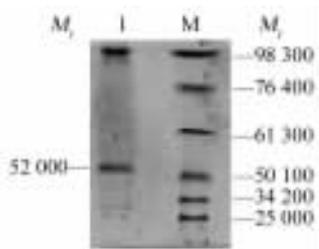


图5 纯化后重组 BALF4 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified recombinant BALF4 protein

M: Marker; 1: Purified BALF4 protein

#### 2.5 重组 BALF4 蛋白抗原的效价

将纯化的重组 BALF4 蛋白倍比稀释后包板,以鼻咽癌阳性血清为标准,测得重组 BALF4 蛋白抗原的效价为 1:20 480,复板检测显示重复性良好。



图6 重组 BALF4 蛋白的 Western blotting 鉴定

Fig. 6 Identification of recombinant BALF4 protein by Western blotting analysis

#### 2.6 重组 BALF4 蛋白检测鼻咽癌患者 BALF4-IgA 抗体的灵敏度和特异性

用重组 BALF4 蛋白作为包被抗原,用间接法 ELISA 检测鼻咽癌患者和正常对照血清各 300 例,两组阳性检出例数分别为 243 和 13。依据公式得出灵敏度与特异性分别为 81% 和 94%。

### 3 讨论

EBV 抗体检测作为鼻咽癌的辅助诊断及流行病学的筛查指标,在提高鼻咽癌的诊断及早期发现率方面发挥着重要作用,已为国内外医疗单位广泛采用<sup>[6]</sup>。20 世纪 90 年代初,Sixbey 等<sup>[7]</sup>提出 EBV 可能通过与特异性 EBV-IgA 结合,进入黏膜上皮细胞,解释 EBV-IgA 抗体滴度升高与鼻咽癌发生的紧密关系。近年来研究<sup>[8]</sup>也证实,EBV 通过 IgA 抗体(分泌组分蛋白)介导的细胞内吞作用,感染鼻咽肿瘤细胞,对鼻咽癌的进展起着重要作用。EBV 的各抗原中以 VCA-IgA 的检测为最早的 EBV 血清学检测方法,迄今仍是鼻咽癌诊断的重要标准<sup>[9]</sup>。应用 ELISA 法检测该 VCA-IgA 抗体普查鼻咽癌较 EBV 其他抗原具有较高的敏感性<sup>[10]</sup>,可以检出鼻咽癌早期患者。有研究<sup>[11]</sup>通过对多例鼻咽癌患者发病前数年至放疗后 VCA-IgA 滴度的动态观察,发现 VCA-IgA 抗体先于鼻咽癌肿瘤出现,为鼻咽癌的早期诊断提供重要血清学依据;VCA-IgA 抗体可随病程和淋巴系统转移程度而增高,放疗后 VCA-IgA 抗体滴度总体呈下降趋势,与肿瘤控制有关;部分患者放疗后 VCA-IgA 抗体滴度出现小幅升高,考虑与肿瘤局部复发有关。这证明 VCA-IgA 抗体对鼻咽癌的早期诊断,疗效观察以及预后等有一定判断价值,尤其对单纯 VCA-IgA 抗体滴度增高者,结合临床症状及病理切片指标更具特殊意义<sup>[12]</sup>。

VCA 由病毒核衣壳和完整病毒颗粒包膜的多肽组成,其主要抗原多肽 gp125 由 EBV 基因组中 BALF4 基因编码<sup>[13]</sup>。本研究通过对 EBV 抗原进行

表位预测,同时考虑到与其他型疱疹病毒的同源性可能导致免疫检测中交叉反应出现<sup>[14]</sup>,选取 *BALF4* 基因中 aa 302 ~ 802(1 413 bp) 片段序列作为目的基因,设计含有 *EcoR I* 与 *Not I* 酶切位点上下游引物构建 *BALF4* 重组质粒。选择毕赤酵母作为表达系统,该系统相对大肠杆菌、昆虫细胞等表达系统有完善的蛋白修饰体系,且高效、稳定、易于操作,在大规模生物制品生产中具有非常重要的优势<sup>[15-16]</sup>。本实验成功构建了 pPICZ $\alpha$ A-*BALF4* 重组质粒,并在毕赤酵母系统中进行了高效蛋白表达,产物相对分子质量为 52 000。同时经 Western blotting 证实该重组 *BALF4* 蛋白有免疫原性。

目前 EBV 的血清学检测临床上常采用免疫荧光法、免疫酶法等<sup>[17]</sup>。免疫荧光法因操作繁琐、特异性差,已被逐渐淘汰;免疫酶法操作简便、成本低,但存在容易受主观因素影响等缺点,使得试剂的批间变异大,不同检验人员得出的结果也存在较大差异。因此人们试图以 ELISA 法取代免疫荧光法和免疫酶法用于大规模血清流行病学调查,现已获得一定进展<sup>[18]</sup>。

间接法 ELISA 是 ELISA 法中最常用的抗体检测法,其原理是通过酶标二抗的测定来检测与固相抗原结合的待测抗体。该法相对其他 ELISA 法的优点在于能检测待测抗体的具体亚型,可满足对 VCA-IgA 亚型进行检测的要求。本实验以重组 *BALF4* 蛋白作为包被抗原,用间接法 ELISA 分别对病理确诊鼻咽癌患者与健康人群血清中 VCA-IgA 抗体进行检测。检测敏感性和特异性分别为 81% 和 94%,较目前常用的鼻咽癌检测试剂盒敏感性和特异性有一定提高。同时因毕赤酵母表达系统具备高效、廉价的优势,故本实验中获得的工程菌株和重组 *BALF4* 蛋白可广泛应用于鼻咽癌患者的免疫学诊断试剂的制备,为鼻咽癌的早期大规模血清流行病学调查及追踪提供了有效的手段。

## [ 参 考 文 献 ]

[1] 张玉,张昌卿,宗永生,吴秋良,孙韵,郜红艺,等. 酶联免疫吸附检测血清 EBV VCA-IgA 和 EA-IgG 诊断鼻咽癌 [J]. 广东医学, 2003, 24(4): 371-373.

[2] 黄远见,罗志强. 鼻咽癌 EB 病毒相关生物学标志产物研究进展 [J]. 肿瘤医学, 2008, 10(14): 3075-3078.

[3] Shao JY, Li YH, Gao HY, Wu QL, Cui NJ, Zhang L, et al. Comparison of plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels and serum EBV immunoglobulin A/Virus capsid antigen antibody titers in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer*, 2004,

100(6): 1162-1170.

- [4] 周鹰,朱洪. 血清 EB 病毒抗体检测对鼻咽癌的临床诊断价值 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(12): 1102.
- [5] Nystad T, Myrnes H. Prevalence of primary versus reactivated Epstein-Barr virus infection in patients with VCA IgG-, VCA IgM- and EBNA-1-antibodies and suspected infectious mononucleosis [J]. *J Clin Virol*, 2007, 38(4): 292-297.
- [6] Gu AD, Lu LX, Xie YB, Chen LZ, Feng QS, Kang T, et al. Clinical values of multiple Epstein-Barr virus (EBV) serological biomarkers detected by xMAP technology [J]. *J Transl Med*, 2009, 23(7): 73.
- [7] Sixbey JW, Yao QY. Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism [J]. *Science*, 1992, 255(5051): 1578-1580.
- [8] 林钦塘. EB 病毒感染与鼻咽癌发病机制的关系 [J]. 癌症, 2009, 28(8): 791-804.
- [9] 凌伟,曹素梅,黄启洪,李艳华,邓清泉. 广东四会鼻咽癌患者治疗前 EB 病毒 VCA/IgA 抗体水平与生存的关系 [J]. 癌症, 2009, 28(1): 73-75.
- [10] 罗耀凌,欧国萍,池沛冬,梁永能,刘宇辉,黄马燕. 联合检测 EB 病毒相关抗体和抗原对诊断鼻咽癌的价值 [J]. 癌症, 2009, 28(1): 96-99.
- [11] Guo X, Johnson RC, Deng H, Liao J, Guan L, Nelson GW, et al. Evaluation of nonviral risk factors for nasopharyngeal carcinoma in a high-risk population of Southern China [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(12): 2942-2947.
- [12] 唐国全,周向阳,阳茂春. EB 病毒 IgA 滴度在鼻咽癌诊断的敏感性和特异性 [J]. 广西医学, 2008, 30(6): 831-832.
- [13] 骆建民,李恩民,李德锐. EB 病毒和鼻咽癌 [J]. 汕头大学医学院学报, 2000, 13(3): 67-70.
- [14] 张颖,肖锡宾,张昌卿,李经略,孙韵,叶永照,等. 鼻咽癌患者血清抗体相关优势抗原表位的筛选 [J]. 癌症, 2004, 23(9): 999-1004.
- [15] Whittaker MM, Whittaker JW. Construction and characterization of *Pichia pastoris* strains for labeling aromatic amino acids in recombinant proteins [J]. *Protein Exp Purif*, 2005, 41(2): 266-274.
- [16] Ramchuran SO, Mateus B, Holst O, Karlsson EN. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for the expression and production of thermostable xylanase from the bacterium *Rhodothermus marinus* [J]. *Yeast Res*, 2005, 5(9): 839-850.
- [17] Cheng WM, Chan KH, Chen HL, Luo RX, Ng SP, Luk W, et al. Assessing the risk of nasopharyngeal carcinoma on the basis of EBV antibody spectrum [J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(4): 489-492.
- [18] Karray H, Ayadi W, Fki L, Hammami A, Daoud J, Drira MM, et al. Comparison of three different serological techniques for primary diagnosis and monitoring of nasopharyngeal carcinoma in two age groups from Tunisia [J]. *J Med Virol*, 2005, 75(4): 593-602.

[ 收稿日期 ] 2010-08-22

[ 修回日期 ] 2010-10-07

[ 本文编辑 ] 王莹