

DOI:10.13350/j.cjpb.221104

• 论著 •

金纳米簇可视化免疫传感器检测弓形虫 GRA7 抗体的研究*

李茜雯¹, 李民¹, 刘苗², 贺靖¹, 刘培², 黄昊文³, 袁仕善^{1**}

(1. 湖南师范大学医学院, 湖南长沙 410013; 2. 湖南省人民医院检验科; 3. 湖南科技大学化学化工学院)

【摘要】 **目的** 建立基于重组弓形虫致密颗粒蛋白 7(GRA7)的金纳米簇可视化免疫传感器,用于检测弓形虫 GRA7 抗体,并评价其检测性能。 **方法** 利用重组表达质粒 pQE-60-gra7 的大肠埃希菌 M15 诱导表达并纯化 GRA7, Western blot 鉴定其反应原性。采用谷胱甘肽还原法制备金纳米簇,连接羊抗人 IgG;以 GRA7 作为捕获抗原,构建检测血清 GRA7 抗体的金纳米簇可视化免疫传感器,评价其敏感度、特异性、阴性预测值、阳性预测值和诊断效率。 **结果** 表达纯化获得具有良好反应原性的 GRA7,分子质量约为 30 ku;建立的金纳米簇可视化免疫传感器检测血清 GRA7 抗体的敏感度、特异性、阳性预测值、阴性预测值以及诊断效率分别为 76.1%、94.8%、94.4%、73.0%、78.2%。 **结论** 基于重组弓形虫 GRA7 建立的金纳米簇可视化免疫传感器检测弓形虫 GRA7 抗体敏感、特异,且诊断效率高,可用于弓形虫感染的抗体检测。

【关键词】 刚地弓形虫;致密颗粒蛋白 7;金纳米簇;免疫传感器

【中图分类号】 R382.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)11-1256-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Nov.;17(11):1256-1260.]

Detection of antibodies to GRA7 of *Toxoplasma gondii* using gold nanocluster visual immunosensor

LI Qian-wen¹, LI Min¹, LIU Miao², HE Jing¹, LIU Pei², HUANG Hao-wen³, YUAN Shi-shan¹ (1. College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410013, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Hunan Provincial People's Hospital 3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology)

【Abstract】 **Objective** To establish a gold nanocluster visual immunosensor based on recombinant dense granular protein 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of antibodies to GRA7 in human serums infected with *Toxoplasma gondii*, and evaluate its detection performance. **Methods** GRA7 was expressed and purified from the recombinant *E. coli* M15 containing the plasmid pQE-60-gra7. The reactivity of GRA7 was analyzed with Western blot. Gold nanoclusters were prepared by glutathione reduction method and linked to sheep anti-human IgG. GRA7 was used as the captured antigen to construct the visual immunosensor of gold nanocluster for the detection of antibodies to GRA7 in human serums. The sensitivity, specificity, negative predictive value, positive predictive value and diagnostic efficiency of the visual immunosensor were evaluated. **Results** GRA7 with good reactivity was obtained by expression and purification, and the molecular weight is about 30 ku. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and diagnostic efficiency of the established gold nanocluster visual immunosensor for detection of antibodies to GRA7 in human serums were 76.1%, 94.8%, 94.4%, 73.0% and 78.2%, respectively. **Conclusion** The gold nanoclusters visual immunosensor based on recombinant GRA7 of *Toxoplasma gondii* is sensitive, specific and has high diagnostic efficiency. It can be used to detect antibodies against *Toxoplasma gondii* infection.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; dense granular protein 7; gold nanoclusters; immunosensor

*** 刚地弓形虫是一种专性细胞内寄生的机会致病性原虫,可寄生于人和多种动物的有核细胞^[1]。致密颗粒蛋白 7(GRA7)是寄生虫入侵宿主细胞后分泌的代谢分泌抗原,存在于弓形虫感染的各个时期,可导致明显的体液和细胞免疫应答,是诊断弓形虫病的理想候选抗原^[2]。金纳米簇(Gold Nanoclusters, AuNCs)是粒径大小<2 nm 的新型纳米材料,由几个到几百个不等的金原子组成,近年研究发现它具有类过氧化物

酶活性^[3]。本研究基于金纳米簇的类过氧化物酶活性构建金纳米簇可视化免疫传感器检测 GRA7 抗体(图

* **【基金项目】** 湖南省发育生物学与生物育种重点项目(No. 2022XKQ0205)

** **【通讯作者】** 袁仕善, E-mail: yuanshishan@aliyun.com

【作者简介】 李茜雯(1998-),女,湖南长沙人,在读硕士。研究方向:病原生物学。E-mail:1272094643@qq.com

1),用于弓形虫感染的实验室诊断。

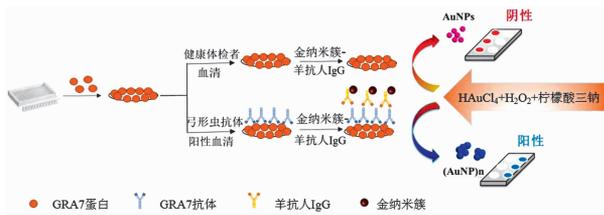


图1 金纳米簇可视化免疫传感器原理图

Fig.1 Schematic diagram of gold nanocluster visual immunosensor

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株与质粒 重组表达质粒 pQE-60-gra7 由本室构建^[4];大肠埃希菌 M15 菌株购自武汉普锐泰生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器 Ni²⁺-NTA His·Bind Resin 购自美国 Novogen 公司;1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐(EDC),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),羊抗人 IgG 抗体,柠檬酸三钠和 2-(N-吗啡利诺)乙醇磺酸(MES)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;氯金酸(HAuCl₄)购自上海泰坦科技股份有限公司;过氧化氢(H₂O₂)购自广州西陇科技有限公司;酶标板购自美国康宁科技有限公司。ELx800 全自动酶标仪购于美国 Bio-Tek 公司。

1.3 血清 58 份体检健康者血清和 88 份弓形虫抗体阳性血清由湖南省人民医院检验科提供。

2 方 法

2.1 GRA7 的诱导表达与纯化 将含 pQE-60-gra7 重组质粒的大肠埃希菌 M15 接种于 10 mL 含 50 mg/L 卡那霉素和羧苄青霉素的 LB 中,37 °C 培养过夜,转入 1 L 含 50 mg/L 卡那霉素和羧苄青霉素的 LB 中,培养至 A₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时,加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 1.0 mmol/L,诱导表达 3 h;4 °C、4 000 g 离心 5 min,收集菌体,裂解缓冲液重悬,冰浴超声裂解菌体,超声功率 200 W,超声时间 3 s,间隔时间 3 s,工作次数 70 次;4 °C、12 000 g 离心 20 min,收集上清,His-Tag 亲和层析纯化,SDS-PAGE 分析纯化蛋白。纯化蛋白用磷酸盐缓冲液(PBS)透析去除咪唑,聚乙二醇 6000 浓缩,BCA 法测定蛋白浓度,Western blot 分析其反应原性。

2.2 谷胱甘肽还原法制备金纳米簇 取 43.5 mL 超纯水和 5 mL 0.02 mol/L HAuCl₄ 加入圆底烧瓶,搅拌 5 min 后溶液变为黄色,缓慢滴加 0.1 mol/L 谷胱甘肽溶液,待颜色从黄色变为无色后停止添加,于 85 °C 油浴锅加热搅拌,溶液由白色混浊变为无色澄清,最后呈现清澈的金黄色,金纳米簇溶液即制备成功。取

金纳米簇与等体积的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine,TMB)和 H₂O₂ 混合均匀,另设一管超纯水、TMB 和 H₂O₂ 的对照组,观察两管溶液颜色,评价其类过氧化物酶活性。

2.3 金纳米颗粒显色条件的优化 取 1 mol/L H₂O₂ 用 1 mmol/L MES 溶液逐级稀释成 480、440、400、360、320、280、240、200、160、120、80、40 μmol/L,然后分别加入等体积 1 mmol/L HAuCl₄ 和 4 mmol/L 柠檬酸三钠,充分混匀,37 °C 反应 1 h,观察不同浓度 H₂O₂ 时溶液颜色变化,酶标仪测量各浓度组在 400~700 nm 处的可见光谱,记录 AuNPs 的 A₅₅₀ 值,确定 H₂O₂ 的适宜浓度。

2.4 金纳米簇可视化免疫传感器检测血清弓形虫 GRA7 抗体 GRA7 用 0.1 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为 5 μg/mL,微孔板每孔加入 100 μL,4 °C 过夜包被;弃抗原,用 5% 脱脂奶粉于 37 °C 封闭 1 h。于金纳米簇中加入 EDC 和 NHS 至终浓度分别为 80 mmol/L 和 20 mmol/L,37 °C 活化 30 min。按羊抗人 IgG:金纳米簇为 1:1000 的比例加入羊抗人 IgG,室温反应 4 h,得到连接羊抗人 IgG 的金纳米簇。弃封闭液,PBS 洗板;分别加入 PBS 稀释的健康体检者血清、弓形虫抗体阳性血清和弓形虫抗体阳性混合血清 100 μL,37 °C 孵育 2 h,PBS 洗板;加入 200 μL 金纳米簇-羊抗人 IgG,37 °C 作用 2.5 h,PBS 洗板;加入优化浓度的 H₂O₂、1 mmol/L HAuCl₄ 和 4 mmol/L 柠檬酸三钠各 100 μL,37 °C 反应 1 h,观察孔内颜色变化,用酶标仪测定阴性、阳性血清孔的 A₅₅₀。根据受试者工作特征(Receiver Operating Characteristic,ROC)曲线确定最佳诊断阈值,得出敏感度、特异度、预测值和诊断效率。

结 果

1 重组 GRA7 的表达与纯化

纯化 GRA7 的 SDS-PAGE 结果见图 2A。目的蛋白相对分子质量为 30×10³,与预期相符。Western blot 分析显示,重组 GRA7 能被弓形虫抗体阳性血清识别,即具有反应原性,正常血清对照为阴性(图 2B)。

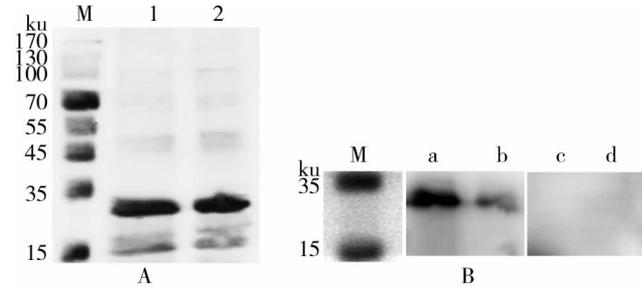
2 金纳米簇的过氧化物酶活性

用 TMB 和 H₂O₂ 测试合成的金纳米簇的类过氧化物酶活性,结果见图 3。第一组颜色很快变为蓝绿色;对照组中不存在金纳米簇,颜色未发生改变。表明制备的金纳米簇具有类过氧化物酶活性。

3 金纳米颗粒显色条件的优化

在 H₂O₂、柠檬酸三钠和氯金酸的显色体系中,各组溶液颜色变化及 400~700 nm 处的可见光谱见图 4。从 e 管到 g 管由蓝色变为红色,之后颜色逐渐稳

定,此时 H₂O₂ 浓度为 280 μmol/L。每组均在 550 nm 处达到最大吸光度, A₅₅₀ 值的变化见图 5。H₂O₂ 浓度从 240 μmol/L 到 280 μmol/L 时吸光度值有较大改变,之后基本趋于平稳。故选取 280 μmol/L 的 H₂O₂ 作为最佳显色浓度,通过检测 A₅₅₀ 进行分析。

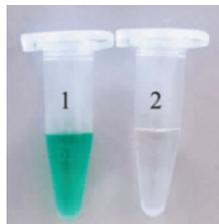


M 蛋白分子质量标准 1,2 纯化的 GRA7 a, b GRA7 与弓形虫抗体阳性血清反应条带 c, d 体检健康者血清对照

图 2 纯化 GRA7 蛋白的 SDS-PAGE(A)和 Western blot (B)分析

M Standard molecular weight protein 1,2 Purified protein of GRA7 a, b Reaction with antibody positive serum of *Toxoplasma gondii* c, d Serum reaction with healthy people

Fig. 2 Electrophoretic pattern and Western blot map of purified protein of GRA7



1 金纳米簇+TMB+H₂O₂ 2 水+TMB+H₂O₂

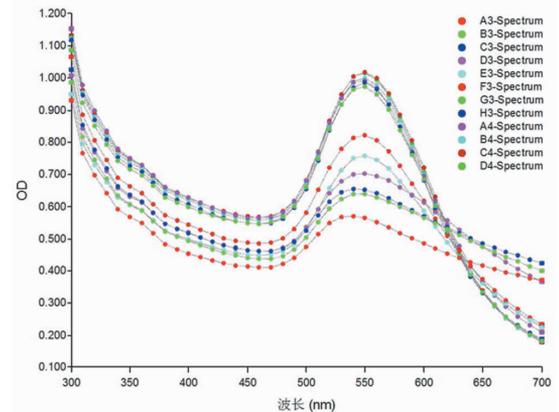
图 3 金纳米簇的类过氧化物酶活性

1 Gold nanoclusters + TMB + H₂O₂ 2 Water + TMB + H₂O₂

Fig. 3 Peroxide-like activity of gold nanoclusters

4 金纳米簇可视化免疫传感器检测 GRA7 抗体

金纳米簇可视化免疫传感器检测不同血清的溶液颜色变化及 88 例弓形虫抗体阳性血清和 58 例健康体检者血清 A₅₅₀ 分布如图 6。健康体检者血清呈现红色,弓形虫阳性抗体血清和混血呈现蓝色,肉眼可判别,体检健康者的 A₅₅₀ 大多高于弓形虫抗体阳性患者的 A₅₅₀。对各组样品的 A₅₅₀ 进行 ROC 曲线分析,得到的曲线下面积为 0.882,标准误 0.029, P < 0.01。ROC 曲线及部分诊断界值和相应的敏感度、特异性见图 7。当诊断界值为 0.7193 时尤登指数(敏感度+特异性-1)最大,因此将 0.7193 定为判别值,高于此值判为阴性,低于此值判断为阳性。用该法检测 58 例健康体检者血清,阴性 54 份,阳性 4 份;88 例弓形虫抗体阳性血清中阳性 68 份,阴性 20 份。该传感器的敏感度、特异性、阳性预测值、阴性预测值及诊断效率分别为 76.1%、94.8%、94.4%、73.0%和 78.2%。



a-l H₂O₂ 浓度依次为 40、80、120、160、200、240、280、320、360、400、440、480 μmol/L

图 4 不同浓度的 H₂O₂ 制备的金纳米颗粒的颜色变化及紫外吸收光谱
a-l The concentration of H₂O₂ were 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, 400, 440, 480 μmol/L, respectively

Fig. 4 Color changes and UV absorption spectra of gold nanoparticles prepared with different concentrations of H₂O₂

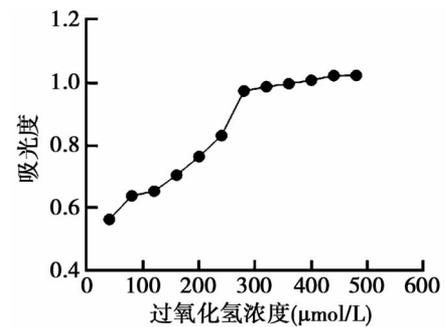
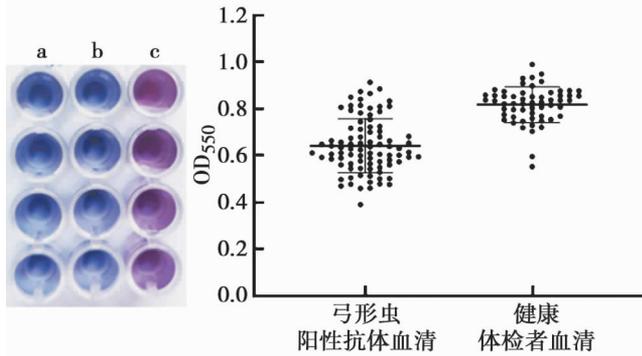


图 5 不同浓度 H₂O₂ 制备的金纳米颗粒 A₅₅₀ 值变化
Fig. 5 Gold nanoparticles prepared with different concentrations of H₂O₂ change in A₅₅₀ value

讨论

刚地弓形虫是在人类和动物中分布最广的机会致病病原虫之一,呈世界性分布,是许多国家在卫生经济学上面临的一个主要问题^[5]。弓形虫病的临床表现多样^[6],但不具特异性,单靠临床症状和体征不足以明确诊断,需要借助早期、准确的弓形虫感染实验室诊断方法。弓形虫病实验室诊断主要是通过寄生虫分离和对宿主抗体的检测,常用实验室诊断方法有酶联免疫吸附试验、血清 IgG 亲和力试验和聚合酶链式反应等^[7]。这些诊断方法各有优劣,仍需开发更经济、简

便、高效的弓形虫感染诊断方法。



a 弓形虫抗体阳性混合血清 b 弓形虫抗体阳性血清 c 健康体检者血清对照

图6 金纳米簇可视化免疫传感器检测不同血清颜色变化及 A_{550} 值
a Mixed serum with positive toxoplasma antibody b *Toxoplasma* antibody positive serum c Serum of healthy persons

Fig.6 Gold nanocluster visual immunosensor for detection of different serum color changes and A_{550} value

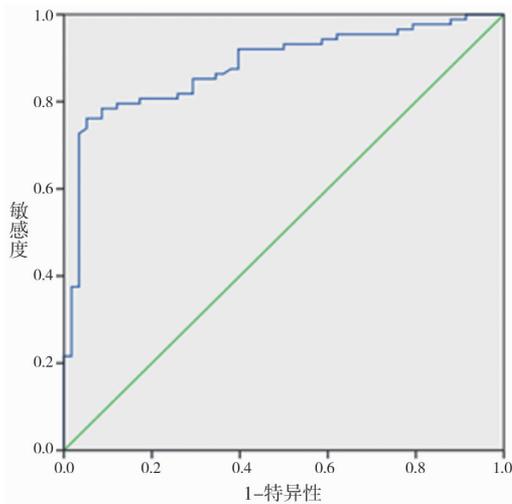


图7 GRA7 金纳米簇可视化免疫传感器诊断界值的 ROC 曲线与部分诊断界值、敏感度和特异性

Fig.7 ROC curve, partial diagnostic threshold, sensitivity and specificity of GRA7 Gold nanocluster visual immunosensor

纳米技术利用纳米材料的独特性质,改变了诊断、治疗、监测疾病的方式^[8]。纳米酶是拥有酶催化能力的纳米材料,与天然酶相比具有经济、易于大批量制备、稳定性高、催化活性可调等优势^[9]。金纳米簇以其

与电子的费米波长相近的超小尺寸($<2\text{ nm}$)、良好的稳定性和多种酶活性而成为一种有前途的纳米酶^[10]。目前已有诸多利用金纳米簇的类过氧化物酶活性达到对目标分析物的可视化检测的报道^[11-13],该特性可应用在比色检测。GRA7 是刚地弓形虫感染宿主细胞后的分泌蛋白,可作为弓形虫病的潜在血清诊断标志物^[14],且 GAR7 与其 IgM、IgG 均有良好的反应性^[15],构建金纳米簇可视化免疫传感器可检测弓形虫感染血清的 GRA7 抗体。

本研究采用谷胱甘肽作为还原剂和稳定剂合成金纳米簇,谷胱甘肽中半胱氨酸的巯基与金属之间可形成强相互作用的 Au-S 键,使金纳米簇在溶液中高度稳定^[16]。金纳米簇经 EDC 和 NHS 活化而暴露巯基,与羊抗人 IgG 连接,成为金纳米簇标记的羊抗人 IgG。包被在微孔板内的 GRA7 与阳性血清中的 GRA7 抗体结合,再结合金纳米簇标记的羊抗人 IgG,而体检健康者血清因无 GRA7 抗体而无法结合金纳米簇标记的羊抗人 IgG。加过氧化氢、 HAuCl_4 和柠檬酸三钠显色后,肉眼可见阳性血清孔呈蓝色,阴性血清孔呈红色,实现了可视化检测。检测二者的 A_{550} 值并进行 ROC 曲线分析,选择尤登指数最高处值 0.7193 作为判断阴性阳性的诊断分界线,得到传感器的检测敏感度、特异性、阳性预测值、阴性预测值以及诊断效率分别为 76.1%、94.8%、94.4%、73.0% 和 78.2%,表明 GRA7 金纳米簇可视化免疫传感器具有辅助诊断弓形虫感染的潜力,为免疫传感器用于弓形虫病诊断研究提供了实验依据。

【参考文献】

[1] Zhao XY, Ewald SE. The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection[J]. J Clin Invest, 2020, 130(7):3370-3380.
[2] Mavi SA, Modarressi MH, Mohebbi M, et al. Assessment of the immunogenicity and protective efficiency of a novel dual-promoter DNA vaccine, harboring SAG1 and GRA7 genes, from RH strain of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12:2519-2530.
[3] Jiang XD, Xu WC, Chen X, et al. Colorimetric assay of Hg^{2+} based on the inhibition of peroxidase mimetic activity of gold nanoclusters induced by Hg^{2+} [J]. Anal Methods, 2019, 11(16): 2179-2182.
[4] 李民, 刘苗, 贺靖, 等. 重组弓形虫 GRA7 的纳米金免疫传感器检测弓形虫 GRA7 抗体[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2022, 19(1): 71-75.
[5] Pleyer U, Gross U, Schluter D, et al. Toxoplasmosis in Germany [J]. Dtsch Arztebl Int, 2019, 116(25): 435-444.
[6] Smith NC, Goulart C, Hayward JA, et al. Control of human toxoplasmosis[J]. Int J Parasitol, 2021, 51(2-3): 95-121.
[7] Rostami A, Karanis P, Fallahi S. Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii*

- infection[J]. Infection, 2018, 46(3):303-315.
- [8] Contera S, Bernardino de la Serna J, Tetley TD. Biotechnology, nanotechnology and medicine[J]. Emerg Top Life Sci, 2020, 4(6):551-554.
- [9] Wu J, Wang X, Wang Q, et al. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II)[J]. Chem Soc Rev, 2019, 48(4):1004-1076.
- [10] Sun FY, Liang YY, Jin LH, et al. Weak interaction-tailored catalytic interface of ultrasmall gold nanoclusters as enzyme mimics for enhanced colorimetric biosensing[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(48):58209-58219.
- [11] Long YJ, Li YF, Liu Y, et al. Visual observation of the mercury-stimulated peroxidase mimetic activity of gold nanoparticles[J]. Chem Commun (Camb), 2011, 47(43):11939-11941.
- [12] Ni P, Chen C, Jiang Y, et al. Gold nanoclusters-based dual-channel assay for colorimetric and turn-on fluorescent sensing of alkaline phosphatase [J]. Sensor Actuat B-Chem, 2019, 301:127080.
- [13] Hu DH, Sheng ZH, Fang ST, et al. Folate Receptor-targeting gold nanoclusters as fluorescence enzyme mimetic nanoprobe for tumor molecular colocalization diagnosis[J]. Theranostics, 2014, 4(2):142-153.
- [14] Weeratunga P, Herath TUB, Kim TH, et al. Dense granule protein-7 (GRA-7) of *Toxoplasma gondii* inhibits viral replication *in vitro* and *in vivo*[J]. J Microbiol, 2017, 55(11):909-917.
- [15] Jacobs D, Vercammen M, Saman E. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1999, 6(1):24-29.
- [16] Rhee SG. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling[J]. Science, 2006, 312(5782):1882-1883.
- 【收稿日期】 2022-06-18 【修回日期】 2022-09-10

(上接 1255 页)

- [2] 王璞, 蔡玉荣, 张刚, 等. 结核分枝杆菌 PE/PPE 蛋白家族生物学研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(10):937-944.
- [3] Delogu G, Brennan MJ, Manganelli R. PE and PPE Genes: A Tale of Conservation and Diversity [J]. Adv Exp Med Biol, 2017(1019):191-207.
- [4] Brennan MJ. The enigmatic PE/PPE multigene family of mycobacteria and tuberculosis vaccination[J]. Infect Immun, 2017, 85(6):e00969-16.
- [5] Srivastava S, Battu MB, Khan MZ, et al. *Mycobacterium tuberculosis* PPE2 protein interacts with p67^{bhox} and inhibits reactive oxygen species production[J]. J Immunol, 2019, 203(5):1218-1229.
- [6] Oliver GR, Hart SN, Klee EW. Bioinformatics for clinical next generation sequencing[J]. Clin Chem, 2015, 61(1):124-135.
- [7] Young DB, Comas I, de Carvalho LP. Phylogenetic analysis of vitamin B12-related metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Front Mol Biosci, 2015(2):6.
- [8] Srivastava S, Mukhopadhyay S. *Mycobacterium tuberculosis* protein PPE2 binds to DNA region containing promoter activity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021(567):166-170.
- [9] Wang Q, Boshoff HIM, Harrison JR, et al. PE/PPE proteins mediate nutrient transport across the outer membrane of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Science, 2020, 367(6482):1147-1151.
- [10] 张西燕, 付玉荣, 伊正君. 结核分枝杆菌 *eis* 基因及其编码蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(2):140-145, 151.
- [11] Mukhopadhyay S, Balaji KN. The PE and PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Tuberculosis, 2011, 91(5):441-447.
- [12] Pal R, Mukhopadhyay S. PPE2 protein of *Mycobacterium tuberculosis* affects myeloid hematopoiesis in mice [J]. Immunobiology, 2021, 226(1):152051.
- [13] Bhat KH, Srivastava S, Kotturu SK, et al. The PPE2 protein of *Mycobacterium tuberculosis* translocates to host nucleus and inhibits nitric oxide production[J]. Sci Rep, 2017(7):39706.
- [14] Delogu G, Provvedi R, Sali M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* virulence: insights and impact on vaccine development[J]. Future Microbiol, 2015, 10(7):1177-1194.
- [15] Cornaby C, Gibbons L, Mayhew V, et al. B cell epitope spreading: mechanisms and contribution to autoimmune diseases [J]. Immunol Lett, 2015, 163(1):56-68.
- [16] Coscolla M, Copin R, Sutherland J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* T cell epitope analysis reveals paucity of antigenic variation and identifies rare variable TB antigens[J]. Cell Host Microbe, 2015, 18(5):538-548.
- [17] Penn-Nicholson A, Tameris M, Smit E, et al. Safety and immunogenicity of the novel tuberculosis vaccine ID93+GLA-SE in BCG-vaccinated healthy adults in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 trial[J]. Lancet Respir Med, 2018, 6(4):287-298.
- 【收稿日期】 2022-05-25 【修回日期】 2022-08-16