

A 群脑膜炎奈瑟球菌多糖单克隆抗体的制备及其应用

舒曼¹, 鲁卫东^{1*}, 钱雯^{2*}, 马波², 叶红艳¹, 黄微², 兰萍¹

(¹昆明医科大学暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500; ²沃森生物技术股份有限公司, 云南 昆明 650106)

[摘要] 目的: 筛选能分泌 A 群脑膜炎奈瑟球菌多糖抗体的杂交瘤细胞株, 制备单克隆抗体, 运用该单抗建立检测 ACYW135 群脑膜炎奈瑟球菌多糖疫苗中 A 群多糖的竞争 ELISA 方法。方法: 运用经典的杂交瘤技术筛选杂交瘤细胞株, 采用小鼠腹腔注射收获腹水型单克隆抗体, 优化条件建立间接竞争 ELISA, 分别测定 5 支同一批和 3 个不同批次的 ACYW135 群脑膜炎奈瑟球菌多糖疫苗成品中的 A 群多糖含量, 检测结果应用 SPSS 软件做单样本 *t* 检验分析。结果: 标准曲线经 Log-logit 处理, 得到回归方程: $y = -1.6648 - 2.2542x$, $R^2 = 0.9895$, 线性范围 0.0228~1.2007 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} 为 0.1658 $\mu\text{g/mL}$, 最低检测限为 0.0228 $\mu\text{g/mL}$, 检测疫苗中 A 群多糖含量, 检测值与疫苗标示量无统计学差异 ($P > 0.05$)。结论: 成功筛选杂交瘤细胞株, 制备 A 群多糖特异性单克隆抗体, 建立的间接竞争 ELISA 方法, 灵敏度高、稳定性好、可重复性强, 可用于脑膜炎奈瑟球菌多糖疫苗研发过程中的定量检测, 能克服磷含量法和火箭免疫电泳法检测 A 群多糖含量的缺点。

[关键词] 杂交瘤细胞株; 单克隆抗体; 流脑疫苗

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)11-1339-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20161111

Preparation of group A *Neisseria meningitidis* polysaccharide and its applications

Shu Man¹, Lu Weidong^{1*}, Qian Wen^{2*}, Ma Bo², Ye Hongyan¹, Huang Wei², Lan Ping¹

(¹Key Laboratory of Natural Medicine Pharmacology, Kunming Medical University, Kunming 650500; ²Yunnan Wosen Biotechnology Co. Ltd, Kunming 650106, China)

[Abstract] **Objective:** To screen and obtain hybridoma cells secreting antibody of group A *Neisseria meningitidis* polysaccharide, produce monoclonal antibody, and establish an indirect compete ELISA based on McAb to detect A polysaccharide content in group ACYW135 meningococcal polysaccharide vaccine. **Methods:** Hybridoma cells were screened by hybridoma technology, McAb was produced by injecting cells into mice abdominal cavity, the indirect compete ELISA was developed through optimizing the test conditions, A polysaccharide content was detected in 5 groups of ACYW135 meningococcal polysaccharide vaccines from the same batch and 3 from different patches separately. Data were analyzed through one-samples T test in SPSS. **Results:** The equation of linear regression after Log-logit processing: $y = -1.6648 - 2.2542x$, $R^2 = 0.9895$, the linear detection range was 0.0228~1.2007 $\mu\text{g/mL}$, $\text{IC}_{50} = 0.1658 \mu\text{g/mL}$, and the lowest detection limit of this method was 0.0228 $\mu\text{g/mL}$. A polysaccharide content was detected in the vaccines. There were no significant differences between detected value and original value ($P > 0.05$). **Conclusion:** We successfully screened the hybridoma cell and produced the McAb, provided indirect compete ELISA with good sensitivity, stability and repeatability, which detects A polysaccharide content in the process of meningococcal vaccine. It can overcome the difficulties that phosphorus content method and rocket electroimmunoassay have.

[Key words] hybridoma cell; McAb; meningococcal vaccine

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(11): 1339-1343]

流脑, 是流行性脑脊髓膜炎的简称, 是由脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*, Nm)引起的呼吸道

[基金项目] 云南省高新技术产业发展项目([2014]1264)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: 13064244163@163.com; yfzxqw@walvax.com

传染性疾病, 发病急、传播快、病死率高。其中 2 岁以下的儿童发病率最高^[1], 接种流脑疫苗是预防脑膜炎球菌病发生和流行的最有效手段, Nm 多糖疫苗中各群多糖的含量是保证该疫苗质量的基本条件之一。本研究旨在运用杂交瘤技术和免疫学原理, 制备单克

隆抗体,并且运用该单抗建立一种快速可靠、特异性高、敏感性强的方法——间接竞争 ELISA,来检测 ACYW135 群 *Nm* 多糖疫苗成品中的多糖含量,为 *Nm* 多糖定量检测试剂盒的研制奠定基础,同时探讨运用单克隆抗体建立的间接竞争 ELISA 法在流脑疫苗质量控制、流脑病原菌分型检测以及临床应用方面的前景及优势。

1 材料和方法

1.1 材料

A 群 *Nm* CRM197 多糖结合物原液(批号:A201301001,玉溪沃森生物技术有限公司)。

A 群、C 群、Y 群、W135 群 *Nm* 多糖标准品由玉溪沃森生物技术有限公司提供,由于 A 群 *Nm* 多糖定量标准品目前中国食品药品检定研究院以及国际上尚无,将玉溪沃森生物技术股份有限公司技术中心化学偶联研究室制备的各项指标符合《中华人民共和国药典》三部(2010 版)要求的 A 群 *Nm* 多糖(批号:MenA200906005)作为内部定量标准品;ACYW135 群 *Nm* 多糖疫苗(批号:FPPV14112203,批号:201305012,批号:201305013,批号:201305014)由玉溪沃森生物技术有限公司提供。

BALB/c 鼠,雌性,6~8 周龄,SPF 级,15~20 g [广东省医学实验动物中心(许可证号 SCXK(粤)20130002)]。骨髓瘤细胞[SP2/0,中国科学院典型培养物保藏中心昆明细胞库(KCB92021YJ)]。聚乙二醇 4000(PEG4000)、HAT、HT、吐温-20、HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗(Sigma 公司,美国);RPMI-1640 改良型培养基(赛默飞公司,美国),胎牛血清、新生牛血清(Hyclone 公司,美国),Protein A-Sepharose CL-4B 亲和层析柱(GE 公司,美国);IX73 倒置显微镜(OLYMPUS 公司,日本),酶联检测仪(Thermo 公司,美国);6 孔及 96 孔细胞培养板、96 孔酶标板(Costar 公司,美国);亚类检测试剂盒(塞尔维公司,美国);其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 杂交瘤细胞株的建立

选取 3 只 6~8 周龄雌性 BALB/c 鼠(SPF 级),将 A 群 *Nm* CRM197 多糖结合物原液 150 μ L(抗原量 6×10^9 CFU)与等量弗氏完全佐剂充分混合,100 μ g/只腹腔注射免疫小鼠。将分离的脾细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP2/0 用常规的聚乙二醇法融合,筛选出阳性细胞孔,用有限稀释法进行克隆,最后筛选出 1 株效价高的分泌 A 群 *Nm* 多糖抗体的杂

交瘤细胞 WV-A-01(保藏编号:CCTCCC2015229),用单克隆抗体 IgG 亚类检测试剂盒对其上清进行检测,并且检测该杂交瘤细胞在体外传代培养过程中分泌抗体的稳定性。

1.2.2 单克隆抗体的制备

参照文献方法^[2],收集腹水,用 Protein A-Sepharose CL-4B 亲和层析法纯化单克隆抗体,A KAT explorer100 进行监测,获得纯化的单克隆抗体,纯度检测参照参考文献^[3],用 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳法,对该单抗的纯度进行检测。待检样品稀释后与上样缓冲液等体积混合,在 90~120 V 电压下进行电泳,电泳结束后,用银染法^[4]染色。

1.2.3 间接竞争 ELISA 条件优化及方法建立

抗原包被浓度和单抗工作浓度的初步确定:根据棋盘格滴定法^[5],按间接 ELISA 步骤,将 A 群多糖(1 mg/mL)稀释为 50.0、25.0、12.5、6.3、3.2、1.6、0.8、0.4 μ g/mL,100 μ L/孔包被酶标板,单克隆抗体按 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600 倍比稀释,每孔加 100 μ L,同时设置阴性和空白对照,在 450 nm 处测定吸光度值。

抗原最佳包被浓度的确定:按常规竞争 ELISA 操作步骤,根据上述筛选的初步包被浓度等差设置 5 个包被浓度,单抗工作浓度为上述筛选的初步单抗工作浓度,竞争抗原标准品浓度按 25.00、5.00、1.00、0.20、0.04 μ g/mL 稀释。同时设置阴性和空白对照,在 450 nm 处测定吸光度值。

单抗最佳工作稀释倍数的确定:按常规竞争 ELISA 步骤,用上述确定的抗原最佳包被浓度包被抗原,单抗根据上述筛选的初步工作浓度等差设置 5 个工作浓度,其余同上。

最佳包被条件的选择:包被抗原温度分别设置 4 $^{\circ}$ C 过夜、37 $^{\circ}$ C 1 h、37 $^{\circ}$ C 2 h、37 $^{\circ}$ C 3 h,其他操作不变,选定最佳的包被时间和温度。

一抗最佳竞争反应时间的确定:竞争时间分别设置 30、60、90、120 min,其他条件不变,选定最佳竞争反应时间。

间接竞争 ELISA 方法的建立:每孔加入 100 μ L 最佳包被浓度的抗原稀释液,按最佳包被条件包被;洗板机洗板,拍干,加入 5%的脱脂奶粉,每孔 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;洗板同上,竞争过程用 PBS 将 A 群多糖标准品 2 倍稀释:1.250 0、0.625 0、0.312 5、0.156 3、0.078 1、0.039 1 μ g/mL,单抗稀释为上述确定的最佳工作浓度,50 μ L:50 μ L 的体积比加入到已封

闭好的板内,37℃,竞争时间由上述时间确定;洗板同上,显色,在 450 nm 处检测吸光度值,建立标准曲线。

1.2.4 应用

同一批 ACYW135 群 Nm 多糖疫苗中 A 群多糖含量测定:取 3 个批次的 A 群 Nm 多糖精糖,每孔 100 μL 包被酶标板,随机抽取 ACYW135 群 Nm 多糖疫苗 5 支(批号:FPPV14112203,A 群多糖含量:57.8 μg/支),每个样品做 3 个复孔,其余步骤同上述建立的竞争 ELISA,最后结果求取平均值。

不同批 ACYW135 群 Nm 多糖疫苗中 A 群多糖含量测定:取 3 个批次的 A 群 Nm 多糖精糖,每孔 100 μL 包被酶标板,抽取 3 批不同的 ACYW135 群 Nm 多糖疫苗(批号 201305012,A 群多糖含量 62.5 μg/支;批号 201305013,A 群多糖含量 54.3 μg/支;批号 201305014,A 群多糖含量 61.9 μg/支),每批 5 支,每个样品做 3 个复孔,其余步骤同上述建立的竞争 ELISA,最后结果求取平均值。

1.3 统计学方法

用 SPSS17.0 统计软件对数据进行分析,单样本 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞传代稳定性及单抗 IgG 亚类

将筛选出的 1 株杂交瘤细胞 WV-A-01 复苏,连续传代培养 20 代,分别在第 3、5、10、15、20 代吸取培养上清,检测该细胞分泌抗体的效价(表 1),此株杂交瘤细胞效价稳定在 1:5 120,说明杂交瘤细胞 WV-A-01 能稳定分泌抗体。

通过对细胞培养上清进行 IgG 亚类检测,确定该杂交瘤细胞产生的单抗属于 IgG1 类(表 2)。

2.2 单克隆抗体纯度检测

用 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白质纯度(图 1),单克隆抗体纯度很高,没有杂蛋白,

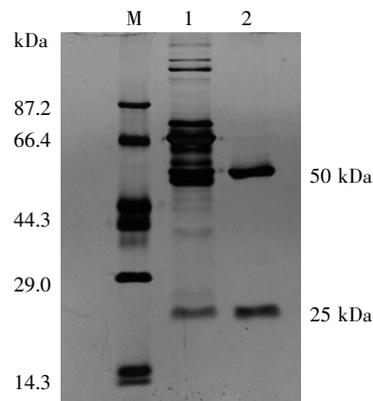
表 1 杂交瘤细胞传代培养上清 1:5 120 稀释后的吸光度值
Table 1 Absorbance value of hybridoma supernatant (1:5 120 diluted)

传代	D(450 nm)
复苏后	0.220 6
第 3 代	0.218 4
第 5 代	0.198 9
第 10 代	0.210 5
第 15 代	0.219 4
第 20 代	0.208 8
阴性	0.082 4

图中所示的 2 条条带分别为重链和轻链,分子量大小与 BALB/c 小鼠 IgG 的重链和轻链的理论值一致。

表 2 单抗 IgG 亚类检测 D(450 nm)值

组别	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
阴性对照	0.028	0.073	0.111	0.132	0.044	0.063
阳性对照	1.555	1.549	1.692	1.355	1.459	1.346
培养上清	1.731	0.237	0.294	0.298	0.080	0.216



M:Marker;1:未纯化的单抗;2:Protein A-Sepharose CL-4B 亲和层析法纯化的单抗。

图 1 单克隆抗体的 SDS-PAGE 电泳检测

Figure 1 Electrophoresis detection of monoclonal antibody by SDS-PAGE

2.3 抗原包被浓度和单抗工作浓度的初步确定

通过棋盘法来确定抗原的初步包被浓度和抗体初步工作浓度(表 3),选取 P/N 值 ≥ 2.1 且 $D(450 \text{ nm})$ 值在 0.8~1.2 之间的一组数值作为抗原抗体最佳搭配浓度^[6],同时按照节约抗原和单抗使用量的原则,确定抗原初步包被浓度为 1.6 μg/mL,抗体初步工作浓度为稀释 1:1 600 倍。

2.4 抗原最佳包被浓度和抗体最佳工作浓度的确定

通过棋盘法确定了抗原初步包被浓度和抗体初步工作浓度后,为了得到更为精确的抗原抗体配比,在此基础上进行了进一步试验,抗原包被浓度为 5、4、3、2、1 μg/mL;抗体工作浓度稀释比为 1:1 200、1:1 600、1:2 000、1:2 400、1:3 000。以标准品浓度的对数为横坐标,所对应的竞争抑制率为纵坐标绘制竞争抑制曲线图,根据曲线的线性和抑制率下降的趋势,确定抗原最佳包被浓度为 2 μg/mL,抗体最佳工作浓度稀释比为 1:1 600。

2.5 最佳包被条件

ELISA 试验中将适量抗原吸附到聚苯乙烯等固相载体上,是保证后续试验顺利进行的必要基础,

表 3 抗原初步包被浓度和抗体初步工作稀释倍数

Table 3 Preliminary concentration of coated antigen and preliminary diluted multiples of antibodies

抗原 ($\mu\text{g/mL}$)	抗体稀释										阴性	空白
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600		
50.0	2.671 2	2.672 0	2.600 9	2.310 1	2.042 1	1.712 4	1.065 8	0.647 2	0.317 0	0.262 2	0.115 7	0.040 9
25.0	2.575 8	2.642 3	2.647 9	2.216 0	1.891 0	1.274 5	0.812 6	0.577 7	0.347 6	0.164 1	0.101 3	0.074 5
12.5	2.573 0	2.523 4	2.416 8	2.206 2	1.623 0	1.249 6	0.958 2	0.647 6	0.321 5	0.194 9	0.128 5	0.054 6
6.3	2.264 4	2.338 1	2.193 0	1.964 3	1.563 1	1.329 7	0.954 1	0.619 0	0.332 4	0.186 7	0.105 8	0.060 5
3.2	2.157 6	2.068 5	1.960 1	1.743 9	1.453 8	1.164 6	0.902 4	0.597 6	0.341 2	0.200 9	0.106 2	0.049 7
1.6	1.896 4	1.755 8	1.719 2	1.645 8	1.166 0	1.041 9	0.805 3	0.562 8	0.318 6	0.148 6	0.046 2	0.066 8
0.8	1.522 9	1.403 8	1.427 0	1.400 7	1.079 9	0.789 3	0.653 6	0.426 2	0.209 5	0.157 7	0.044 5	0.045 5
0.4	1.230 1	1.165 9	1.163 4	1.169 5	0.962 3	0.794 0	0.622 6	0.415 6	0.240 7	0.122 8	0.046 5	0.068 6

包被温度和时间是影响包被效果的主要因素之一,结果显示 4℃ 过夜和 37℃ 1 h 时,包被效果无显著差异,竞争抑制曲线线性较好,IC₅₀ 值较小,考虑到较低温度更有利于蛋白质活性的保护,本研究选取 4℃ 过夜为最佳包被条件。

2.6 一抗最佳竞争反应时间

必须在一定条件下反应一定时间,才能使液相中的抗原/抗体反应体系与固相上的特异抗原竞争反应完全^[7]。本研究通过控制反应时间,确定了竞争反应的最佳时间。结合竞争抑制曲线线性情况和 IC₅₀ 值,确定最佳竞争反应时间为 60 min。

2.7 间接竞争 ELISA 方法的建立和标准曲线

根据前面试验优化的条件,按照竞争 ELISA 步骤操作,以 A 群 Nm 多糖标准品浓度的对数为横坐标,抑制率为纵坐标,进行 Log-Logit 回归分析,绘制标准曲线。得到线性回归方程: $y = -1.664 8 - 2.254 2x$, $R^2 = 0.989 5$,该间接竞争 ELISA 的线性范围 0.022 8~1.200 7 $\mu\text{g/mL}$,IC₅₀ 为 0.165 8 $\mu\text{g/mL}$,抑制率为 90% 时作为最低检出限,检测限为 0.022 8 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.8 应用

同一批 ACYW135 群脑膜炎球菌多糖疫苗中 A 群多糖含量测定:运用建立的间接竞争 ELISA 对同一批 5 支 ACYW135 群 Nm 多糖疫苗成品中的 A 群多糖进行检测(表 4)。用 SPSS17.0 软件进行单样本 t 检验统计学分析,无统计学差异(双侧, $t = -0.448, P > 0.05$),检测值置信区间为 $(57.58 \pm 0.50) \mu\text{g/剂}$,与疫苗原标示量(57.8 $\mu\text{g/剂}$)无显著差异。变异系数分别为 4.15%、3.57%、2.96%,按上述条件建立的检测 ACYW135 群 Nm 多糖疫苗中 A 群多糖含量的间接竞争 ELISA 精确度、稳定性好,重复性佳。

不同批 ACYW135 群 Nm 多糖疫苗中 A 群多糖含量测定:运用建立的间接竞争 ELISA 对 3 批 ACYW135 群 Nm 多糖疫苗成品中的 A 群多糖进行

表 4 同一批 ACYW135 群脑膜炎球菌多糖疫苗中 A 群多糖含量

Table 4 A polysaccharide content in group ACYW135 meningococcal polysaccharide vaccine from the same batch ($\mu\text{g/剂}$)

检测次数	疫苗编号				
	1	2	3	4	5
第 1 次	60.83	57.68	56.85	58.30	54.22
第 2 次	56.60	61.09	57.61	55.71	57.18
第 3 次	58.79	59.74	56.60	56.93	55.55

$t = -0.448, P > 0.05$ 。

检测,用 SPSS17.0 软件进行单样本 t 检验统计学分析,双侧,分别求得 t 值、 P 值,置信区间见表 5,差异无统计学意义(P 均 > 0.05),表明检测值与疫苗原标示含量无显著差异,批间变异系数小,分别为 3.27%、5.56%、4.57%,且检测值均在置信区间范围。显示按上述条件建立的检测 ACYW135 群 Nm 多糖疫苗中 A 群多糖含量的间接竞争 ELISA 精确度、稳定性好,重复性佳。

3 讨论

《中华人民共和国药典》三部(2010 版)规定用磷含量法检测 A 群 Nm 多糖含量^[8],但该方法存在以下缺点:①检测过程繁琐,费时,需要高温和有机强酸试剂;②Nm 多糖疫苗成品中的赋形剂(蔗糖)、保护剂等辅料干扰磷含量法的测定。基于此类缺点,本实验室已经建立了火箭免疫电泳的方法来测定结合疫苗中多糖的含量^[9],该方法相对快速、敏感,但仪器设备昂贵,操作过程较复杂,设备依赖性强。本研究融合、筛选并保藏了 1 株能分泌 A 群 Nm 多糖特异性抗体的杂交瘤细胞株,经传代稳定性实验证明,能稳定、特异地分泌针对 A 群 Nm 多糖的抗体,通过接种小鼠腹腔,制备得到腹水型单抗,纯化后纯度高,且只与 A 群 Nm 多糖抗原反应,与 C、Y、

表 5 不同批 ACYW135 群脑膜炎球菌多糖疫苗中 A 群多糖含量

Table 5 A polysaccharide content in group ACYW135 meningococcal polysaccharide vaccine from the different batches (μg/剂)

疫苗编号	批号 201305012			批号 201305013			批号 201305014		
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 1 次	第 2 次	第 3 次
1	61.35	63.77	64.48	54.82	57.44	51.66	62.51	60.89	62.16
2	61.88	64.13	62.83	56.45	55.56	55.18	61.70	63.46	66.82
3	59.07	59.94	65.10	51.26	52.48	60.95	57.12	63.94	65.09
4	62.80	65.31	60.79	59.33	55.36	59.72	61.32	67.15	61.47
5	63.65	66.05	64.45	51.59	54.81	52.69	62.00	63.86	57.26
t 值	-0.975	1.103	1.318	0.257	1.039	0.938	-0.165	1.969	0.402
P 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
置信区间	61.75 ± 0.78	63.84 ± 1.21	63.53 ± 0.78	54.69 ± 1.52	55.13 ± 0.80	56.04 ± 1.85	60.93 ± 0.97	63.86 ± 1.20	62.56 ± 1.64

W135 群多糖抗原以及 TT、CRM197 载体不发生交叉反应,特异性强,符合后续实验要求。

运用该单克隆抗体建立的间接竞争 ELISA 方法,灵敏度高、稳定性好、可重复性强,本研究已证实可用于 Nm 多糖疫苗研发过程中 A 群多糖的定量检测,奠定了 A 群流脑多糖试剂盒研发的基础,可以对疫苗中 A 群多糖的含量进行质控把关。此外,此方法与传统的磷含量法和火箭免疫电泳法相比,更为方便、快速,在现场检测致病性 Nm 抗原方面有潜在应用价值,可以为 A 群 Nm 病原体进行特异性分型诊断,为快速掌握该地区的流行菌群趋势奠定基础,方便及时制定相应的防护治疗措施,预防疾病爆发,从而为流脑流行病学调查及防控奠定基础。进一步可研发 C、Y、W135 群特异性单克隆抗体,为流脑各群多糖的定量检测试剂盒研发提供可能,完善各群流脑疫苗的质量控制及流行病学分类调查。

[参考文献]

[1] Rouphael NG, Stephens DS. Neisseria meningitidis; biology, microbiology, and epidemiology[J]. Methods Mol Biol,

2012, 799(1):1-20

[2] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社,2001:953

[3] J·萨姆布鲁克,EF·弗里奇,T·曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1993:880-886

[4] Ookley BR, Kirsch DR, Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting protein in polyacrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1980, 105(2):361-363

[5] 谭伟明,何素平. 利用棋盘格实验直接筛选酶免疫测定的最佳包被抗原和抗体浓度[J]. 分析化学,2008,36(09):1191-1195

[6] 张明洲,方结红,陈宗伦,等. 苏丹红 I 直接竞争 ELISA 检测试剂盒的研制[J]. 核农学报,2010,24(2):341-348

[7] 李会英. 酶联免疫吸附试验影响因素的分析[J]. 检验医学与临床,2007,4(10):985-986

[8] 国家药典委员会. 中国药典(3 部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:38-43

[9] 樊会兰,吴凯,张胜祥. 冻干 ACYW135 群脑膜炎奈瑟球菌多糖结合疫苗中各群多糖含量检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志,2014,27(8):1092-1096

[收稿日期] 2016-03-07