

# 脊髓灰质炎病毒 I 型单克隆抗体的制备

王朝元<sup>1</sup> 唐永洪<sup>1</sup> 黄 圣<sup>1</sup> 尹玉莹<sup>1</sup> 杨继红<sup>2</sup>

(1 中南民族大学 生命科学学院, 武汉 430074; 2 华中师范大学 生命科学学院, 武汉 430079)

**摘 要** 目的: 为建立脊灰病毒 Sabin 株 I 型特异的单克隆抗体. 方法: 以 Vero 细胞增殖病毒并用蔗糖密度梯度离心法纯化后, 用病毒免疫 SPF 级 Balb/c 小鼠. 取小鼠免疫脾淋巴细胞与 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞进行细胞融合, 通过间接 ELISA 法筛选抗体阳性的杂交瘤细胞, 并用有限稀释法克隆化. 用细胞培养法制备脊灰病毒单抗, 并以中和试验测定单抗效价. 结果: 获得了 8 株分泌抗脊灰病毒 Sabin 株 I 型单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 其中 1 株 G8G7 能够稳定分泌抗体. 间接 ELISA 法测得单抗的效价为 1 : 8, 中和试验测得中和抗体的效价为 1 : 58. 结论: G8G7 分泌的抗体为抗脊灰病毒 Sabin 株 I 型特异的单克隆抗体.

**关键词** 单克隆抗体; 脊髓灰质炎病毒 I 型; Vero 细胞系

中图分类号 Q939.91 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2018)04-0035-05

## Preparation of Monoclonal Antibody for Type I Poliovirus

Wang Chaoyuan<sup>1</sup>, Tang Yonghong<sup>1</sup>, Huang Sheng<sup>1</sup>, Ying Yuying<sup>1</sup>, Yang Jihong<sup>2</sup>

(1 College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

2 College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China)

**Abstract** Objective: To establish a specific monoclonal antibody of poliovirus Sabin strain I. Methods: After Poliovirus Sabin strain type I was proliferated in Vero cells and purified by sucrose density gradient centrifugation, SPF Balb/c mice were immunized by poliovirus. Then the splenic lymphocytes from immunized mice were fused with SP2/0-Ag14 myeloma cells. The positive hybridoma cells were screened by indirect ELISA and cloned by limited dilution method. The monoclonal antibody of poliovirus type I was prepared by cell culture and its titer was determined by neutralization test. Results: Eight stable hybridoma cell lines secreting anti-poliovirus Sabin strain I monoclonal antibodies were obtained, one of which (G8G7) could secrete antibodies stably. The titer of monoclonal antibody measured by indirect ELISA was 1 : 8, and the titer of neutralized antibody measured by neutralization test was 1 : 58. Conclusion: It is concluded that the antibody secreted by G8G7 hybridoma cell lines is a type I-specific monoclonal antibody against poliovirus Sabin strain.

**Keywords** monoclonal antibody; type I poliovirus; Vero cell lines

脊髓灰质炎病毒 (poliovirus, PV), 简称脊灰病毒, 是引起脊髓灰质炎的病原, 其属于小 RNA 病毒科 (Picornavirales) 肠道病毒属 (Enterovirus)<sup>[1]</sup>. 脊灰病毒 RNA 基因组为单股正链 RNA, 其 RNA 分子量为  $2.41 \times 10^8$ . 1981 年 PV I 型的 Mahoney 疫苗株的 RNA 全序列首次被测定; 我国科研工作者分别在 2009 年和 2011 年对 PV I, III 型的基因组结构特征进行了分析<sup>[2]</sup>. PV 感染机体引起脊髓灰质炎, 主要是通过侵犯中枢神经系统, 造成弛缓性肌肉麻痹 (AFP), 可引起患者机体出现隐性感染或亚临床感染 (占 90%)、顿

挫型感染 (占 10%), 以及少数严重感染. 自 1988 年通过了由 WHO 提出“2000 年全球消灭脊髓灰质炎”的决议<sup>[3]</sup>以来, 全球脊髓灰质炎流行国家从 125 个减少至 2018 年的 2 个 (巴基斯坦和阿富汗), 脊灰病例由 35 万例减至 2018 年的 11 例, 减少了 99% 以上<sup>[4]</sup>.

为逐渐完成消灭脊髓灰质炎, 世界各国正积极采用口服脊髓灰质炎减毒活疫苗 (OPV) 和灭活疫苗 (IPV) 预防疾病. 世界卫生大会 2012 年制定了《消灭小儿麻痹症和最后阶段战略计划 (2013—2018)》<sup>[5]</sup>. 病毒的单克隆抗体在脊灰病毒流行病学监视、疫苗免

收稿日期 2018-05-16

作者简介 王朝元 (1964-) 男, 教授, 博士, 研究方向: 生物医学工程, E-mail: wangchaoyuan@mail.scuec.edu.cn

基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (37001/CZP17010); 中南民族大学横向科研资助项目 (HZY17059)

疫水平评估等临床医学以及病毒生物学研究等领域都具有十分重要的意义。

本文以纯化的脊灰病毒 Sabin 疫苗株 I 型免疫小鼠,取其脾细胞与 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞进行细胞融合,获得了一株稳定分泌抗体的杂交瘤细胞,为脊髓灰质炎病毒的体外检测和临床应用等提供了实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

DMEM 高糖培养基(Hyclone); 1×PBS、青霉素-链霉素溶液(Hyclone); 胎牛血清(GIBICO); PEG 6000(Biosharp); HEPES、100 mmol/L 丙酮酸钠、50×HAT&HT 培养基添加剂、50% PEG 溶液、P7181-5X5ML(Sigma-Aldrich); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0012,上海碧云天); QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒、PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2-Dye Plus 试剂盒(Ta-KaRa)。

细胞过滤器(70 μm, FALCON Corning, USA); 96孔酶标板(Costar); 超高速离心机(CP100MX, rotor: P40ST-1520, Hitachi); 酶标仪(BioTek Instruments, Inc); CO<sub>2</sub>培养箱(MCO-15AC, SANYO Electric Biology Co, Ltd); 生物安全柜(BHC-1300II B2, 苏州安泰空气技术); TC 型基因扩增仪[TC-96/G/H(b) C, 杭州博日科技]。

### 1.2 细胞、病毒和动物

非洲绿猴肾细胞 Vero 由华中师范大学杨继红教授惠赠, 10%胎牛血清 DMEM 培养; 小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0-Ag14) 购自武汉大学保藏中心, 20%胎牛血清 DMEM 培养<sup>[6]</sup>; 脊髓灰质炎病毒 Sabin 疫苗株(I, II, III 型) 由武汉生命科技股份有限公司提供; SPF 级 Balb/c 小鼠购自湖北省实验动物研究中心, 于中南民族大学实验动物中心饲养。

### 1.3 脊灰病毒增殖与效价测定

取脊灰 Sabin 株毒种液, 无血清 DMEM 稀释 10 倍, 取 1 mL 接种于 Vero 细胞培养瓶, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的培养箱中吸附 60 min, 弃上清, 加入 2%DMEM 维持液, 继续培养, 每日观察细胞病变(CPE)。待 CPE 达到 80%以上, 反复冻融 3 次(-20 °C 冷冻、室温或 37 °C 解冻) 使细胞裂解, 收获病毒原液 S<sub>0</sub>, -80 °C 保存备用。

取一块长满 Vero 细胞的 96 孔培养板, 吸弃培养液, 用 PBS 洗 3 次, 将上述-80 °C 病毒原液用无血清 DMEM 10 倍稀释 10<sup>-1</sup>~10<sup>-11</sup>, 每孔 100 μL, 每个稀释度设 8 个复孔, 最后一列设置为正常细胞对照组, 病

毒吸附 1 h 后, 每孔补加 100 μL 2%维持液, 继续培养, 每日观察 CPE, 按照 Reed-Muench<sup>[7]</sup> 公式计算 TCID<sub>50</sub>。

### 1.4 脊灰病毒分子鉴定

脊灰病毒 RNA 提取按照 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒操作说明进行。脊灰病毒的 RNA 逆转录扩增(RT-PCR) 参考安军静<sup>[2]</sup>的方法, 采用 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus) 试剂盒。扩增片段为脊灰病毒 RNA 的结构蛋白 VP1 编码区, 上游引物 UG1 (2402-2421): 5'-TTTGTGTCAGCGTGTAATGA-3'; 下游引物 UC11 (3885-3504): 5'-AAGAGGTCTCTATTCCACAT-3'。引物设计模板为 Human poliovirus 1 strain Sabin 1, complete genome (GenBank: AY184219.1)。逆转录扩增反应程序为: 50 °C 30 min, 94 °C 2 min; PCR 扩增 29 个循环(94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 80 s), 72 °C 退火 80 s, 4 °C 保温。用 1.7%琼脂糖凝胶电泳分析条带, 120 V 恒定电压电泳约 30 min, 凝胶放入含溴化乙锭的溶液中染色约 5 min, 于凝胶成像仪观察凝胶条带。

### 1.5 脊灰病毒纯化

参照王三应等<sup>[8]</sup>方法进行病毒纯化: 取上述-80 °C 保存的病毒原液, 于 4 °C 下 4000 r/min 离心 30 min, 除去细胞碎片, 上清液中缓慢加入 400 g/L 的 PEG6000 至终浓度为 70 g/L, 加入时搅拌均匀, 调整 pH 至 7.5, 4 °C 过夜后于 4 °C 下 8000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 用 1 mL PBS 重悬沉淀, 将此病毒浓缩液平铺在质量分数为 15%~50%蔗糖液上, 于 4 °C、284000 g 离心 2 h。注射器吸收法分段收集蛋白梯层, 溶解于 PBS 中, 测定各梯层在 260、280 nm 处的 OD 值。再将病毒蛋白层在 12%分离胶、5%浓缩胶中进行 SDS-PAGE 电泳。

### 1.6 Balb/c 小鼠免疫

取 125 μL 纯化的病毒抗原, 再移取 125 μL 弗氏完全佐剂, 于漩涡混合仪上至抗原完全乳化, 腹腔注射 SPF 级的 Balb/c 小鼠(6~8 周龄, 雌性), 每隔 2 周进行 1 次腹腔注射(免疫 3 次), 在细胞融合前 3 天选取效价达到 1:6000 以上的小鼠, 用弗氏不完全佐剂混合的等量抗原进行腹腔注射加强免疫。

### 1.7 细胞融合

细胞融合参考 Milstein C 等<sup>[9]</sup>, 具体如下: 取经过免疫后血清中脊灰病毒 I 型抗体效价达到 1:6000 以上的小鼠, 无菌操作制备免疫脾细胞; 经过 8-氮鸟嘌呤(20 μg/mL) 培养除去返祖的 HGPRT<sup>+</sup>骨髓瘤细胞, 融合时使骨髓瘤细胞达到对数生长期, 制备 SP2/

0-Ag14 骨髓瘤细胞.将 SP2/0-Ag14 细胞悬液与脾细胞按 1:2~1:10 比例混合,利用 50% PEG 1450 进行融合.融合后用 20%胎牛血清的 1×HAT 培养液重悬,以每孔  $2 \times 10^4$  个脾细胞接种于每孔  $(2 \sim 5) \times 10^4$  个小鼠腹腔巨噬细胞的 96 孔饲养层细胞培养板中,5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 的培养箱中培养,融合后每隔 3 d 换 100  $\mu\text{L}$  20%胎牛血清的 1×HAT 培养液,第 3 次后换 20%胎牛血清的 1×HT 培养液培养.

### 1.8 抗体筛选

用方阵滴定试验(Square matrix)确定选择上述纯化病毒抗原的最佳包被浓度,用间接 ELISA 筛选脊灰病毒 Sabin 株 I 型抗体<sup>[8]</sup>.具体步骤如下:用 1×抗原包被液稀释纯化的脊灰病毒 Sabin 株 I 型(0.1 mg/mL)酶标板每孔加 100  $\mu\text{L}$  在湿盒中 37 °C 孵育 2 h,或 4 °C 过夜;甩去包被液,每孔加 200  $\mu\text{L}$  的 5% BSA 封闭液,于 37 °C 孵育 1 h;甩去封闭液,每孔加 300  $\mu\text{L}$  的 1×PBST 浸泡 5 min,重复 4 次;每孔加 100  $\mu\text{L}$  杂交瘤上清液(一抗),室温孵育 1 h;PBST 洗 4 次,每孔加 100  $\mu\text{L}$  羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体(用 PBST 进行 1:5000 稀释),室温孵育 1 h;PBST 洗 4 次,每孔加 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液(现配现用 A, B 液混合),室温避光静置 20 min 显色;每孔加 100  $\mu\text{L}$  1 mol/L 硫酸溶液终止反应,用酶标仪在 450 nm 处波长测定吸光度值.以未免疫健康 SPF 级同龄雌性 Balb/c 小鼠的血清为阴性对照,以免疫脊灰病毒 Sabin 株 I 型抗原的 Balb/c 小鼠的血清为阳性对照.抗体阳性杂交瘤细胞的判断依据:杂交瘤细胞培养上清液与阴性对照 P/N 值  $\geq 2.1$  时,判定为阳性杂交瘤孔.

### 1.9 杂交瘤细胞克隆

利用有限稀释法克隆阳性孔杂交瘤细胞.用 20%胎牛血清的 1×HT 培养液对杂交瘤细胞进行 10 倍梯度稀释,1 个阳性杂交瘤细胞/孔的密度,接种于每孔  $(2 \sim 5) \times 10^4$  个小鼠腹腔巨噬细胞的 96 孔饲养层细胞培养板中,饱和湿度 5%  $\text{CO}_2$ 、37 °C 的培养箱中培养,至少连续进行 2 次克隆化培养,直至杂交瘤细胞克隆阳性孔比率达到 100% 为止.

### 1.10 单克隆抗体的制备

采用细胞培养法制备单克隆抗体.将克隆化稳定的抗体阳性杂交瘤细胞于细胞培养瓶中培养,待铺满细胞瓶 80% 时,换无血清 DMEM 培养至细胞脱落,收集细胞悬液于离心管中,室温下 500 g 离心 10 min;弃沉淀,收集上清分装,放于 -80 °C 下保存备用.

### 1.11 效价测定

利用上述间接 ELISA 测定杂交瘤细胞单抗上清

液的效价,同时用微量中和试验法测定杂交瘤细胞单抗上清液的中和抗体效价.

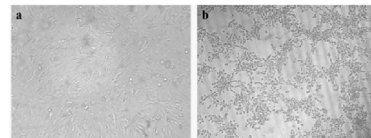
### 1.12 统计学分析

对不同浓缩倍数下病毒液效价的测定结果,采用 *t*-检验法(student's *t*-test)进行显著性差异分析, $P < 0.05$  表示显著差异, $P < 0.01$  表示极显著差异.

## 2 结果

### 2.1 细胞病变

正常 Vero 细胞为贴壁细胞,单层细胞时排列紧密有规则,形态清晰(见图 1a);接种脊灰病毒 Sabin 株 I 型 96 h 后细胞完全 CPE,细胞折光性增强,胞内颗粒增多,细胞收缩,由梭形逐渐变为圆形,细胞间只有纤细的细胞间桥连接,细胞单层出现拉网结构,融合成片(见图 1b).



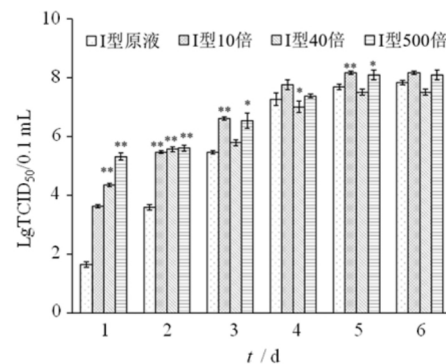
a) 正常细胞形态; b) 细胞完全病变形态

图 1 脊灰病毒致细胞病变效应

Fig.1 CPE of poliovirus

### 2.2 效价测定

将获得的病毒原液经过 PEG 浓缩后,测定每个批次病毒效价.第 1~6 d I 型脊灰病毒原液的效价和浓缩毒液的效价存在显著差异.终点效价,其中 I 型 10 倍和 500 倍浓缩毒液的效价均显著高于原液的效价( $P < 0.05$ ,见图 2).



与 I 型原液相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$   $n = 3$

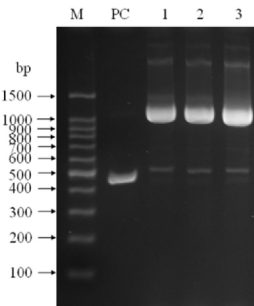
图 2 脊灰病毒 I 型效价测定

Fig.2 Titer determination of poliovirus type I

### 2.3 脊灰病毒 Sabin 株 I 型 VP1 基因的扩增

针对 I 型病毒结构蛋白 VP1 的编码区设计的引物 UG1 和 UC11,通过逆转录 PCR 扩增后,产生约 1100 bp 的特异性产物,经琼脂糖凝胶电泳后,在 1100

bp 处各有一条明亮的脊灰病毒 VP1 基因的特异性条带,460 bp 处为试剂盒阳性对照条带,1100 bp 处为目的条带(见图 3) 其表明逆转录扩增成功,初步确定病毒为脊髓灰质炎病毒。



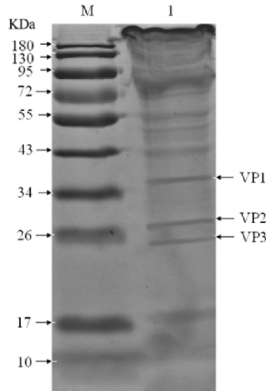
M) DNA 标准品; PC) 阳性对照; 1 2 3) I 型脊灰病毒样品

图 3 脊灰病毒 Sabin 株 I 型 VP1 基因 RT-PCR 扩增产物

Fig.3 RT-PCR amplification product of VP1 gene from poliovirus Sabin type I

## 2.4 病毒纯化蛋白含量及 SDS-PAGE 图谱

经过蔗糖(质量比为 15%~50%) 密度梯度离心,及 50%,30%蔗糖垫层离心后,培养的脊灰病毒纯化效果一般,其蛋白含量为 2.764 mg/mL。脊灰病毒的 3 种结构蛋白 VP1,VP2,VP3 在 SDS-PAGE 图谱上可见分子量分别为 35,28,24 KDa。



M) 蛋白标准品; 1) 纯化病毒的衣壳蛋白

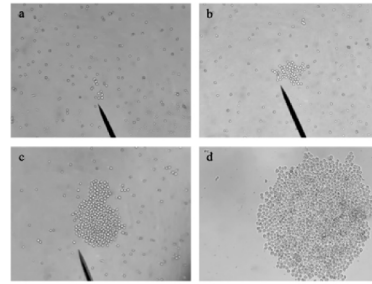
图 4 纯化脊灰病毒衣壳蛋白 SDS-PAGE 结果

Fig.4 SDS-PAGE result of VPs from purified poliovirus

## 2.5 细胞融合及阳性杂交瘤细胞建株

细胞融合后,第 3 d 出现几个浑圆透亮正在生长的杂交瘤细胞;第 5~6 d 出现多个成葡萄串状分布的融合细胞集落;生长至第 8 d 时,融合细胞集落继续长大,有肉眼可见针尖样大小的集落;约第 12 d,细胞集落可布满每孔 1/3~1/2 的面积,培养液颜色呈黄色,此时可进行抗体筛选(见图 5)。共进行 6 次细胞融合,铺 29 块 96 孔细胞培养板,6 次的细胞融合率分别为 15.63%,3.12%,66.49%,33.33%,46.65%,14.21%;筛选到 8 株阳性杂交瘤细胞,经过 3 次有限

稀释克隆化后,得到 1 株稳定分泌脊灰病毒 I 型抗体的杂交瘤细胞株 G8G7。



a) 3 d; b) 5 d; c) 8 d; d) 12 d

图 5 细胞融合后培养不同时间的杂交瘤细胞克隆

Fig.5 Hybridoma cell clones cultured at different time after cell fusion

## 2.6 单克隆抗体效价测定

通过细胞培养法制备的脊灰病毒 I 型抗体,按 2 倍连续稀释  $2^{-1} \sim 2^{-4}$ ,利用间接 ELISA 测定其效价为 1:8(见表 1)。再通过中和试验,固定 100TCID<sub>50</sub>/0.1mL 病毒 PV-I 与  $2^{-1} \sim 2^{-12}$  稀释度单抗上清中和后感染单层 Vero 细胞,以 Reed-Muench 公式计算抗体效价,其中和抗体效价为 1:58。此外利用此抗 PV-I 单抗上清与病毒 PV-II 中和实验,结果显示实验组  $2^{-1} \sim 2^{-12}$  稀释度的 Vero 细胞病变率达到 100%,说明抗 PV-I 单抗与 PV-II 之间无交叉反应。

表 1 间接 ELISA 法测定单克隆抗体效价

Tab.1 Determination of monoclonal antibody titer by indirect ELISA

单抗上清	抗体效价
原液单抗上清	18.597±0.262
1:2	6.298±0.142
1:4	4.166±0.084
1:8	2.986±0.049
1:16	1.969±0.046
空白对照	0.000±0.005
阴性血清	1.000±0.050
阳性血清	18.946±0.41

## 3 讨论

自 César Milstein 和 Georges Köhler 两位科学家<sup>[10]</sup> 1975 年利用细胞融合技术开创了单克隆抗体技术以来,该技术在生物学、医学领域获得了广泛应用。单克隆抗体具有单一生物活性、特异性强、质量控制方便等许多优点,而利用常规方法制备的脊灰病毒多抗血清,性质常不均一;脊灰病毒单克隆抗体对于脊灰病毒流行病学监视、疫苗免疫水平评估、衍生型病例研究具有重要意义。

1981 年 Osterhaus 等<sup>[11]</sup> 制备了 Sabin 株 3 种血清

型的单克隆抗体,两种针对PV-I的中和单克隆抗体显示出与VP1的选择性免疫沉淀,表明VP1是体内诱导中和抗体的重要多肽。1982年Morag Ferguson等<sup>[12]</sup>利用脊灰病毒Sabin株III型为抗原制备了单克隆抗体,通过中和试验、酶联免疫吸附试验得到9株分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株。PD Minor等<sup>[13]</sup>制备了针对Saukett株III型的特异性单克隆抗体,并用单向酶扩散法(SRD)分析该单抗与I、II型之间未有免疫交叉反应。2015年,制备具有治疗性的A21单克隆抗体,其可中和针对I型和II型野生型和疫苗型脊髓灰质炎病毒,同时不干扰对脊髓灰质炎病毒疫苗的免疫应答,并且对抗脊髓灰质炎病毒药物的病毒株产生有效抑制<sup>[14]</sup>。在国内,唐恩华<sup>[15]</sup>于1991年利用脊灰病毒的3种血清型单克隆抗体开发了两套试剂盒,用于脊髓灰质炎病毒毒株间的差异和抗原变异的研究及疫苗株与野毒株的鉴别,具有高度特异性,可快速、简便、敏感地进行病毒病原学诊断。褚学者<sup>[16]</sup>于2006年制备了Sabin株II型D抗原的单抗,ELISA测得其腹水抗体效价为 $1:2.4 \times 10^6$ ,微量中和试验测得中和抗体效价为 $1:1.3 \times 10^4$ ;李树香<sup>[17]</sup>2010年制备了抗脊灰病毒I型D抗原的单克隆抗体;张春梅<sup>[18]</sup>2014年成功制备了抗PV-II、III且不与C抗原交叉反应的D抗原单克隆抗体。这些研究为脊灰病毒抗原检测试剂盒的研制建立了基础,为疫苗质量检测提供了有效的手段。

本研究成功获得了为抗脊灰病毒Sabin株I型D抗原单克隆抗体,通过细胞培养法制备的单克隆抗体,其抗体效价为 $1:8$ ,中和效价为 $1:58$ ,同时此抗PV-I单抗与PV-II之间无交叉反应;说明该单克隆抗体为抗PV-I型特异性单克隆抗体。此抗脊灰病毒Sabin株I型杂交瘤细胞的建立,为脊髓灰质炎病毒的体外检测等提供了良好的基础。

#### 参 考 文 献

- [1] Zell R, Delwart E, Gorbalenya A E, et al. ICTV virus taxonomy profile: *Picornaviridae* [J]. *J Gen Virol*, 2017, 98 (10): 2421-2422.
- [2] 安军静,朱 晖,严冬梅,等. 中国2009年I型脊髓灰质炎病毒基因特征分析[J]. *中国疫苗和免疫*, 2010 (2): 115-121.
- [3] Willyard C. Polio: The eradication endgame [J]. *Nature*, 2014, 507(7490): 14-15.
- [4] Global polio eradication initiative. Case breakdown by country. [EB/OL]. (2018-06-21) [2018-06-21]. <http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/this-week/>.
- [5] 袁 瓌. 2013—2018年消灭脊髓灰质炎最后阶段战略计划[J]. *国际生物制品学杂志*, 2013, 36(5): 267-270.
- [6] 王朝元,刘亮亮. bHGA对外培养成骨细胞活性的影响[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2016, 35(2): 31-35.
- [7] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [J]. *Am J Epidemiol*, 1938, 27(3): 493-497.
- [8] 王三应,孙萍萍,张 磊,等. 羊轮状病毒LLR VP4单克隆抗体的制备与特性研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(11): 1074-1078.
- [9] Galfrè G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures [J]. *Methods Enzymol*, 1981, 73 (Pt B): 3-46.
- [10] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497.
- [11] Osterhaus A D, van Wezel A L, van Steenis G, et al. Production and potential use of monoclonal antibodies against polio viruses [J]. *Dev Biol Stand*, 1981, 50(3): 221-228.
- [12] Ferguson M, Yi-Hua Q, Minor P D, et al. Monoclonal antibodies specific for the sabin vaccine strain of poliovirus 3 [J]. *Lancet*, 1982, 2(8290): 122-124.
- [13] Minor P D, Schild G C, Ferguson M, et al. Genetic and antigenic variation in type 3 polioviruses: characterization of strains by monoclonal antibodies and T1 oligonucleotide mapping [J]. *J Gen Virol*, 1982, 61 (Pt 2): 167-176.
- [14] Kouivaskaia D, Chen Z, Dragunsky E, et al. A single chimpanzee-human neutralizing monoclonal antibody provides post-exposure protection against type 1 and type 2 polioviruses [J]. *J Clin Virol*, 2015, 65: 32-37.
- [15] 唐恩华,庄俊英,王立言,等. 抗脊髓灰质炎病毒单克隆抗体试剂盒的研制及应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 1991(2): 66-70.
- [16] 褚学者,姜述德,孙明波,等. 抗脊髓灰质炎病毒II型Sabin株D抗原单克隆抗体的研制[J]. *免疫学杂志*, 2006, 22(4): 387-389.
- [17] 李树香,沈心亮,石 男,等. 抗I型脊髓灰质炎病毒单克隆抗体的制备[J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(6): 633-635.
- [18] 张春梅,宋朝君,李 娜,等. 脊髓灰质炎病毒2型和3型D抗原单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(11): 1174-1175.

(责任编辑 刘 钊)