

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.02.18

抗阪崎肠杆菌 LPS 单克隆抗体的制备及初步应用

马卫静, 李克生*, 杜惠芬, 彭洪江, 杜丽娟, 连晓雯

(甘肃省医学科学研究院 医学生物中心, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为制备抗阪崎肠杆菌(*ES*)脂多糖(LPS)抗原单克隆抗体(MAb)及建立双抗夹心ELISA检测方法,本研究以热灭活的*ES*(ATCC51329)菌体抗原作为免疫原,*ES*菌体结合LPS作为筛选抗原,采用杂交瘤细胞技术筛选获得9株稳定分泌抗*ES*LPS特异性MAb的杂交瘤细胞株。采用改良的过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶(HRP)酶标抗体,并建立检测*ES*的双抗夹心ELISA方法,该方法对*ES* ATCC51329具有良好的特异性,最低检测限可达 10^3 cfu/mL,为食品中*ES*的检测提供特异性MAb及ELISA检测方法。

关键词: 阪崎肠杆菌; 脂多糖; 单克隆抗体; 双抗夹心ELISA

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)02-0155-05

Preparation of monoclonal antibody against LPS of *Enterobacter sakazakii* and the development of a sandwich ELISA

MA Wei-jing, LI Ke-sheng*, DU Hui-fen, PENG Hong-jiang, DU Li-juan, LIAN Xiao-wen

(Medical Academy of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract: To primarily establish the sandwich ELISA for *Enterobacter sakazakii* detection, Nine monoclonal antibodies (MAbs) against lipopolysaccharide (LPS) of *E.sakazakii* were prepared by fusion of SP2/0 myeloma cells with spleen cells from BALB/c mice immunized with the *E.sakazakii* and screened by the indirect ELISA coating with purified LPS from *E.sakazakii*. Meanwhile, the double sandwich ELISA was primarily developed for detecting *E.sakazakii* using a MAb conjugated with horseradish peroxidase (HRP) by using an improved sodium periodate oxidation method as the detection antibody, and other MAbs as capture antibody. The assay established in the present study was specific for *E.sakazakii* with the detection limit of 10^3 cfu/mL in pure culture of *E.sakazakii* ATCC51329. The results show that the specific MAbs and the sandwich-ELISA could be useful in the detection of *E.sakazakii*.

Key words: *Enterobacter sakazakii*; lipopolysaccharide; monoclonal antibody; sandwich ELISA

阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*, *ES*)属肠杆菌科的一个新属细菌,由 *Cronobacter sakazakii* (如 ATCC 29544)、*C.turicensis* (如 LMG 23827)、*C.malonaticus* (如 LMG 23826)、*C.muytjensii* (如 ATCC 51329) 和 *C.dublinensis* (如 LMG 23823) 5个新种组成^[1],是一种新的食源性的条件性致病菌。*ES*主要

感染婴幼儿,能够引起新生儿脑膜炎、菌血症以及坏死性结肠炎。近年来从许多进出口食品尤其是婴幼儿配方奶粉检测出该菌^[2],2002年美国的监测结果显示,1岁以下婴幼儿*ES*的感染率为 $1/10^4$,而出生体重偏低的新生儿感染率为 $8.7/10^4$,感染死亡率可达20%~50%^[3]。因此,该菌在国内外越来越

*Corresponding author

收稿日期: 2011-11-13

作者简介: 马卫静(1987-),女,新疆昌吉吉木萨尔人,硕士,主要从事兽医微生物与免疫学研究。

*通信作者: E-mail: lksem@sohu.com

受到人们的重视。据报道即使低浓度的 *ES* 污染也可以在奶粉的冲调和放置中大量繁殖而成为感染的危险因素,并且目前对于该菌引起的疾病没有特效的治疗方法,因此建立具有高灵敏度和高特异性的检测方法用于食品检测、临床诊断、疾病监测及疾病暴发调查等就显得尤为重要。免疫学检测技术具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、检测成本低、安全可靠等优点,已被广泛运用到众多相关检测领域,然而具有高特异性和高亲和力的单克隆抗体(MAb)是进行免疫学检测的基础。目前国内外针对 *ES* 的检测技术主要集中在传统的生化及分子生物学检测技术上,因而开展 *ES* 免疫学检测技术的研究具有一定的现实意义。*ES* 免疫学检测方法的先决条件是抗体的特异性,但目前国内外对于 *ES* MAb 的研究少见报道。脂多糖(LPS)是 *ES* 细胞壁的重要组成部分,并且 *ES* 特异性的 O 抗原就位于 LPS 中,因此本实验选用 *ES* LPS 作为筛选抗原,制备了 *ES* LPS 特异性 MAb,并以制备的 MAb 初步建立了检测 *ES* 的双 MAb 夹心 ELISA 检测方法。

1 材料和方法

1.1 菌株、LPS 抗原、细胞及实验动物 *ES* 标准菌株(ATCC51329)、大肠杆菌、沙门氏菌、单增李斯特菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌均由珠海出入境检验检疫局技术中心食品安全检测实验室提供,并由本中心保存;*ES* LPS 抗原以及 SP2/0 细胞由本中心提供;BALB/c 小鼠购自兰州大学动物中心。

1.2 主要试剂 弗氏佐剂、HT 母液(100×)、A 母液(100×)、聚乙二醇(PEG-1000)、小鼠 MAb 亚类鉴定试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)均购自 Sigma 公司;DMEM 购自 GIBCO 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.3 MAb 的制备

1.3.1 抗原的制备 *ES* (ATCC51329)菌体抗原:将 *ES* 划线接种于 LB 培养基,37 °C 培养 18 h~24 h。挑取单个菌落接种于 LB 液体培养基,37 °C 摇床培养 24 h,80 °C 灭活 30 min,5 500 r/min 离心 10 min 收集菌体,用灭菌 0.9 % NaCl 洗涤 3~4 次,调整细菌浓度为 1.5×10^9 cfu/mL,分装,-20 °C 保存备用。

LPS 抗原:参照参考文献[4]方法,采用热酚水法提取。将收集的细菌自 -20 °C 取出,-80 °C 反复冻

融 3 次,超声破碎(温度 26 °C,功率 350 w,超声 5 s,间隔 9 s,共 70 次)后,将裂解的菌液置 4 °C 过夜。将上述裂解的菌液与等量的 90 % 苯酚于 68 °C 水浴中摇动 30 min;5 500 r/min 离心 20 min 后收集水相,弃变性蛋白质,并将下层菌体沉淀加等体积的水混匀,于 68 °C 水浴中重复上述操作两次。将 3 次收集的水相放入透析袋中用自来水透析 24 h,换用三蒸水透析 48 h,期间换水 5~6 次;透析物用聚乙二醇 20000 浓缩至原来体积的 1/4,离心取上清即得 LPS 粗产物。

1.3.2 动物免疫 取 6 周龄~8 周龄体质量 18 g~22 g 雌性 BALB/c 小鼠 5 只,每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 卡介苗致敏。取 1.5×10^9 cfu/mL 热灭活(80 °C 30 min)的 *ES* 菌体抗原与等量弗氏完全佐剂(或弗氏不完全佐剂)充分乳化后经腹股沟、腋窝、颈背部皮下、足底 3 次免疫,免疫间隔 3 周,免疫菌量依次为 1.0×10^8 cfu、 2.0×10^8 cfu、 4.0×10^8 cfu。融合前 3 d 将菌体抗原和 LPS 抗原混合,按 200 μL/只(菌量约为 2.0×10^8 cfu, LPS 为 4.5 μg)经腹腔进行加强免疫,3 d 后眼球采血处杀小鼠取脾。

1.3.3 间接 ELISA 的建立 以棋盘法确定 ELISA 检测方法的最适试验条件,包括最佳抗原包被浓度、最佳酶浓度、酶标板包被时间等。

1.3.4 细胞融合及杂交瘤细胞的筛选 将免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞按 7:1 比例采用聚乙二醇法进行常规细胞融合^[5]。以 1.3.3 建立的间接 ELISA 方法进行筛选,将得到的阳性克隆经过 3 次~4 次克隆纯化,直至阳性率连续 3 次达到 100 %,再分别对其扩大培养,冻存于液氮罐中备用。

1.3.5 腹水 MAb 的制备、纯化以及纯度鉴定 选 8 周龄~10 周龄体质量 20 g 以上雌性 BALB/c 小鼠,腹腔注射无菌液体石蜡(0.5 mL/只),一周后腹腔注射扩大培养的阳性杂交瘤细胞(2×10^6 个/只~ 5×10^6 个/只),一周后抽取腹水,3 000 r/min 离心去除油脂和脂肪,取上清即为小鼠腹水 MAb。对收集的腹水分别采用 50 % 和 45 % 饱和硫酸铵分步盐析沉淀和 Sephacryl S-300 凝胶柱分离纯化,并用 SDS-PAGE 电泳分析抗体纯度及抗体轻链和重链的分子量。

1.4 MAb 生物学特性鉴定

1.4.1 特异性鉴定 采用间接 ELISA 法检测 MAb 特异性,检测菌包括肠炎沙门氏菌、丙型副伤寒沙

门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、婴儿沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7、大肠杆菌 O157、宋内氏志贺菌、单增李斯特杆菌、ES ATCC29544 和 ES ATCC12868。采用热灭活法灭活上述细菌, 用包被液调整细菌浓度至 10^7 cfu/mL, 包被酶标板, 检测各株杂交瘤细胞上清。

1.4.2 稳定性及亚类测定 分别以方法 1.3.3 中确定的最佳抗原包被浓度的菌体抗原和 LPS 抗原混合包被酶标板, 采用间接 ELISA 法测定细胞上清。对筛选到的阳性杂交瘤细胞株体外进行连续培养 3 个月, 每间隔 15 d 测定一次细胞上清效价。按照小鼠 Ig 亚类鉴定试剂盒说明书进行抗体的免疫球蛋白类别及其亚类鉴定。

1.4.3 抗原位点配对分析 采用叠加试验对 MAbs 抗原表位进行分析。将培养杂交瘤细胞的细胞上清及纯化后抗体分别加入到全菌及 LPS 包被的酶标板中, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 30 min, 洗涤 4 次, 再加入配对细胞株的细胞上清或其纯化后的抗体, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 30 min, 洗涤 4 次, 加入 1:20 000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, $50 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 30 min, 洗涤 5 次, 加入底物 A、B 各 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 显色 10 min, 终止液终止反应, 酶标仪测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

结果按照公式: $\text{AI} = [2 \times A(1+2) \div (A1+A2) - 1] \times 100\%$ 计算叠加率。

公式中: A1 表示 MAbs1 的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, A2 表示 MAbs2 的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, A(1+2) 表示 MAbs1 叠加 MAbs2 的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。如果测得 $\text{AI} < 50\%$ 表明被测两株 MAbs 识别的抗原结合位点相同, 而如果测得 $\text{AI} > 50\%$ 表明被测两株 MAbs 识别的抗原结合位点不同, 并且 AI 越大, 其抗原识别位点重叠的可能性就越小。

1.5 双抗夹心 ELISA 的建立

1.5.1 酶标抗体的制备 采用改良过碘酸钠法标记抗体^[6], 制备酶标抗体复合物。

1.5.2 双抗夹心 ELISA 检测条件的优化 采用方阵滴定法确定包被浓度、酶标抗体浓度和底物最佳反应时间等。具体操作按照以下步骤进行: (1) 用包被液调整捕获抗体的浓度为 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 包被酶标板, 37°C 2 h 之后置 4°C 过夜。(2) PBS-T 洗涤 $1 \text{ min} \times 3$ 次, 3% BSA $120 \mu\text{L}/\text{孔}$, 封闭 2 h。(3) PBS-T 洗涤 $1 \text{ min} \times 3$ 次, 加入待检菌液, $100 \mu\text{L}/$

孔, 同时选择一孔只加入样品稀释液作为阴性对照, 37°C 1 h。(4) PBS-T 洗涤 $1 \text{ min} \times 4$ 次, 加入 1:2 000 倍稀释的酶标抗体, $50 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 30 min。(5) PBS-T 洗涤 $1 \text{ min} \times 5$ 次, 加入 TMB 底物, 37°C 显色 20 min, 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 酶标仪测定各孔 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。(6) 结果判定: 以(测定孔 A 值 - 空白值)/(阴性对照孔 A 值 - 空白孔) ≥ 2.1 为阳性判定结果, 即 A 值大于阴性对照孔 2 倍的判为阳性。

1.5.3 双抗夹心 ELISA 法敏感性与特异性的检测 采用 1.5.2 的方法检测 ES ATCC29544、ES ATCC12868、金黄色葡萄球菌、单增李斯特杆菌、大肠杆菌 O157 等其他 17 株肠道菌, 菌浓度均为 2×10^9 cfu/mL。同时将 ES ATCC51329 纯培养菌液进行常规平板活菌计数后灭活, 纵向依次作 10 倍稀释后进行检测, 确定该检测方法的灵敏度。

2 结果

2.1 MAbs 筛选方法的建立 棋盘阵法确定 MAbs 间接 ELISA 法抗原最佳包被浓度为: ES LPS 抗原 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$; 菌体抗原 10^5 cfu/mL; 最佳酶工作浓度为 1:20 000。

2.2 杂交瘤细胞株的建立及 MAbs 亚类的测定 经 3 次细胞融合和间接 ELISA 法筛选, 共获得 9 株稳定分泌抗 ES LPS MAbs 的杂交瘤细胞株, 并分别命名为: 1A11、2A7、2D8、2H4、4B10、4F11、6F1、6F11 和 8G9。各 MAbs 细胞培养上清的反应性与抗体亚类见表 1。

表 1 细胞上清反应性与 MAbs 亚类
Table 1 Isotype identification of MAbs by indirect ELISA

	MAb								
	1A11	2A7	2D8	2H4	4B10	4F11	6F1	6F11	8G9
$\text{OD}_{450\text{nm}}$ value	1.290	1.388	0.878	0.939	1.234	1.329	1.039	1.063	0.938
亚类 Subtype	IgG1	IgG3	IgM	IgM	IgG3	IgG3	IgM	IgG2b	IgM

2.3 抗原位点配对分析 以全菌和 LPS 抗原分别包被酶标板, 采用间接 ELISA 叠加试验对 5 株可以产生 IgG 类抗体的杂交瘤细胞株进行配对分析。分析结果显示 MAbs 1A11 与 2A7、2A7 与 4B10 在两种不同包被抗原测定时 AI 值均大于 50%, 表明两株抗体识别的抗原表位不同, 采用全菌作为抗原时 1A11 与 2A7 的 AI 值最高, 为 81.98%, 表明这两株 MAbs 识别的抗原表位差异较大。2A7 与 4F11 两株 MAbs 采用全菌作为包被抗原时的 AI 值大于 50%,

而采用 LPS 作为包被抗原时的 AI 值小于 50 % ; 1A11 与 4B10 两株 MAb 采用全菌作为包被抗原时的 AI 值小于 50 % , 而采用 LPS 作为包被抗原时的 AI 值大于 50 % 。 4F11 和 6F11 两株 MAb 与其余 3 株 MAb 采用两种抗原时的 AI 值均小于 50 % , 表明两株 MAb 识别的抗原表位差异不大。

2.4 MAb 稳定性测定 5 株 MAb 抗原表位配对分析结果大于 50 % 的 3 株杂交瘤细胞株经体外连续培养 3 个月, 收集细胞上清采用间接 ELISA 测定细胞上清效价。杂交瘤细胞分泌抗体稳定性试验结果显示: MAb 1A11、2A7 的上清效价前期有升有降, MAb 4B10 的上清效价保持上升趋势, 但在后期均基本趋于稳定。

取 1A11、2A7 和 4B10 杂交瘤细胞, 采用体内诱生法制备腹水, 将收集的腹水进行细胞计数, 按 $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个 / 只接种于小鼠腹腔, 连续传代 5 次。测定纯化前后腹水效价, 结果显示纯化前腹水效价明显高于纯化后。

2.5 MAb 纯化及腹水 SDS-PAGE 分析 采用饱和硫酸铵沉淀和 Sephacryl S-300 HR 层析法对 1A11、2A7 和 4B10 3 株杂交瘤细胞经小鼠体内诱生法所采集到的腹水进行纯化, 用间接 ELISA 法和 SDS-PAGE 电泳对不同峰的蛋白进行分析, 结果显示仅最后一个峰的蛋白为所需的目的蛋白即纯化后的 MAb, 其余峰均为杂蛋白。纯化腹水 SDS-PAGE 结果显示, 纯化后 MAb 主要有两条蛋白区带, 重链分子量约 50 ku, 轻链分子量约为 25 ku。

2.6 MAb 特异性分析 间接 ELISA 检测杂交瘤细胞株细胞上清及纯化腹水结果显示: MAb 1A11、2A7、4B10 有良好的特异性, 除 MAb 2A7 和 4B10 纯化的腹水抗体与大肠杆菌发生反应外, 其余菌株与 3 株 MAb 均不发生反应。

2.7 双抗夹心 ELISA 法最佳反应条件的确定 包被抗体 2A7 的最佳包被浓度为 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$, 酶标抗体 1A11-HRP 的最佳工作浓度为 1:2 000 稀释, 底物显色时间以 20 min 为最佳。

2.8 双抗夹心 ELISA 检测方法的特异性和灵敏度 采用双抗夹心 ELISA 对 17 株肠道菌进行检测, 特异性结果显示: 该方法对 *ES ATCC51329* 菌株有良好的特异性(图 1)。该方法对纯培养液的检测限为 $10^3 \text{ cfu}/\text{mL} \sim 10^5 \text{ cfu}/\text{mL}$, 即每孔 100 cfu \sim 10 000 cfu (图 2)。

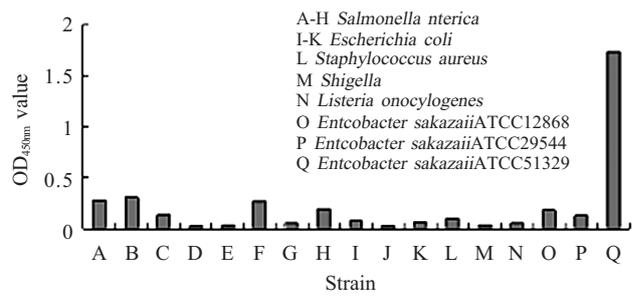


图 1 双抗夹心 ELISA 分析图

Fig.1 The result of sandwich ELISA analysis

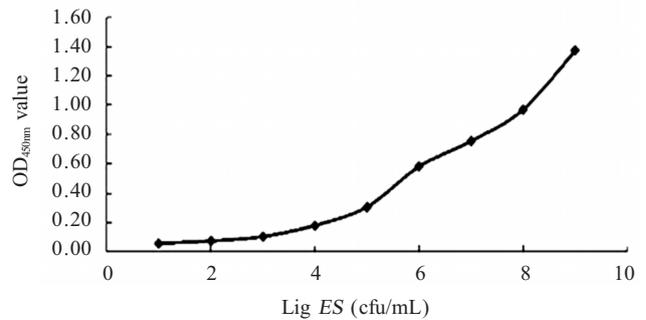


图 2 双抗体夹心 ELISA 检测 ES ATCC51329 的曲线

Fig.2 Sandwich ELISA curve for ES ATCC51329

3 讨论

LPS 为革兰氏阴性细菌所特有, 是一种结构复杂的生物大分子。其侧链多糖位于 LPS 的最外层, 主要构成菌体(O)抗原且具有种、型特异性。LPS 属于非胸腺依赖性抗原(TI), 不能诱导抗体亲和力成熟, 也不能诱导免疫记忆, 单纯采用 LPS 按照常规方法免疫很难产生高亲和力、交叉反应弱的抗 LPS 的 MAbs。因此, 本实验前 3 次免疫时采用 *ES ATCC51329* 全菌作为抗原免疫小鼠, 实验表明全菌体免疫可以满足实验要求, 但采用 LPS 加强免疫可以刺激机体迅速产生强免疫应答反应。

本实验采用常规细胞融合和有限稀释法获得 9 株可以稳定分泌特异性 MAb 的杂交瘤细胞株。其中有 5 株杂交瘤细胞株可以分泌 IgG 抗体, 对 5 株细胞染色体进行分析结果显示杂交瘤细胞染色体数目约为 98 条 \sim 106 条。对 5 株杂交瘤细胞分泌的抗体分别采用 LPS 和全菌作为包被抗原进行抗原表位配对分析, 结果显示同株抗体在与不同抗原反应条件下其 AI 值存在差异。表明同样的免疫刺激可以产生针对同一细菌不同抗原表位的 MAb, 即符合抗体产生的多样性。选取 1A11 和 2A7 两株叠加率较高

的杂交瘤细胞进行扩大培养, 收集并纯化腹水抗体建立了特异性强、敏感性高的双抗夹心 ELISA, 最低检测限可达 10^3 cfu/mL。

由于 *ES* 具有特殊的耐干燥、耐渗透特性, 对于该菌检测方法灵敏度十分重要。与多克隆抗体相比较, MAb 具有高度特异性。基于这一特点 MAb 在许多科学领域得到应用^[7]。但多克隆抗体具有多个抗原表位优势, 可以更好地与细菌表面多种抗原结合, 采用多克隆抗体作为双抗体夹心法的捕获抗体具有更强的捕获能力, 因此在对纯培养物的检测中采用多克隆抗体作为捕获抗体的灵敏度要高于 MAb。然而在一般的实际应用中, 被检样品往往含有至少两种以上杂菌, 由于细菌表面抗原具有多样性的特点, 不同菌属细菌可能存在共同的表面交叉抗原, 因此这些杂菌表面交叉抗原可以与被检测菌表面抗原竞争结合捕获抗体, 因而一定会影响双抗体夹心检测的灵敏度和特异性。1A11、2A7 和 4B10 3 株 MAb 特异性结果显示: 3 株抗体识别抗原表位位于 *ES* ATCC52329 表面, 并且与受试沙门氏菌属的部分细菌存在微弱交叉反应, 这可能是由于二者均属于革兰氏阴性菌, 其表面的 LPS 抗原具有某些交叉抗原位点。3 株 MAb 与其他种的 *ES* (如 *ES* ATCC29544、*ES* ATCC12868) 不反应, 这可能是由于 *ES* 不同种细菌之间组成或结构差异所致, 因而在实际应用中采用本实验建立的双抗夹心 ELISA 法很难检测其他种的 *ES*, 因而进一步开展 *ES* 免疫学检测方法的研究具有十分重要的现实意义。

参考文献:

- [1] Iversen C, Mullane N, McCardell B, et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov. comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis* sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *C. dublinensis* sp. nov. subsp. dublinensis subsp. nov., *C. dublinensis* sp. nov. subsp. lausannensis subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. lactaridi subsp. nov. [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58(Pt 6): 1442-1447.
- [2] Townsend S, Caubilla Barron J, Loc-Carrillo C, et al. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat [J]. *Food Microbiol*, 2007, 24(1): 67-74.
- [3] 刘秀梅. 阪崎肠杆菌—食品安全控制的新目标[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(5): 385-387.
- [4] Brooks B W, Perry M B, Lutze-Wallace C L, et al. Structural characterization and serological specificities of lipopolysaccharides from *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* biovar *Pullover* standard, intermediate and variant antigenic type strains [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 126(6): 334-344.
- [5] Bothamley G H, Rudd R, Festenstein F, et al. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis [J]. *Thorax*, 1992, 47(4): 270-275.
- [6] 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. *上海免疫学杂志*, 1983, 3(2): 97-100.
- [7] 李慧英. 单克隆抗体技术应用初探[J]. *健康与生物制药*, 2009, 24(1): 202-203.

(本文编辑: 李 爽)