

osteoblast-like cells differentiation and mineralization [J]. *J Tiss Eng Regen Med*, 2012, 6(1): 40-48.

- [11] HASLAM R J, DAVIDSON M, DESJARDINS J V. Inhibition of adenylate cyclase by adenosine analogues in preparations of broken and intact human platelets. Evidence for the unidirectional control of platelet function by cyclic AMP [J]. *Biochem J*, 1978, 176(1): 83-95.
- [12] PARK Y G, KANG S K, NOH S H, et al. PGE₂ induces IL-1 β

gene expression in mouse osteoblasts through a cAMP-PKA signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(6): 779-789.

- [13] ZHAI Y K, CHEN K M, GE B F, et al. The changes of iNOS and NO in the osteogenic differentiation process of rat bone marrow stromal cells promoted by icariside II [J]. *Acta Pharm Sin(药学报)*, 2011, 46(4): 383-389.

收稿日期: 2014-07-28

Vero 细胞肠道病毒 71 型灭活疫苗的纯化及鉴定

姜云水, 高孟, 周康凤, 陈科达, 高丽美, 唐彩华, 朱莲, 毛江森(浙江省医学科学院病毒病研究所, 浙江省医学生物工程疫苗研究开发重点实验室, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立 Vero 细胞肠道病毒 71 型(EV71)灭活疫苗的纯化工艺。方法 病毒收获液经离心澄清、福尔马林灭活和超滤浓缩后, 采用 Sephacryl S-400 HR 凝胶过滤层析和 Source 30Q 离子交换层析 2 步层析法纯化 EV71, 进行各项检定及分析后除菌过滤。结果 经纯化的疫苗各项纯化指标均符合中国药典 2010 年版的要求, 杂蛋白去除率>99.9%; 病毒纯化液在电镜下观察到典型的 EV71 病毒颗粒, 经 SDS-PAGE 及 Western blot 分析, 检测到与文献报道大小相符的 EV71 VP1、VP2、VP3 及特异性免疫反应; 制备成疫苗后免疫大鼠能产生特异性中和抗体。结论 本实验建立了 Vero 细胞的 EV71 灭活疫苗的纯化工艺, 纯化后制备的 EV71 灭活疫苗具有较好的免疫原性。

关键词: 肠道病毒 71 型灭活疫苗; Vero 细胞; 纯化; 鉴定

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)02-0136-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.02.002

Purification and Identification of Inactivated Enterovirus 71 Vaccine Derived from Vero Cells

JIANG Yunshui, GAO Meng, ZHOU Kangfeng, CHEN Keda, GAO Limei, TANG Caihua, ZHU Lian, MAO Jiangsen(Medical & Biological Vaccine R&D Key Lab of Zhejiang Province, Institute of Virus Disease, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a purification procedure of inactivated enterovirus 71 (EV71) vaccine derived from Vero cells. **METHODS** The harvested liquid was pretreated by means of centrifugation, ultrafiltration, inactivated with formaldehyde, and then the inactivated EV71 vaccine was purified by Sephacryl S-400 HR gel filtration chromatography and Source 30Q ion exchange chromatography. The vaccine was subjected to control tests and analysis then sterilized by filtration. **RESULTS** All test results of three lots vaccine after purification accorded with the requirements of Ch.P(2010). All the removal rates of protein in vaccine were >99.9%. Typical morphology of EV71 was observed in purified EV71 samples under transmission electron microscope. SDS-PAGE analysis showed three protein straps with relative molecular weight which was according with the VP1, VP2 and VP3 of EV71 and could be confirmed by Western blot analysis. The purified vaccine induced neutralizing antibody titer in rats. **CONCLUSION** A purification procedure of EV71 vaccine derived from Vero cells is developed, and the vaccine demonstrates high immunogenicity.

KEY WORDS: inactivated enterovirus 71 vaccine; Vero cells; purification; identification

近年来, 手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)在我国呈持续流行状态, 2009 年至今, 年发病率均在百万以上, 给公众健康带来

了严重威胁^[1-4]。研究表明, 肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)是引起婴幼儿 HFMD 的主要病原体, 并且绝大多数的 HFMD 重症患者都与

基金项目: 浙江省科技计划项目(2010C03005、2012F10005、2014C33231)

作者简介: 姜云水, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (0571)89890278 E-mail: xyls_hz@hotmail.com 高孟, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (0571)89890277 E-mail: Gaom8888@126.com 姜云水和高孟对本文具有同等贡献, 二者同为第一作者

EV71 感染密切相关^[5-8]。研制安全有效的 EV71 疫苗从而控制 HFMD 疫情,特别是预防重症病例的发生,在我国已成为一个十分迫切的问题。

传统的病毒类疫苗纯化多采用氯仿抽提、聚乙二醇沉淀、密度梯度离心和凝胶过滤层析等方法^[9-12]。随着国家疫苗质量标准的进一步提高,特别是对宿主细胞的成分(DNA 和蛋白)残留及生产过程中添加物残留标准的提高,传统的纯化方法已越来越难满足疫苗生产的需要。本实验在参照和改进传统的病毒纯化方法的基础上,采用凝胶过滤和离子交换组合层析的方法,建立了 EV71 病毒的纯化工序,制备了高纯度低残留的 EV71 灭活疫苗。

1 仪器、试剂与材料

1.1 细胞及病毒

Vero 细胞来源于美国标准生物品收藏中心(American type culture collection, ATCC),使用代次为 130 代,肠道病毒 71 型 H3-TY 株为浙江普康生物技术股份有限公司分离,经全基因测序,明确为 C4 亚型(GenBank 登录号: KF668443)。

1.2 仪器

AKTA purifier 100 纯化仪(美国 GE Healthcare Life Science 公司); J-26XPI 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Millipore Pellicon 0.11M² 超滤系统(美国 Millipore 公司)。

1.3 试剂与材料

甲醛溶液(药用级,湖南尔康制药有限公司,批号: 20101201); 肠道病毒 71 型抗原检测试剂盒(浙江普康生物技术股份有限公司,批号: 20100818); Vero 细胞宿主蛋白(host cell protein, HCP)残留检测试剂盒(美国 Cygnus technologies 公司,批号: 210610); Vero 细胞 DNA 残留检测试剂(瑞士罗氏公司,批号: 12647521); 蛋白含量检测试剂盒(美国 Thermo 公司,批号: 158759); 纯化介质 Sephacryl S-400 HR(批号: 10016772)和 Source 30Q(批号: 311828)均为美国 GE Healthcare Life Science 公司产品; 截留分子量为 100 kDa 的超滤膜包(批号: C1NA35832)和 0.22 μm 的过滤器(批号: R1HA88389)均为美国 Millipore 公司产品。

1.4 动物

Wistar 大鼠, SPF 级, 7 周龄, ♀♂, 体质量(180±30)g, 由中国食品药品检定研究院动物中心

提供, 合格证号: SCXK(京)2009-0017。

2 方法

2.1 病毒液制备

用激流式生物反应器灌流培养 Vero 细胞及 EV71, 当 75%以上的细胞出现细胞病变时, 4 ℃ 8 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 收获培养上清。

2.2 病毒液的灭活

收获的病毒液按 1:4 000 的比例加入福尔马林, 37 ℃ 灭活, 每天取样检测抗原含量及灭活效果。

2.3 病毒的纯化

灭活后的病毒液经 Millipore Pellicon 超滤系统浓缩 50~100 倍, 以去除小分子杂质。病毒浓缩液加入到经 PBS(pH 7.2)平衡好的装有 Sephacryl S-400 HR 的层析柱中, 继续用 PBS(pH 7.2)洗脱, 收集第 2 洗脱峰(病毒峰); 再将收集的病毒液经适当稀释后加入到用 20 mmol·L⁻¹ Tris-Cl(pH 7.5)缓冲液平衡好的装有 Source 30Q 的层析柱中, 用 20 mmol·L⁻¹ Tris-Cl(pH 7.5)缓冲液洗脱 1~2 个柱体积, 再用 20 mmol·L⁻¹ Tris-Cl(pH 7.5)和 20 mmol·L⁻¹ Tris-Cl + 1 mmol·L⁻¹ NaCl(pH 7.5)线性梯度洗脱, 收集第 1 峰(病毒峰)。将纯化收集样品用于各项检定。

2.4 稀释及除菌过滤

根据抗原含量的高低, 将纯化样品用病毒保存液适当稀释后, 用 0.22 μm 的滤器除菌过滤, 2~8 ℃ 保存。

2.5 检定

将纯化样品分别进行灭活效果验证、抗原含量、蛋白含量、游离甲醛残留、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)残留、Vero 细胞 HCP 残留、Vero 细胞 DNA 残留、内毒素含量、高效液相(HPLC)、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、蛋白质印迹(Western blot)、透射电镜分析及免疫原性检测。

2.5.1 抗原含量测定 采用酶联免疫法(ELISA)测定, 按使用说明书方法进行。

2.5.2 灭活效果验证 取灭活中和后的病毒液接种 Vero 细胞, (35±1)℃ 培养 5 d, 收获, 同法盲传 2 代, 每代显微镜下观察有无特异性的致细胞病变作用(cytopathic effect, CPE)。无特异性 CPE 则判断灭活验证合格。

2.5.3 蛋白含量测定 BCA 法测定蛋白含量^[13]。

2.5.4 游离甲醛残留测定 采用品红亚硫酸比色

法测定^[14], 残留应 $\leq 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5.5 BSA 残留量测定 采用酶联免疫法(ELISA)测定 BSA 残留量^[14], 残留应 $\leq 100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5.6 Vero 细胞 HCP 残留量测定 采用酶联免疫法(ELISA)测定 Vero 细胞 HCP 残留量, 按使用说明书方法进行, 残留应 $\leq 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5.7 Vero 细胞 DNA 残留测定 采用地高辛膜上斑点杂交法^[14], 残留应 $\leq 100 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5.8 内毒素含量测定 采用凝胶法测定^[14], 应 $\leq 10 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5.9 HPLC 检测 方法参照文献[14], 色谱柱: TOSOH TSK-Gel4000 PWXL(7.8 mm \times 300 mm, 10 μm); 流动相: 20 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液中含 0.4 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠(pH 7.5); 检测波长: 280 nm; 流速: 0.4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 100 μL 。按照面积归一化法计算, 主峰面积应不低于总面积的 95%。

2.5.10 SDS-PAGE 及 Western blot 分析 按照文献[15]的方法, 将培养收获液浓缩产物、Sephacryl S-400 HR 柱纯化收集峰和 Source 30Q 纯化产物进行 12% SDS-PAGE 分析, 考马氏亮蓝 R250 染色。将病毒培养收获液浓缩产物和纯化产物进行 12% SDS-PAGE 后转聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜, 加入抗 EV71 病毒鼠单克隆抗体于含 5% 脱脂奶粉的封闭液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, 漂洗后加入封闭液稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体), 室温孵育 1 h, 洗膜后加入底物显色。

2.5.11 透射电镜分析 按照文献[16]的方法, 将纯化样品滴在含镀碳支持膜的 200 目铜网上, 静置 5 min 后用滤纸吸去多余样品, 在磷钨酸溶液中染色 1~3 min, 吸去多余染液, 干燥后电镜观察。

2.5.12 免疫原性检测 纯化液适当稀释后经氢氧化铝吸附制成疫苗成品, 肌肉注射免疫 Wistar 大鼠, 同时设溶媒阴性组和氢氧化铝佐剂对照组, 每组 8 只, $\text{♀}\text{♂}$ 各半, 免疫后 2, 4, 6, 8, 12 周采血分离血清。采用微量细胞病变法测定血清中的中和抗体, 中和抗体比阴性对照血清有 4 倍以上增长则判断为阳性^[17]。

3 结果

3.1 病毒灭活结果

病毒灭活验证试验结果表明, 灭活 3 d 后, 灭活验证试验结果呈阴性, 显示病毒灭活完全。抗原含量随着灭活时间的延长而降低, 结果见表 1。

表 1 病毒的灭活结果

Tab. 1 Results of virus inactivation

灭活时间/d	灭活验证试验结果	抗原含量/ $\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$
0	+	6 400
1	+	6 400
2	+	3 200
3	-	3 200
4	-	3 200
5	-	3 200
6	-	1 600
7	-	800

注: +—产生特异性 CPE; --无特异性 CPE。

Note: +- produced specific CPE; -- didn't produce specific CPE.

3.2 抗原含量、蛋白含量和各项残留检测以及杂蛋白去除率分析

病毒液经 Sephacryl S-400 HR 柱纯化后, 病毒抗原和其他杂质获得了较好的分离, 病毒抗原主要集中在第 2 峰(病毒峰); 再经 Source 30Q 柱纯化, 进一步去除了宿主 DNA 及其他微量的残留, 第 1 峰(病毒峰)为目的抗原, 结果见图 1。纯化后的病毒液进行抗原含量、游离甲醛残留、BSA 残留、Vero 细胞 HCP 残留、Vero 细胞 DNA 残留、内毒素含量检测, 结果见表 2。根据对病毒收获液和病毒纯化液的蛋白质含量的测定, 计算出杂蛋白去除率均 $>99.9\%$, 结果见表 3。

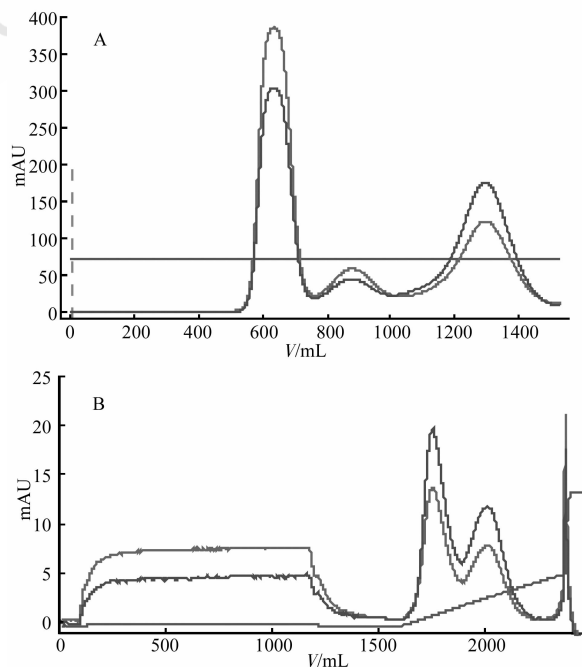


图 1 EV71 疫苗的柱层析图谱

A—Sephacryl S-400 HR 柱; B—Source 30Q 柱。

Fig. 1 Chromatographic profile of EV71 vaccine
A—Sephacryl S-400 HR; B—Source 30Q.

表 2 病毒纯化液的各项检测结果

Tab. 2 Control tests on virus bulk after purification

批号	抗原	游离甲	BSA	HCP	DNA	内毒素
	含量/ EU·mL ⁻¹	醛残留/ μg·mL ⁻¹	残留/ ng·mL ⁻¹	残留/ ng·mL ⁻¹	残留/ pg·mL ⁻¹	含量/ EU·mL ⁻¹
201003	51 200	13	24.8	323	<10	<10
201004	51 200	25	30.0	155	<100	<10
201005	51 200	21	28.7	76	<100	<10

表 3 病毒液纯化后的杂蛋白去除率

Tab. 3 The removal rates of foreign protein in virus bulk after purification

批号	病毒收获液		病毒纯化液		杂蛋白去除率/%
	体积/ L	蛋白含量/ μg·mL ⁻¹	体积/ L	蛋白含量/ μg·mL ⁻¹	
201003	20	2 106.6	0.68	57.7	99.91
201004	20	1 879.4	0.65	44.0	99.93
201005	20	1 984.1	0.70	40.4	99.92

3.3 HPLC 检测

纯化后的病毒抗原经 HPLC 测定, 纯度>95%, 结果见图 2。

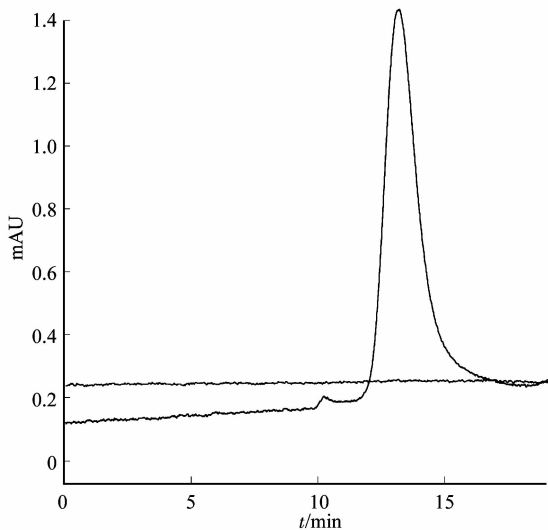


图 2 EV71 纯化产物的 HPLC 纯度测定

Fig. 2 Purity testing of purified EV71 by HPLC

3.4 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

SDS-PAGE 分析结果显示经 Sephacryl S-400 HR 和 Source 30Q 纯化后的病毒产物, 纯度得到了显著提高, 并观察到与 EV71 病毒特异性结构蛋白条带 VP1、VP2 和 VP3 理论分子量大小的 3 条条带, 结果见图 3A 和 B。病毒纯化产物用 EV71 特异性鼠单抗进行 Western blot 分析, 结果呈阳性, 结果见图 3C。

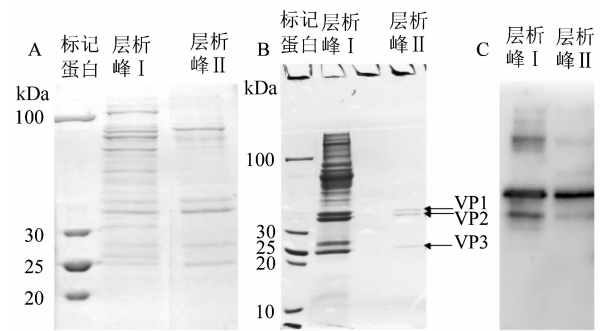


图 3 EV71 纯化产物 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

A-Sephacryl S-400 HR 纯化产物; B-Source 30Q 纯化产物; C-EV71 疫苗纯化产物。

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of purified EV71

A-Sephacryl S-400 HR chromatography products; B-Source 30Q chromatography products; C-purified EV71 vaccine.

3.5 电镜观察结果

纯化后的样品进行透射电镜观察, 在放大倍数为 2~10 万倍时能看到病毒颗粒, 病毒颗粒呈球形, 大小比较均一, 直径约为 27 nm, 符合典型的 EV71 特征, 结果见图 4。

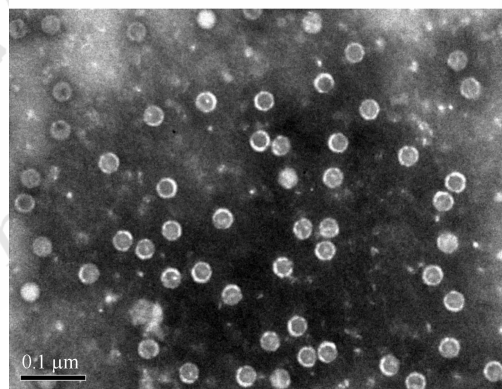


图 4 EV71 纯化样品的透射电镜图(93 000×)

Fig. 4 Electromicroscopy of purified EV71(93 000×)

3.6 免疫原性检测

血清自 1:2 开始 2 倍系列稀释检测中和抗体, 首次免疫后 2 周, 血清中出现少量 EV71 中和抗体。首次免疫后 4 周, EV71 中和抗体全部阳转, 在首次免疫后 8 周达到高峰, 并能维持较长时间。

4 讨论

EV71 是引发 HFMD 的主要病原体, 目前尚无有效的防控手段, 研制 EV71 疫苗成为控制 HFMD 流行的唯一有效措施^[18]。本研究使用生物反应器培养技术和层析纯化技术规模化制备 EV71 灭活疫苗。由于 EV71 在 Vero 细胞上增殖时产生 CPE, 大量细胞破裂脱落, 在澄清过程中直接用过滤器过滤病毒液, 容易堵塞滤器, 所以采

用离心的方法去除细胞碎片。病毒收获液采用低浓度的甲醛溶液 37 °C 灭活一定时间, 3 d 后灭活验证试验结果显示病毒完全灭活, 随着灭活时间的延长, 抗原含量逐渐降低, 而且观察到产生少量白色的细小絮状物质, 提示病毒在甲醛的作用下产生了聚集, 造成了可检测到的抗原含量的降低。EV71 病毒颗粒为二十面体立体对称的球体结构, 直径为 24~30 nm, 根据理论分子量可采用 100 kDa 或 300 kDa 的超滤膜包进行浓缩, 实际操作过程中发现用 300 kDa 的膜包超滤, 滤过液中检测到滴度为 5.0 左右的病毒, 而使用 100 kDa 的膜包, 滤过液中未检测到病毒, 所以采用 100 kDa 膜包超滤, 减少了病毒抗原的损失。经过 50~100 倍的超滤浓缩, 既去除了部分小分子杂质, 体积缩小后又有利于下一步凝胶过滤层析的纯化。本研究的纯化方法采用凝胶过滤 Sephacryl S-400 HR 和离子交换 Source 30Q 组合层析的方法, 样品经 Sephacryl S-400 HR 的初步纯化, 去除了离心未去除的及灭活过程中产生的一些分子量比较大的成分(第 1 峰)和小分子杂质(第 3 峰), 经 SDS-PAGE 及 ELISA 法分析表明病毒抗原主要集中在第 2 峰。随着对疫苗安全性的日益重视, 国家对疫苗中残留物的检测日益严格, 特别是 Vero 细胞宿主 DNA 和宿主蛋白的残留以及生产过程中添加物的残留^[19]。单步层析纯化难以使上述残留物的含量达到标准, 所以增加一步离子交换层析以进一步去除上述残留物。经 Source 30Q 的精细纯化, 进一步降低了游离甲醛、Vero 细胞宿主 DNA、HCP、BSA 和内毒素的残留, 病毒纯化液中各项残留按比例稀释后制成的疫苗成品均符合中国药典 2010 年版。病毒纯化液经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析, 含有 EV71 特异性抗原条带, HPLC 分析结果表明, 纯度>95%。获得的 EV71 疫苗免疫 Wistar 大鼠后, 产生了 EV71 中和抗体。

综上所述, 本研究建立了一种可规模化的 EV71 灭活疫苗的纯化工艺, 为进一步工业化生产 EV71 灭活疫苗奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 中华人民共和国卫生部、卫生部新闻办公室. 卫生部公布 2010 年 1 月及 2009 年度全国法定传染病疫情[R]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2010-02-24 [2014-01-13]. http://www.chinacdc.cn/tjsj/fdcrbbg/201002/t20100224_25293.htm
- [2] TAN X, HUANG X, ZHU S, et al. The persistent circulation

of enterovirus 71 in People's Republic of China: causing emerging nationwide epidemics since 2008 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25662.

- [3] World Health Organization. A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) [S]. World Health Organization Regional Office for the Western Pacific and the Regional Emerging Diseases Intervention (REDI) Centre, 2011: 4-10, 38, 53-60.
- [4] SUN J L, ZHANG J. A review on the advancement of epidemiology on hand foot-mouth diseases [J]. *Chin J Epidemiol(中华流行病学杂志)*, 2009, 30(9): 973-976.
- [5] SOLOMON T, LEWTHWAITE P, PERERA D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis and control of enterovirus 71 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11): 778-790.
- [6] CHEN S P, HUANG Y C, LI W C, et al. Comparison of clinical features between coxsackievirus A2 and enterovirus 71 during the enterovirus outbreak in Taiwan, 2008: a children's hospital experience [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2010, 43(2): 99-104.
- [7] CHAN L G, PARASHAR U D, LYE M S, et al. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group [J]. *Clin Infect Dis*, 2000, 31(3): 678-683.
- [8] ISHIMARU Y, NAKANO S, YAMAOKA K, et al. Outbreaks of hand, foot, and mouth disease by enterovirus 71. High incidence of complication disorders of central nervous system [J]. *Arch Dis Child*, 1980, 55(8): 583-588.
- [9] XIE Z P, SONG X, LI W Z, et al. Investigation on factors affecting purification of HAV with chloroform [J]. *Chin J Public Health(中国公共卫生)*, 2004, 20(3): 298-299.
- [10] DAI Z X, GENG X L, ZHOU J, et al. Study on purification of influenza virus in allantoic fluid of embryonic egg with PEG-6000 [J]. *Int J Lab Med(国际检验医学杂志)*, 2014, 35(1): 1-2, 5.
- [11] ZHANG B, TONG L, YI S, et al. Development of a method for large-scale purification of rotavirus [J]. *Chin J Biol(中国生物制品学杂志)*, 2012, 25(4): 480-482, 491.
- [12] HU X Y, ZHU B, WANG C B, et al. Rapid purification and identification of enterovirus 71 [J]. *Int J Lab Med(国际检验医学杂志)*, 2012, 33(8): 897-898, 905.
- [13] SMITH P K, KROHN R I, HERMANSON G T, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid [J]. *Anal Biochem*, 1985, 150(1): 76-85.
- [14] 中国药典. 三部[S]. 2010: 附录 38-39, 57-58, 60-61, 95-97, 16-19.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫 译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1989: 880, 888.
- [16] GUO Y F, CHENG A C, WANG M S, et al. Purification and electron microscopy observation after negative staining of duck plague virus [J]. *Chin Vet Sci(中国兽医科学)*, 2008, 38(5): 393-396.
- [17] SHAO J, MAO Q Y, YAO X, et al. The study of neutralizing antibody responses induced by new enterovirus 71 vaccines [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2013, 33(8): 1280-1284.
- [18] YAO X, MAO Q Y, LIANG Z L, et al. Progress in research on enterovirus 71 vaccine [J]. *Chin J Biol(中国生物制品学杂志)*, 2011, 24(2): 233-236.
- [19] 国家食品药品监督管理局. 预防用疫苗临床前研究技术指导原则[S]. 2010-04-12.

收稿日期: 2014-07-14