

MAPREC 技术检测 Sabin 株脊髓灰质炎病毒的基因突变率并评价疫苗神经毒力*

姬光^{1,2}, 平玲^{1,2}, 王多义^{1,2}, 沈武玲^{1,2}, 王磊^{1,2}, 寸怡娜^{1,2}, 孙明波^{1,2**}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所, 云南昆明 650118; 2. 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 云南昆明 650118)

[摘要] 目的: 采用 MAPREC 技术检测 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗 (sIPV) 生产收获液中病毒神经毒力决定位点的基因突变并评估疫苗神经毒力。方法: 采用 MAPREC 技术用 CY5 荧光标记引物替代同位素标记检测疫苗株 Sabin I、II 型及 Pfizer III 型疫苗病毒收获液及毒种的神经毒力决定位点的突变率, 并与猴体神经毒力比较; 采用 MAPREC 技术检测在不同培养温度、传代的次数、降低病毒接种的感染复数 (MOI) 时病毒各位点突变率变化。结果: MAPREC 方法检测显示, 本研究收集的病毒收获液的突变率符合猴体神经毒力检测结果; 当病毒培养条件发生改变导致突变率增加后, MAPREC 检测出的神经毒力决定位点的突变率也同样增加。结论: MAPREC 技术可用于检测 Sabin 株脊髓灰质炎病毒的基因突变率, 并评价疫苗的神经毒力。

[关键词] 脊髓灰质炎灭活疫苗; MAPREC 实验; 神经毒力决定位点; 突变率; 感染复数

[中图分类号] R373.2⁺² **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)10-1139-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.10.006

MAPREC Assay to Detect the Gene Mutation Rate of Sabin Inactivated Poliovirus Vaccine and Evaluate Neurovirulence

Ji Guang^{1,2}, Ping Ling^{1,2}, Wang Duoyi^{1,2}, Shen Wuling^{1,2}, Wang Lei^{1,2}, Cun Yina^{1,2}, Sun Mingbo^{1,2}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China; 2. Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, Yunnan, China)

[Abstract] Objective: Adopting the MAPREC to test mutation rate of Sabin IPV and the neurovirulence. **Methods:** The isotope labeling of MAPREC technique was replaced by CY5 fluorescent labeled primer, and detect Sabin vaccine strain type I, II, and Pfizer III vaccine virus harvest and nerve toxicity of the poison of decision locus mutation rate; to test whether the results consistent with the monkeys nerve toxicity test results. When the temperature of virus culture and the number of viral passages was increased, multiplicity of infection was decreased, the mutation of virus would be increased correspondingly. **Results:** The rate of mutation detected by the qualified vaccine MAPREC method was consistent with the results of monkeys nerve toxicity test. When the virus culture conditions changed and the mutation rate increased, the mutation rate of the nerve virulence localization sites detected by MAPREC also increased. **Conclusion:** MAPREC test can detect the gene mutation rate of SIPV, so as to determine the vaccine's neurovirulence.

[Key words] inactivated poliomyelitis vaccine; MAPREC test; neurovirulence determinate sites; mutation ratio; multiplicity of infection

*[基金项目] 中国医学科学院重大协调创新项目(2016-I2M-1-019), 云南省重大科技专项(2016ZF003)

**通信作者 E-mail: smb@imbcams.com.cn

网络出版时间: 2017-10-17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20171017.2231.021.html>

脊髓灰质炎是由脊髓灰质炎病毒 (poliovirus, PV) 引起的、可致患儿肢体肌肉出现弛缓性麻痹、并留下终身残疾、甚至导致患儿死亡的急性肠道传染病。PV 属细小核糖核酸病毒科 (picornaviridae) 肠道病毒属 (Enterovirus), 有 3 个不同的血清型别^[1]。毒粒表面的衣壳由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 蛋白组成^[2], 衣壳内包裹着单股正链 RNA 基因组, 大小约为 7.4 kb。为了预防脊髓灰质炎, Salk 和 Sabin 等^[3] 先后研制出脊髓灰质炎灭活疫苗 (inactivated poliovirus vaccine, IPV) 和脊髓灰质炎减毒活疫苗 (oral poliovirus vaccine, OPV)^[4], OPV 以其使用方便、价格低廉的优势得以在全球推广使用, 大大降低了脊髓灰质炎的发病率。Sabin IPV^[5] 是用脊髓灰质炎减毒株 (Sabin 株) 生产的 IPV, 一方面可以防止使用野毒株生产 IPV (wIPV) 的过程中由于野毒株的散布导致脊髓灰质炎的偶然爆发, 以确保生产安全; 另一方面一旦全球证实脊髓灰质炎被消灭时, OPV 生产厂家可以在生物安全等级相对较低的条件下生产 Sabin IPV, 对于发展中国家与不发达国家而言, 更加切实可行, 并易于推广和控制成本。Sabin IPV 的研发成功为彻底根除脊髓灰质炎发挥其重要作用^[6]。现已证实 Sabin 株 PV 在体内复制过程中易发生碱基突变, 即脊髓灰质炎疫苗衍生病毒 (vaccine-derived poliovirus, VDPV), 病毒基因的突变会导致病毒神经毒力的回复, 从而引起受种者或其接触者出现脊髓灰质炎疫苗相关麻痹 (vaccine-associated paralytic poliomyelitis, VAPP), 导致急性弛缓性麻痹^[7-8]。MAPREC (mutant analysis by PCR and restriction enzyme cleavage) 技术是利用聚合酶链反应 (PCR) 和限制性内切酶裂解技术分析突变的方法, 在待测毒力位点处通过 PCR 引物引入一个单一的限制性内切酶酶切位点, 该位点是非突变病毒的扩增片段上不存在或为其他酶切位点, 以此将突变病毒和无突变病毒区分开来。通过 PCR、限制性内切酶酶切和电泳分离得到相信酶切片段, 进行定量分析可计算出突变碱基的含量, 从而评价病毒的神经毒力^[9]。本研究采用 MAPREC 方法对疫苗生产中病毒收获液样品中脊髓灰质炎病毒中 I 型 Sabin 株的 480-A 位点和 525-C 位点、II 型 Sabin 株的 481-C 位点以及 III 型 Pfizer 株的 472-C 位点的突变进行检测, 探讨 MOI、培养温度和病毒传代次数等对突变率的影响^[10]。

1 材料与方法

1.1 细胞株、毒种、主要试剂及仪器

本研究使用的 Vero 细胞来源于生物所 Vero 工作细胞种子库, 经本研究所全面检定合格, 批号 201301, 代次 141。研究使用的 Sabin 株脊髓灰质炎病毒为本研究所制备的病毒工作种子, I 型 Sabin 株 SO + 3, II 型 Sabin 株 SO + 3, III 型 Pfizer 株 RSO3, 经检定均合格。主要试剂有 DMEM、M199、新生牛血清 (购自 Gibco 公司)、L-谷氨酰胺、胰蛋白酶 (购自西格玛奥德里奇上海贸易有限公司)、病毒基因组提取试剂盒 (QIAamp Viral RNA Kit)、2 × Pfu MasterMix (康为世纪)、内切酶 (*Mbo*I、*Dde*I、*Bsp*1286I 及 *Taq* DNA 聚合酶购自北京 NEB)、TEMED、19:1 的 40% 丙烯酰胺溶液 (购自北京酷来博科技有限公司)。主要仪器为 GE typhoon9410 多功能激光扫描成像系统。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 从工作细胞库取 Vero 细胞于 37 ~ 40 °C 注射用水中化冻, 37 °C 转瓶传代。细胞培养液以 85% MEM 为基础液, 按配置体积加入 10% 新生牛血清, 100 000 IU/L 硫酸卡那霉素、2% 谷氨酰胺及 3% 碳酸氢钠。

1.2.2 病毒培养 培养 Vero 细胞达到 80 000 万/L 后种毒, 病毒培养条件为: 温度 33.0 °C、溶氧 50%、pH 7.20、压力 0.02 bar、搅拌转速 50 r/min。为研究培养条件对病毒突变率的影响, 采用罗氏瓶进行病毒培养, 当 Vero 细胞长为致密单层后接种病毒, 分别以 MOI (multiplicity of infection) 感染系数 0.1、0.01 及 0.001 接种病毒工作种子, 以研究不同 MOI 对突变率的影响; 以 33.5、34.5 及 35.5 °C 培养病毒, 观察不同培养温度对突变率的影响; 将病毒连续传代至 4 代和 5 代, 以研究病毒传代对突变率的影响。病毒维持液以 93% M199 为基础液, 按配制体积加入 2% 谷氨酰胺, 1% 联抗和 4% 碳酸氢钠。

1.2.3 病毒 RNA 提取及第一链 cDNA 合成 使用 QIAamp Viral RNA Kit 试剂盒按照说明书提取 RNA, 分装后于 -80 °C 保存。取 RNA 5 μL 用 Protoscript IIFirst Stand cDNA Synthesis kit 试剂盒进行第一链 cDNA 的合成, 分装后于 -20 °C 保存。

1.2.4 引物的合成 I 型引物 pS-1/445, pA-1/526, 荧光标记引物 pS1-CY5, 5 端修饰, HPLC 纯化

I 型 100% 突变对照 ssDNA 为 CTCCGGCCCCCT-GAATGCGGCTAATCCAAACCTCTGAGCAGGTGGTC ACAAACCACTGATTGGCCTGTCTGTAACGCGCAAGC CCGGAGCGGAACCGATACTTTGGGTGTCCGT GTT, I 型 0% 突变对照 ssDNA 为 CTCCGGCCCCCTGAAT-GCGGCTAATCCAAACCTCGGGCAGGTGGTCAACAA ACCAGTGATTGGCCTGTCTGTAACGCGCAAGTCCGT GGCGGAACCGATACTTTGGGTGTCCGTGTT; II 型引物 pS-2/431, pA-2/483, 荧光标记引物 pS2-CY5,5 端修饰,HPLC 纯化 II 型 100% 突变对照 ssDNA 为 GCTACATAAG AGTCCTCCGG CCCCTGAATG CGCCTAATCC TAACCACGGA GCA GGCG-GTC GCGAACCAGT GACTGGCTTG TCGTA-ACGCG, II 型 0% 突变对照 ssDNA 为 GCTACATA-AG AGTCCTCCGG CCCCTGAATG CGGCTAATCC

TAACCACGGA ACA CGTGGTC GCGAACCAGT GACTGGCTTG TCGTAACGCG; III 型引物 pA-3/484, pS-3/470, 荧光标记引物 pA3-CY5,5 端修饰, HPLC 纯化 III 型 100% 突变对照 ssDNA 为 TGAGC-TACAT GAGAGTgCTC CGGCCCTGA ATGCGGCT-gA TeCTAACCAT GGAGCAGGCA GCTGCAACCC AGCAGCCAGC CTG, III 型 0% 突变对照 ssDNA 为 TGAGCTACAT GAGAGTCCTC CGGCCCTGA AT-GCGGCTAATTCCTAACCAT GGAGCAGGCA GCTG-CAACCC AGCAGCCAGC CTG。引物和 DNA 片段均合成 2 OD,合成后引物用 TE 缓冲液按要求分别稀释成 3 g/L 及 30 mg/L4 °C 保存,ssDNA 片段则稀释成 100 μmol/L,引物序列及浓度见表 1,存储浓度 -20 °C 保持。

表 1 引物合成
Tab.1 Primer synthesis tables

名称	序列	浓度(mg/L)
pS-1/445	5' CTC CGG CCC CTG AAT GCG GCT AAT CCA AAC CTC TG3'	3
pA-1/526	5' AAC ACG GAC ACC CAA AGT AGT CGG TTC CGC TCC GG3'	30
pS1-CY5	5' CTC CGG CCC CTG AAT GCG GCT AAT CCA AAC CTC TG3'	3
pS-2/431	5' GCT ACA TAA GAG TCC TCC GGC CCC TGA ATG CGC CT3'	3
pA-2/483	5' CGC GTT ACG ACA AGC CAG TCA CTG GTT CGC GAC CaC Gt3'	30
pS2-CY5	5' GCT ACA TAA GAG TCC TCC GGC CCC TGA ATG CGC CT3'	3
pA-3/484	5' CAG GCT GGC TGC TGG GTT GCA GCT GCC TGC3'	3
pS-3/470	5' TGA GCT ACA TGA GAG TGC TCC GGC CCC TGA ATG CGG CTG A3'	30
pA3-CY5	5' CAG GCT GGC TGC TGG GTT GCA GCT GCC TGC3'	3

1.2.5 不对称 PCR 扩增 用不等量的引物(1:10)进行 PCR,产生大量的单链 DNA,以 I、II、III 型 Sabin 株 PV、100% 突变、0% 突变对照进行 PCR。于 2 mL 离心管中分别加入 2 × PCR Master mix 756.0 μL,PA 与 PS 各 168.0 μL,最后加入去离子水 420.0 μL,配置成 1 512.0 μL PCR mix。标记 1~9 个 1.5 mL 离心管,1 号加入 PCR Mix 56.25 μL,2~8 号加入 PCR Mix 50 μL,9 号加入 PCR Mix 45 μL,去离子水 5 μL 做为对照;然后 1 号管再加入 cDNA 6.25 μL 混匀后取 12.5 μL 至 2 号管,2 号管混匀后取 12.5 μL 到 3 号管,如此类推,最后 8 号管取 12.5 μL 丢弃。倍比稀释后将 9 个离心管进行 PCR,反应条件为 94 °C 10 min,94 °C 30 s、55 °C 15 s、65 °C 30 min,40 循环;65 °C 延伸 3 min,4 °C 1 h。

1.2.6 PCR 产物的检测 先使用未被标记的引物混合物 1 μL 与 1 号 PCR 产物 5 μL 混合,72 °C

10 min 孵育;孵育后加入 sybr green II 及 6 × loading buffer 各 1 μL 电泳,对比 DNAladder 检测产物条带,要求 I、II 及 III 型的条带大小分别为 115、90 及 83 bp。

1.2.7 最优荧光标记引物浓度的确定 在一个 1.5 mL 离心管中分别加入标记引物 4 μL,2 × PCR Master mix 10 μL 去离子水 6 μL,配置成标记引物混合物。分别从 1~9 号离心管中取 PCR 产物 5 μL 及标记引物混合物 1 μL,于 72 °C 10 min 孵育后加入无色 6 × loadingbuffer 1 μL 进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,使用扫描仪检测,选择 cDNA 用量最少且没有引物二聚体的稀释度,进行下一步酶切消化。

1.2.8 限制性内切酶消化 取最优稀释度的 PCR 产物 6 μL 分别加入内切酶 1 μL 37 °C 过夜消化。(1) I 型 MAPREC PCR 产物片段全长 115 bp,内切酶 *Nc II* 和 *DdeI* 消化下两条片段大小分别为 82 bp

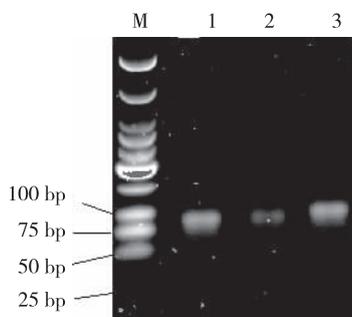
和 33 bp;(2) II 型 MAPREC PCR 产物片段全长 90 bp,内切酶 *Bsp* 1286I 消化下的片段大小为 53 bp;(3) III 型 MAPREC PCR 产物片段全长 83 bp,内切酶 *Mbo*I 消化下的片段大小为 43 bp。

1.2.9 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离及成像分析 于 15 mL 离心管中加入 40% 丙烯酰胺 1.5 mL(1:19) 和 1 × TBE 4.5 mL,混合均匀后加入 10% 过硫酸铵溶液 72 μL 和 TEMED 6 μL,再次混匀后立刻倒胶,配置成 10% 的聚丙烯酰胺凝胶。凝胶室温静置 1 h 后可进行电泳,每个样品加入无色 loading buffer 1 μL。电泳条件 300 V 恒压 18 min。将凝胶放入 typhoon9410 多功能激光扫描成像系统,选择适当的程序成像,并用 IQTL 分析软件进行分析。

2 结果

2.1 不对称 PCR 产物的鉴定

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, PV III 型 PV II 型片段大小为 83 bp 和 90 bp,在 75 bp ~ 100 bp, PV I 型片段大小为 115 bp 略高于 100 bp。可以确认 3 型的 PCR 产物无误,使用荧光标记引物则可以屏蔽杂带,提高酶切计算突变率的精确度。见图 1。



注: M 为低分子量 DNAladder, 1 为 III 型 PV DNA 片段, 2 为 II 型 PV DNA 片段, 3 为 I 型 PV DNA 片段

图 1 PV I、II 及 III 型 PCR 片段的鉴定

Fig. 1 Identification of PCR segment of PV

I, II, III

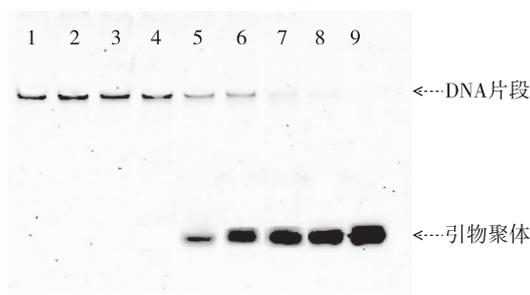
2.2 最优标记引物浓度的选择

梯度稀释后进行 10% 的聚丙烯酰胺电泳,上层条带为 DNA 片段,下层为多余引物形成的引物二聚体,第 4 泳道没有引物二聚体,为最优浓度。见图 2。

2.3 酶切效果的确认

样品与 100% 和 0% 的对照一起酶切后电泳,

I 型有 2 个酶切位点,切下的片段为 2 条, II 型与 III 型只有 1 个酶切位点,酶切后片段仅为 1 条。没有突变的位点的 0% 突变对照无法切开,而完全突变的 100% 突变对照完全切开,可以证明 3 型样品的突变位点都能完全被内切酶消化。见图 3。



注: 1~8 分别标记引物的稀释度为 1:1、1:5、1:25、1:125、1:625、1:3 125、1:15 625 及 1:78 125, 9 为对照

图 2 最优的标记引物浓度的选择

Fig. 2 Selection of optimum marker primer concentration

2.4 各样品突变率

通过 MAPREC 技术测得 3 代工作种子及两个生产样品的神经毒力决定位点的突变率,各型 3 代种子的突变率相对较低,符合正常的允许突变范围;两个生产样品的突变率相对工作种子有所增加,且都在正常范围内;符合 WHO 规定标准。见表 3。改变病毒培养条件后,MAPREC 实验测得各型病毒收获液突变率的百分比随着 MOI 的降低,温度和代次的增加不断升高,见图 4。

表 3 工作种子及两个生产样品的突变率

Tab. 3 Detected mutation rate of working seeds and two production samples

病毒类型	突变位点	突变率(%)		
		3 代	生产样品 1	生产样品 2
I 型	480 + 525	0.82	1.10	1.15
II 型	481	0.43	0.46	0.49
II 型	472	0.13	0.32	0.36

3 讨论

Sabin 减毒株的神经毒力相关位点有很多, PV I 型的 480、525、935、2438、2759、2879、6203、7441 等位点, PV II 型的 481、2908、2909 位点, PV III 型的 472、2034、2493 位点, 以上位点都与神经毒力有关, 其中 PVI 型 480-A 位点和 525-C 位点, PV II 型

的 481-C 位点以及 PV III 型的 472-C 位点, 这些位点的变异对神经毒力的影响尤其突出, 所以, 本实

验选择这 4 个位点作为检测位点对 PV 疫苗株的神经毒力进行分析。



注: A、B、C 分别为 PV I、II 及 III 型, 1、2 为 100% 突变对照, 3、4 为 0% 突变对照, 5、6 为样品 1, 7、8 为样品 2, 9、10 为样品 3, 1、3、5、7 及 9 未酶切, 2、4、6、8 及 10 已酶切, D1 为 *NciI* 酶酶切片段, D2 为 *DdeI* 酶酶切片段, D3 为 *BspI286* 酶酶切片段, D4 为 *MboI* 酶酶切片段

图 3 PV I、II 及 III 型 DNA 酶切片段

Fig. 3 Type I, II and III PV DNA restriction fragment

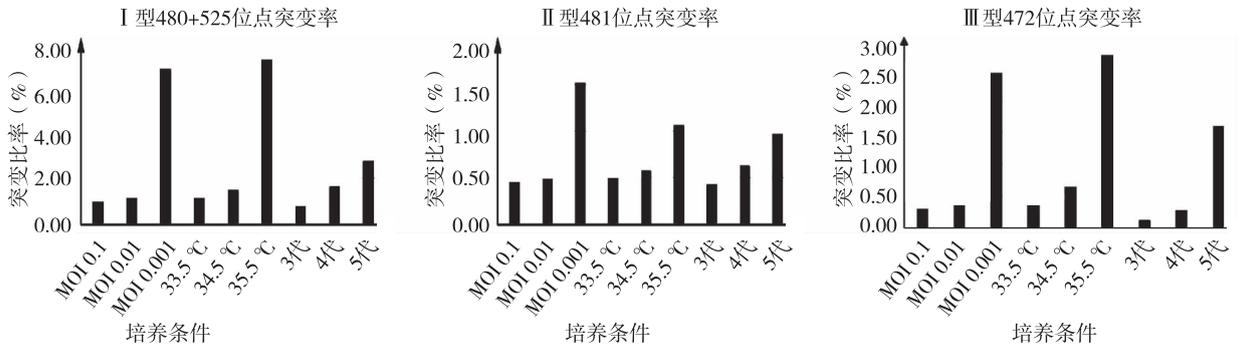


图 4 PV I ~ III 型部分突变位点在不同 MOI、代次及温度时的突变率

Fig. 4 PV I ~ III locus mutation rate at different MOI, temperature and generation

本实验在逆转录完成后进行了不对称 PCR, 用不等量的一对引物即低浓度的限制性引物和高浓度的非限制性引物进行 PCR, 在最初的十到十五个循环过程中产生的主要是双链 DNA, 当第浓度的引物用完后, 高浓度的限制性引物就会引导 PCR 产生大量的单链 DNA, 之后再引入荧光标记过的低浓度引物与单链 DNA 结合, 最终形成大量的带有荧光标记探针的双链 DNA。在电泳后对荧光的激发, 只有后面形成的带有荧光标记的 MAPREC 条带可见, 消除了其他杂带 DNA 的影响, 与其他核酸染料相比提高了特异性。

MAPREC 试验在国外实验室应用较多大多都是使用放射性同位素标记^[11], 很多疫苗研发机构或生产商多不具备相关试验条件, 且试验费用较高。Bella Bidzhieva 等^[12]通过实验发现近红外染料的荧光标记在 MAPREC 实验中具有很高分辨

率, 在他们的研究基础上本实验选择近红外荧光染料花青染料 CY5 对引物进行标记。通过实验发现用 CY5 进行标记后, 检测出的神经毒力位点的突变率可以精确到 0.01%。核酸测序技术和荧光定量 PCR 技术^[13-14]虽然也可以对神经毒力进行检测, 但只有 MAPREC 技术和 TgmNVT 在脊髓灰质炎病毒突变检测的建议为: I 型 480 和 525 两个位点突变率之和小于 2%; II 型 481 位点突变率小于 1.5%; III 型 472 位点突变率小于 1%^[15]。通过上述 MAPREC 实验检测出工作种子与生产样品的神经毒力决定位点的突变率进行检测, 其结果符合世界卫生组织 TRS 规定的突变允许范围, 证明了在标准的生产工艺条件下通过神经毒力要求的低突变率可以被本实验改进过的 MAPREC 方法检

测出来。Sabin 脊髓灰质炎病毒为低温传代获得的减毒株,对温度敏感,提高培养温度病毒的神经毒力会相应增加,增加病毒的传代次数,降低病毒接种 MOI,病毒复制次数将增加,神经毒力也会升高,而这突变率升高的变化也能够通过本实验检测出来。可见,无论神经毒力决定位点突变率的高低,都能被 MAPREC 实验检测出来。

虽然 Sabin-IPV 是灭活疫苗,但从生物安全角度考虑,防止其回复突变后造成一定的风险仍有必要进行相关检测^[16]。上述实验证明了,MAPREC 方法可以快速,简单,直观的检测出疫苗生产中病毒收获液的神经毒力决定位点的突变率,同时也可对疫苗批生产的一致性与安全性进行评价。

4 参考文献

- [1] THOMPSON KM, DUINTJER TEBBENS RJ. The differential impact of oral poliovirus vaccine formulation choices on serotype-specific population immunity to poliovirus transmission[J]. *Bmc Infectious Diseases*, 2015(1):1-12.
- [2] 刘开民. 脊髓灰质炎病毒抗原部位和疫苗[J]. 国外医学预防诊断治疗用生物制品分册, 1985(1):37-39.
- [3] SHIMIZU H. Development and introduction of inactivated poliovirus vaccines derived from Sabin strains in Japan[J]. *Vaccine*, 2016(16):1975-1985.
- [4] MELNICK JL, 姜述德. 口服脊髓灰质炎活疫苗[J]. 国外医学预防诊断治疗用生物制品分册, 1985(4):157-159.
- [5] HAMIDI A, BAKKER WA. Innovative IPV from attenuated Sabin poliovirus or newly designed alternative seed strains[J]. *Pharmaceutical patent analyst*, 2012(5):589-599.
- [6] 车艳春, 李琦涵. 脊髓灰质炎灭活疫苗的研究进展与临床应用[J]. *中国新药杂志*, 2015(12):1364-1368.
- [7] 徐海明. 脊髓灰质炎病毒 Sabin 株减毒的遗传学基础的研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 1999(3):85-88.
- [8] 陈明文, 李文. 疫苗衍生脊髓灰质炎病毒相关病例的研究进展[J]. *疾病监测*, 2014(3):243-246.
- [9] LU Z, DOUTHITT MP, TAFFS RE, et al. Quantitative aspects of the mutant analysis by PCR and restriction enzyme cleavage(MAPREC)[J]. *PCR methods and applications*, 1993(3):176-180.
- [10] DUNN G, O'BRIEN J, HEATH A, et al. Report of the WHO collaborativestudy to establish a new International Standard and three new International Reference Preparations for the MAPREC test of poliovirus Type 1 (Sabin)[J]. *World Health Organization*, 2009(09):2013
- [11] 马昌燧. 放射性同位素标记核酸探针的方法[J]. *核科学与工程*, 1994(3):280-283.
- [12] BELLA B, MAJID L, KONSTANTIN C. MAPREC assay for quantitation of mutants in a recombinant flavivirus vaccine strain using near-infrared fluorescent dyes[J]. *Journal of Virological Methods*, 2011(1):14-19.
- [13] 王潇潇, 刘宇, 温智恒, 等. 荧光定量 PCR 方法在脊髓灰质炎病毒突变分析中的应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014(12):1579-1587, 1594.
- [14] 邓燕. Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗毒种的遗传稳定性研究及 Sabin 株病毒深度测序方法的探索[J]. *北京协和医学院*, 2016(4):342-347.
- [15] WORLD HEALTH O. WHO expert committee on biological standardization sixty-fifth report[J]. *World Health Organization technical report series*, 2015(993):261-262.
- [16] 吴照, 温宁, 罗会明, 等. 环境监测在疫苗衍生脊髓灰质炎病毒事件调查处理中的应用[J]. *中国疫苗和免疫*, 2012(1):67-69.

(2017-07-18 收稿, 2017-09-03 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵毅