

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.01.02

应用高效体积排阻色谱法测定市场抽检口蹄疫灭活疫苗中的抗原(146S)含量

徐 媛¹, 邹兴启¹, 刘晓东², 李 翠¹, 朱元源¹, 李 阳²,
万建青¹, 何天慈¹, 徐 璐¹, 张乾义¹, 王 琴¹, 郑金来³, 赵启祖^{1*}

(1. 中国兽药药品监察所, 北京 100081; 2. 北京市动物疫病预防控制中心, 北京 102629; 3. 北京标驰泽惠生物科技有限公司, 北京 102600)

[收稿日期] 2017-11-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 01-0007-06 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 应用高效体积排阻色谱法对 5 批市场抽检口蹄疫灭活疫苗中有效抗原(146S)含量进行检测, 并使用口蹄疫 O 型、A 型和亚洲 1 型抗原测试卡对 5 批疫苗中的抗原进行鉴别。结果显示高效体积排阻色谱法测定 146S 标准品浓度与峰面积线性关系良好, 5 批疫苗均检测到 146S 特征吸收峰($R^2=0.9937, n=7$), 经计算得到灭活疫苗中有效抗原含量分别为 2.05、3.73、2.03、4.87、3.41 $\mu\text{g/mL}$; 使用抗原测试卡鉴别了 5 批疫苗中的抗原类型。结果表明, 高效体积排阻色谱法简便、高效, 准确度较高, 有望在口蹄疫灭活疫苗的质量控制中发挥重要作用。

[关键词] 高效体积排阻色谱; 口蹄疫; 灭活疫苗; 146S

Using High Performance Size Exclusion Chromatography to Determine Antigen (146S) Content in Foot-and-mouth Disease Inactivated Vaccine of Quality Supervision

XU Yuan¹, ZOU Xing-qi¹, LIU Xiao-dong², LI Cui¹, ZHU Yuan-yuan¹, LI Yang²,

WAN Jian-qing¹, HE Tian-ci¹, XU Lu¹, ZHANG Qian-yi¹, WANG Qin¹, ZHENG Jin-lai³, ZHAO Qi-zu^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Beijing Animal Disease Control Center, Beijing 102629, China;

3. Beijing Biaochizehui Biological Technology Co Ltd, Beijing 102600, China)

Corresponding author: Zhao Qi-zu, E-mail: zhaoqizu@163.com

Abstract: The effective antigen (146S) in 5 batches of foot-and-mouth disease inactivated vaccine of quality supervision was detected by high performance size exclusion chromatography and the antigen serotype was identified by foot-and-mouth disease antigen test cards of O, A and Asia 1 serotype. The results showed a good linearity between peak area and concentration of 146S standard ($R^2=0.9937, n=7$). There were 146S absorption peaks in all 5 vaccines, and calculated the 146S concentration were 2.05, 3.73, 2.03, 4.87 and 3.41 $\mu\text{g/mL}$,

基金项目: 国家重点研发计划资助(2016YFD0501500); 公益性行业(农业)科研专项经费资助(201303046)

作者简介: 徐 媛, 硕士, 从事兽用生物制品标准物质研制。

通讯作者: 赵启祖。E-mail: zhaoqizu@163.com

respectively. The foot-and-mouth disease antigen test cards were used to identify the antigen serotype. The results indicated high performance size exclusion chromatography is simple, efficient and accurate in detecting the concentration of 146S, which could shed light on the quality control of foot-and-mouth disease inactivated vaccine.

Key words: high performance size exclusion chromatography (HPSEC); foot-and-mouth disease (FMD); inactivated vaccine; 146S

口蹄疫 (foot-and-mouth disease, FMD) 是传染性最强的家畜疫病之一,我国目前对口蹄疫采取以灭活疫苗免疫为主的防控策略^[1-2]。疫苗对动物的保护效果主要取决于疫苗毒株与流行毒株的匹配度和疫苗中的抗原含量^[3]。目前国内口蹄疫灭活疫苗生产企业多以 O/MYA98 谱系毒株、O/GX/09-7 株、OHM/02 株、O/HB/HK/99 株、AF/72 株、AKT-Ⅲ株和 Asia1/HN/2006 株等毒株生产单价或多价灭活疫苗。《中国兽药典》^[4]规定口蹄疫灭活疫苗效力评估标准是本动物免疫攻毒试验,必须使用抗体阴性的本动物,存在试验成本高、生物安全风险、实验动物福利及环保问题^[5]。疫苗中的有效抗原,即完整病毒颗粒 (146S) 的含量,是口蹄疫灭活疫苗质量的关键,是关乎疫苗效力的重要因素。因此,口蹄疫灭活疫苗 146S 含量检测技术的研究成为近几年关注的重点。目前,大型疫苗生产厂家和国际口蹄疫疫苗储备库通用的测定 146S 含量的方法是利用蔗糖或氯化铯密度梯度分析方法,通过测定各个级份的 OD_{259 nm} 值,计算出 146S 浓度,该方法的弊端在于操作较复杂,耗时长,每次检测样品数量有限,结果重复性受较多因素影响,因此尚未标准化^[6-7]。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 因灵敏度高、特异性强等优点,被广泛关注,但因其口蹄疫抗原检测中的通用性不理想而受到局限^[7-9]。高效体积排阻色谱技术 (High Performance Size Exclusion Chromatography, HPSEC),是一种以凝胶色谱柱的分子筛机制,根据待测组分的分子大小进行分离的一种液相色谱技术,样品进入色谱柱后,

各组分从大到小一次被洗脱,该技术常用于生物大分子的分离纯化^[10-11]。Marcelo^[12]和杨延丽^[13]等,均对该方法应用于测定 146S 含量检测进行研究,认为该技术在疫苗生产工艺研究和质量控制中均具有应用前景。Vajda^[14]等应用该技术分离三株流感病毒,并通过红细胞凝聚活性测定进行验证。王宁^[15]等成功利用该法对病毒细胞培养液中的戊型肝炎类病毒颗粒进行实时定量。本试验应用 HPSEC,以外标法对市场抽检的 5 批口蹄疫灭活疫苗中的 146S 含量进行测定,并结合口蹄疫抗原测试卡对抗原类型进行鉴别。

1 材料与方法

1.1 仪器 L-2000 型高效液相色谱仪配紫外检测器 (HITACHI), L203 型电子天平 (梅特勒-托利多), himac CF16RX 型离心机 (HITACHI), 纯水机 (MiliQ), 生物安全柜 (NUAIRE), PHSJ-4F 型 pH 计 (雷磁), RH basic KT/C 型磁力搅拌器, 单道移液器 (eppendorf), 高压灭菌锅。

1.2 试剂与材料 无水硫酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、正戊醇、氯化钠 (国药集团 分析纯), 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH8.0 含 0.15M NaCl) (PBS), 聚乙二醇 (PEG) 6000 (国药集团 优级纯), 206 油佐剂, 口蹄疫抗原测试卡 (北京三联百哈生物技术有限公司)。

146S (O 型) 标准品由中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室提供。5 批疫苗信息见表 1。

表 1 口蹄疫灭活疫苗信息

Tab 1 Information on FMD inactivated vaccine			
编号	疫苗名称	PD ₅₀ /头份	
1	猪口蹄疫 O 型灭活疫苗(O/MYA98/XJ/2010 株+ O/GX/09-7 株)	13.59	13.59
2	猪口蹄疫 O 型灭活疫苗(O/MYA98/XJ/2010 株+ O/GX/09-7 株)	11.84	11.84
3	口蹄疫 O 型、亚洲 I 型二价灭活疫苗(OS 株+JSL 株)	11.84	9.00
4	口蹄疫 O 型、亚洲 I 型二价灭活疫苗(OS 株+JSL 株)	11.84	10.81
5	口蹄疫 A 型灭活疫苗(AF/72 株)	10.05	

1.3 色谱条件 色谱柱:TSKgel G4000SWXL (7.8 mm×30 cm) 色谱柱(TOSOH)、TSKgel guard-column SWXL (6.0 mm×4 cm) 色谱柱保护柱(TOSOH);流动相:pH7.2 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液,含 0.1 mol/L Na₂SO₄;紫外检测器检测波长:259 nm;流速:0.6 mL/min;进样量:100 μL。

1.4 线性回归方程 用 50 mM PBS 将浓度为 47.4 μg/mL146S 标准品进行 1.5 倍系列稀释,共配制 7 个稀释梯度。HPSEC 进样检测,以 146S 浓度为横坐标,以相应峰面积为纵坐标,绘制标准曲线并进行线性回归。

1.5 疫苗破乳 使用正戊醇作为破乳试剂,按疫苗体积与破乳试剂体积比 9:1 充分振摇混合,4 ℃静置分层后,3000 rpm,4 ℃,离心 5 min,小心吸取底层水相用于检测。

2 结 果

2.1 线性回归方程 146S 标准品溶液线性回归方程 $Y = 65907X - 203584$, $R^2 = 0.9937$,表明 146S 在 4.2~47.4 μg/mL 浓度范围内,与峰面积线性关系良好,见图 1,色谱图见图 2。

2.2 疫苗 146S 含量 将疫苗破乳水相检测结果积分得到的 146S 峰面积代入标准曲线,即得 146S 在破乳水相中的浓度。疫苗生产一般以 206 油佐剂与水相质量 1:1 配苗,水相密度约为 1.0 kg/L,佐剂密度约为 0.85 kg/L,则灭活疫苗中水相体积积分率理论值为 0.46,故根据破乳后水相 146S 浓度计算灭活疫苗中 146S 浓度时,乘以体积系数 0.46 进行计算,即得灭活疫苗中 146S 浓度,结果见表 2,色谱图见图 3。

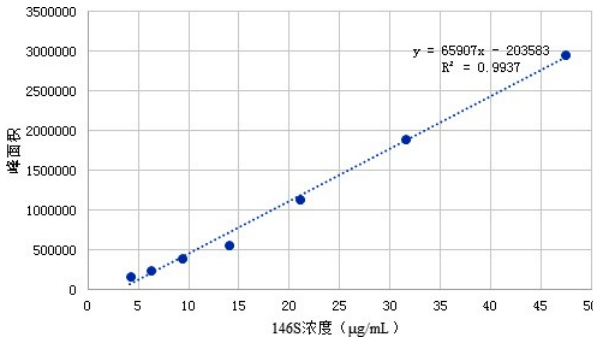


图 1 146S 标准曲线

Fig 1 Standard curve of 146S

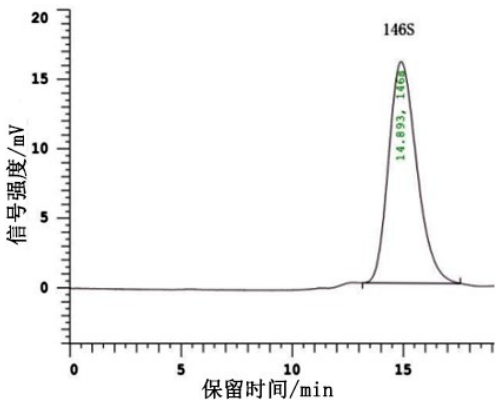


图 2 146S 标准品色谱图

Fig 2 Chromatogram of 146S standard

表 2 疫苗 HPSEC 测定结果

Tab 2 Determination results of FMD inactivated vaccine		
编号	破乳水相 146S 浓度/(μg · mL ⁻¹)	灭活疫苗 146S 浓度/(μg · mL ⁻¹)
1	4.46	2.05
2	8.11	3.73
3	4.41	2.03
4	10.59	4.87
5	7.41	3.41

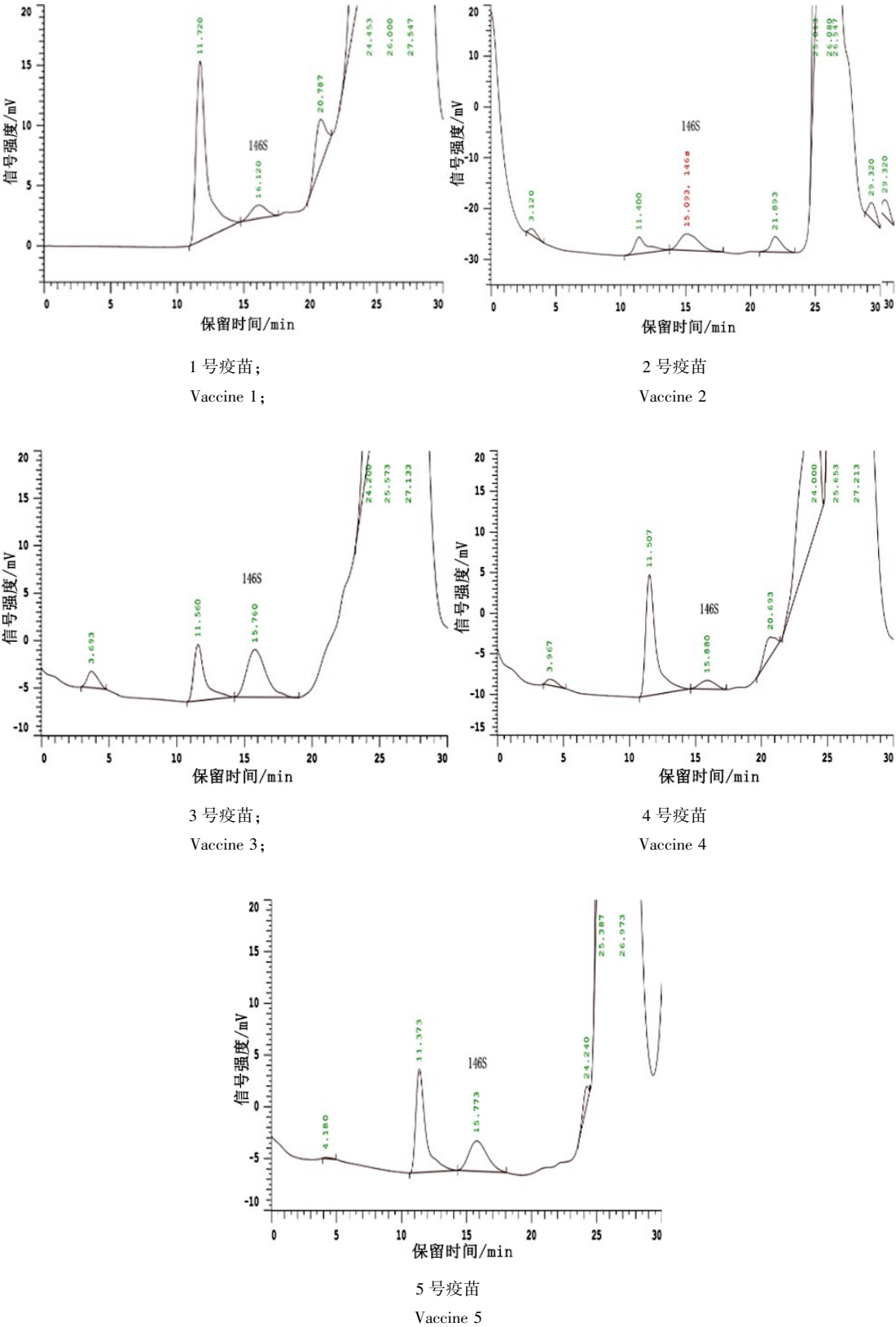


图 3 疫苗 HPSEC 色谱图

Fig 3 Chromatograms of FMD inactivated vaccine

2.3 抗原测试 使用口蹄疫 O 型、A 型和亚洲 1 型抗原测试卡对 5 批疫苗抗原进行鉴定,将 90 μ L 破乳水相滴加在样品孔内,20 min 后观察,结果显

示所有测试卡均出现 C 线,检测有效,且 T 区显示的结果均与疫苗中抗原血清型相对应。



图 4 抗原测试卡检测结果

Fig 4 Antigen test results of FMD inactivated vaccine

3 讨 论

应用 HPSEC 测定口蹄疫灭活疫苗产品 146S 含量,有时会遇到分离度不理想或吸收峰不明显的情况,而在方法学研究中,通过在实验室 PEG 沉淀处理浓缩灭活抗原液,配制疫苗,破乳后 HPSEC 测定水相,可以得到分离度理想的 146S 的特征吸收峰。分析认为,除了与疫苗中 146S 的浓度较低有关外,疫苗产品的生产工艺、保存运输条件对 146S 有重要的影响。不同工艺生产的疫苗中杂蛋白的含量不同,导致疫苗纯度不同,并且 146S 自身的二十面体结构非常不稳定,在温度高于 56 $^{\circ}$ C 或 pH 低于 6 的条件下很快发生裂解^[16-17],因此,疫苗中可能存在 146S 的聚集体或降解产物。以上因素给 146S 含量测定带来难度。针对目前出现的问题,将结合抗原测试卡、SDS-PAGE、电镜等技术对影响色谱结果的杂质峰进行深入分析,以优化疫苗的前处理方法。对因 146S 含量较低检测色谱峰面积不明显或色谱峰受杂质干扰严重的疫苗,尝试对破乳水相进行 PEG 沉淀,浓缩后再次检测,发现可有效提高 146S 峰面积,但由于该操作会造成 146S 的损失,需要计算损失率进行定量。目前,口蹄疫商品苗多为多价疫苗,该方法测定疫苗中 146S 总量,无法对抗原血清型加以区分,因此本实验结合口蹄疫抗原测试卡进行鉴定。目前已有口蹄疫 O 型抗原不同谱系毒株的抗原测试卡,可进一步对疫苗中使

用的抗原毒株进行鉴定。应用体积排阻色谱技术测定口蹄疫抗原含量相比蔗糖密度梯度分析等方法更加快捷、高效、准确^[13]。随着检测方法的优化以及口蹄疫灭活疫苗生产工艺水平的不断提高,使抗原的纯度和稳定性进一步提升,该技术将有望成为口蹄疫灭活疫苗生产过程中质量控制和疫苗终产品质量评价的重要技术方法。

参考文献:

[1] 崔辰,黄立纲,李晶,等.猪 O 型口蹄疫病毒抗体化学发光酶联免疫检测方法的建立[J].生物工程学报,2016,32(11):1519-1530.
Cui C, Huang L G, Li J, *et al.* Establishment of chemiluminescent enzyme immunoassay for detecting antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O in swine[J]. Chin J Biotech, 2016, 32(11): 1519-1530.

[2] 张元沛,李彦芹,王玲玲,等.口蹄疫疫苗研究进展[J].中国畜牧兽医,2013,40(7):171-173.
Zang Y P, Li Y Q, Wang L L, *et al.* Research Progress on foot-and-mouth disease vaccine [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2013, 40(7): 171-173.

[3] Rweyemamu M M, Unehara O, Giorgi W, *et al.* Effect of formaldehyde and binary ethyleneimine (BEI) on the integrity of foot and mouth disease virus capsid[J]. Revue Scientifique Et Technique, 1989, 8(3):747-764.

[4] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典 2015 年版[S]. Chinese Veterinary Pharmacopeia Commission. Veterinary phar-

- macopoeia of the People's Republic of China, 2015 edition[S].
- [5] 赵启祖, 谢庆阁. 家畜口蹄疫疫苗简介[J]. 中国兽医科学, 2000, 30(6): 43-44.
- Zhao Q Z, Xie Q G. Introduction of foot-and-mouth disease vaccine[J]. Chinese Journal of Veterinary and Technology, 2000, 6(30): 43-44.
- [6] Chinsangaram J, Grubman M J, Koster M, *et al.* Foot-and-mouth disease virus vaccine: EP, EP 1389043 B1[P]. 2009.
- [7] 董金杰, 王凡, 陈苗苗, 等. 口蹄疫灭活疫苗 146S 含量检测方法概述[J]. 山东畜牧兽医, 2017, 10(38): 78-79.
- Dong J J, Wang F, Chen M M, *et al.* Overview of detection methods of 146S content in foot-and-mouth disease inactivated vaccine[J]. Shangdong Journal of Animal Science and Veterinary, 2017, 10(38): 78-79.
- [8] Le C T, Grambsch P M, Giebink G S. Quality control and the identification of vaccine responders using ELISA-derived antibody data[J]. Stat Med, 2003, 22: 2935-2942.
- [9] 李乐, 苗海生, 信爱国, 等. ELISA 用于口蹄疫病毒 146S 抗原快速定量的研究. 中国预防兽医学报, 2008, 4(30): 314-317.
- Li L, Miao H S, Xin A G, *et al.* Rapid quantification of FMDV 146S antigen by ELISA method[J]. Chin J Pre Vet Med, 2008, 4(30): 314-317.
- [10] 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 化学工业出版社, 2005.
- Yu S L. High performance liquid chromatography method and its application[M]. Chemical Industry Press, 2005
- [11] 张祥民. 色谱-质谱技术在生物分析研究中的最新进展[J]. 色谱, 2017, 35(1): 138-140.
- Zhang X M. Recent advances in the application of chromatography mass spectrometry in biological analysis[J]. Chin J Chrom, 2017, 35(1): 138-140.
- [12] Spitteler M A, Fernández I, Schabes E, *et al.* Foot and mouth disease (FMD) virus: quantification of whole virus particles during the vaccine manufacturing process by size exclusion chromatography.[J]. Vaccine, 2011, 29(41): 7182.
- [13] Yang Y, Li H, Li Z, *et al.* Size-exclusion HPLC provides a simple, rapid, and versatile alternative method for quality control of vaccines by characterizing the assembly of antigens[J]. Vaccine, 2015, 33(9): 1143-50.
- [14] Vajda J, Weber D, Brekel D, *et al.* Size distribution analysis of influenza virus particles using size exclusion chromatography.[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1465: 117-25.
- [15] 王宁, 王青波, 李静, 等. 分子尺寸排阻高效液相色谱法检测戊型肝炎类病毒颗粒[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(10): 1220-1223.
- Wang N, Wang Q B, Li J, *et al.* Test for Hepatitis E Virus-like Particles by Size-exclusion High Performance Liquid Chromatography [J]. Chin J Biologicals, 2011, 24(10): 1220-1223.
- [16] Doel T R, Baccarini P J. Thermal stability of foot-and-mouth disease virus[J]. Archives of Virology, 1981, 70(1): 21-32.
- [17] Doel T R, Chong W K T. Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus[J]. Archives of Virology, 1982, 73(2): 185-191.

(编辑:陈希)