

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.02.04

高效体积排阻色谱检测口蹄疫灭活疫苗中 146S 抗原含量的疫苗破乳方法比较

徐 媛,王 兆,朱元源,李 翠,邹兴启,朱利敏,万建青,
王 琴,郎洪武,夏应菊,徐 璐,张乾义,赵启祖*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2019-11-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 02-0022-07 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为提高高效体积排阻色谱检测口蹄疫灭活疫苗 146S 抗原含量的准确性、适用性和操作性,分别采用正戊醇、正丁醇和三氯甲烷对 9 批口蹄疫灭活疫苗进行破乳处理,对三种方法的破乳后水相得率和 146S 抗原含量的色谱检测结果进行比较。结果表明,破乳后水相得率分别为:正戊醇 38%~49%,正丁醇 42%~44%,三氯甲烷 50%;9 批疫苗的色谱结果均检测到 146S 特征峰,146S 含量在 0.7~12.5 $\mu\text{g/mL}$,3 次测定的相对标准偏差最大值为 4.0%,9 批疫苗不同前处理方法的检测结果均值具有统计学意义,三氯甲烷组与正戊醇组数据一致性强,正丁醇组测定值偏低。使用三氯甲烷对疫苗进行破乳,不仅操作简便快速,而且破乳水相得率稳定,是最优的破乳方法。实验进一步优化了口蹄疫灭活疫苗 146S 抗原含量检测的高效体积排阻色谱法,为该方法的科学应用提供了数据支撑。

[关键词] 口蹄疫;灭活疫苗;146S;高效体积排阻色谱;破乳

Comparison of Different Demulsification Methods for Quantification of 146S Antigen in Inactivated Foot – and – Mouth Disease Virus Vaccine by High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC)

XU Yuan, WANG Zhao, ZHU Yuan – yuan, LI Cui, ZOU Xing – qi, ZHU Li – min, WAN Jian – qing,
WANG Qin, LANG Hong – wu, XIA Ying – ju, XU Lu, ZHANG Qian – yi, ZHAO Qi – zu*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081; China)

Corresponding author: ZHAO Qi – zu, E – mail: zhaoqizu@163.com

基金项目:国家重点研发计划资助(2018YFC1200501)

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

Abstract: This study is aimed at improving the accuracy, applicability and operability of quantification of 146S antigens in foot – and – mouth disease (FMD) inactivated vaccine by high performance size exclusion chromatography (HPSEC). Nine batches of FMD inactivated vaccines were pretreated with *n* – amyl alcohol, *n* – butanol and trichloromethane, respectively. Extraction rate of water phase after demulsification and chromatographic detection results of 146S antigens were compared. The results of the extraction rates of aqueous phase were shown as following: *n* – amyl alcohol 38% ~ 49%, *n* – butanol 42% ~ 44%, trichloromethane 50%. The peak of 146S antigen was detected in chromatographic results within all 9 batches of vaccines, with the content ranging from 0.7 $\mu\text{g/mL}$ to 12.5 $\mu\text{g/mL}$. The maximum relative standard deviation of the three measurements of each pretreatment was 4.0%. The mean value of the detection results of the 9 batches of vaccines with different pretreatment methods was statistically significant. The trichloromethane group showed a strong consistency with the *n* – amyl alcohol group, while the *n* – butanol group had a low level of the 146S antigen content. Using trichloromethane to demulsify the vaccine is simple, rapid and water phase production is stable so that it is the best demulsification method. This study further optimized the HPSEC on quantification of 146S antigens in FMD inactivated vaccines, which also provided data support for the scientific application of the method.

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

口蹄疫 (foot – and – mouth disease, FMD) 是一种由口蹄疫病毒 (foot – and – mouth disease virus, FMDV) 引起的可以对家畜造成非常严重经济损失的疫病,我国目前通过注射灭活疫苗来控制该病的流行。口蹄疫病毒完整病毒粒子在蔗糖密度梯度中的相对沉降系数为 146S, 分子量为 8.08×10^6 u, 在酸性、碱性或一定温度条件下降解为 12S 和 5S 粒子, 失去免疫原性^[1]。因此口蹄疫灭活疫苗中 146S 抗原的含量直接关系到疫苗的免疫效果。已有研究表明, 高效体积排阻色谱技术 (High Performance Size Exclusion Chromatography, HPSEC) 在口蹄疫灭活疫苗生产过程中, 可应用于病毒颗粒的检测^[2-4]。在前期的研究中, 我们已经建立了口蹄疫灭活疫苗中 146S 抗原含量的 HPSEC 检测法^[5], 并开展优化研究, 进一步提高了方法的准确性和可靠性^[6]。该方法使用正戊醇对双相油乳剂口蹄疫灭活疫苗进行破乳, 用核酸酶处理破乳得到的水相以去除干扰, 最后通过 HPSEC 检测水相中的 146S 抗原。由于色谱检测的是疫苗破乳后的水相部分, 因此破乳的可操作性和有效性, 以及对保持破乳水相中 146S 抗原的稳定性都是至关重要的。前期试验

中使用正戊醇对疫苗进行破乳, 取得了良好的效果, 但仍存在不同生产企业的疫苗破乳水相体积存在差异, 操作方法较为复杂等问题。本研究分别使用正戊醇、正丁醇、三氯甲烷对 9 批 2019 年监督抽检的口蹄疫灭活疫苗样品进行破乳, 通过比较破乳后水相体积和 146S 抗原 HPSEC 检测结果, 评价最优的破乳方法, 进一步提高 146S 抗原检测结果的准确性和方法的适用性。

1 材料与方法

1.1 仪器 2010A 型高效液相色谱仪 (岛津公司), L203 型电子天平 (梅特勒 – 托利多), CF16X 型离心机 (HITACHI), 纯水机 (MiliQ), 生物安全柜 (NUAIRE), PHSJ – 4F 型 pH 计 (雷磁), 单道移液器 (eppendorf), TS – 1 摇床 (Qilinbeier)。

1.2 试剂与材料 无水硫酸钠、磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、正戊醇、正丁醇、三氯甲烷、氯化钠, 国药集团 (分析纯); Benzonase 核酸酶, Sigma 公司; 口蹄疫灭活病毒颗粒 (146S 抗原) 标准品由中国科学院过程工程研究所制备; 9 批口蹄疫灭活疫苗为中国兽医药品监察所 2019 年监督检验留样。

1.3 色谱条件 色谱柱:TSKgel G4000SW_{XL}(7.8 mm×30 cm)色谱柱(TOSOH);流动相:称取磷酸氢二钠 15 g,磷酸二氢钠 1.25 g,无水硫酸钠 14.2 g,加水定容至 1 L;紫外检测器检测波长:259 nm;流速:0.6 mL/min;进样量:100 μL。

1.4 疫苗前处理 每批疫苗采用不同的有机试剂处理,分别重复 3 份。正戊醇和正丁醇前处理操作方法:取 9 mL 疫苗,1 mL 正戊醇或正丁醇,加入 15 mL 离心管,上下剧烈振荡离心管 5 min 使疫苗破裂,4 ℃ 静置 1 h 使分层,将离心管置于冰上,缓慢吸取上层有机相弃去,缓慢吸取底层水相 200 μL 转入 1.5 mL 离心管,加入 0.5 μL Benzonase 核酸酶,吹打混匀,置摇床振摇,室温反应 1 h。三氯甲烷前处理操作方法:取 6 mL 疫苗和 6 mL 三氯甲烷加入 15 mL 离心管,上下剧烈振荡离心管 5 min 使疫苗破裂,4 ℃ 4000 r/min 离心 10 min,缓慢吸取上层水相 200 μL 转入 1.5 mL 离心管,加入 0.5 μL Benzonase 核酸酶,吹打混匀,置摇床振摇,室温反应 1 h。

2 结果与分析

2.1 线性回归方程 口蹄疫灭活病毒颗粒(146S

抗原)标准品建立线性回归方程为 $y = 64409x - 80431$, $R^2 = 0.9981$,线性关系良好(图 1)。

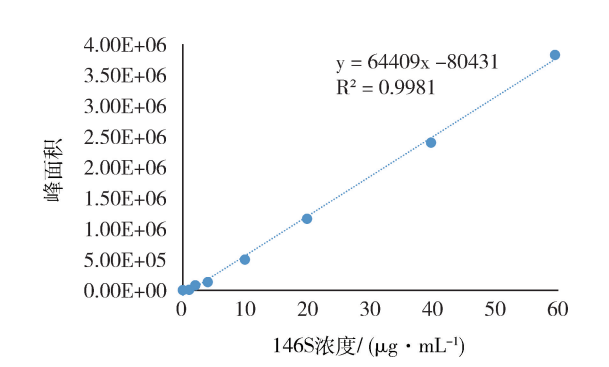


图 1 口蹄疫灭活病毒颗粒 146S 标准曲线
Fig 1 Standard curve of FMDV inactivated 146S antigen

2.2 破乳水相得率 使用正戊醇、正丁醇分别破乳疫苗静置分层后水相在底层,使用三氯甲烷破乳疫苗离心后水相在顶层,以 1 号疫苗为例分层结果见图 2;9 批疫苗的破乳水相得率见表 1。

2.3 色谱结果 9 批疫苗的色谱结果以三氯甲烷前处理后单次检测色谱图结果为例,见图 3。

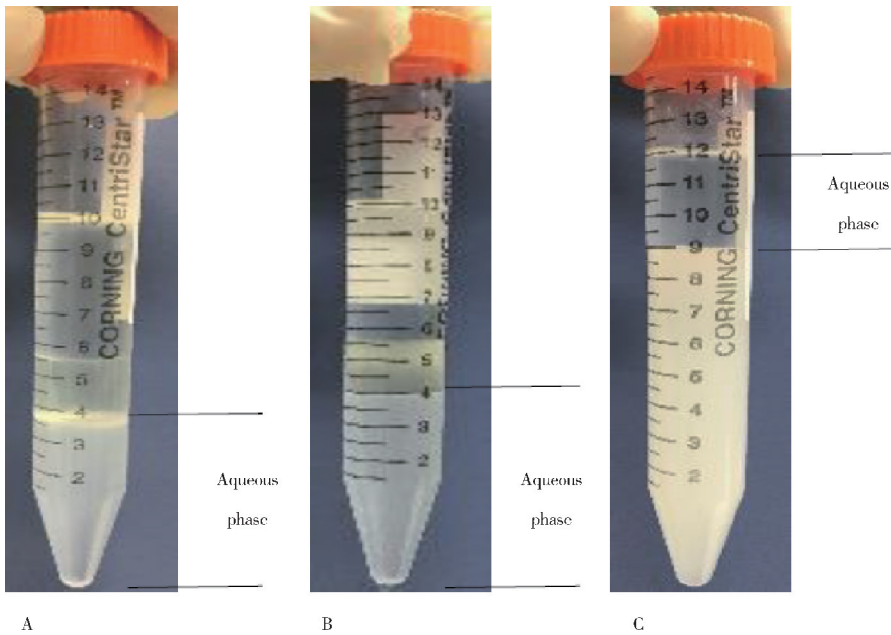


图 2 疫苗采用不同试剂破乳分层结果
Fig 2 Stratification of vaccine with demulsification by different reagents

表 1 9 批疫苗三种前处理方法的破乳水相得率

Tab 1 Demulsification aqueous phase yield of 9 batches of vaccines by 3 pretreatment methods respectively				
疫苗编号	破乳试剂	疫苗体积/mL	破乳水相体积/mL	水相得率/%
1	正戊醇	9.0	3.5	39
	正丁醇	9.0	4.0	44
	三氯甲烷	6.0	3.0	50
2	正戊醇	9.0	3.5	39
	正丁醇	9.0	4.0	44
	三氯甲烷	6.0	3.0	50
3	正戊醇	9.0	3.5	39
	正丁醇	9.0	4.0	44
	三氯甲烷	6.0	3.0	50
4	正戊醇	9.0	3.4	38
	正丁醇	9.0	4.0	44
	三氯甲烷	6.0	3.0	50
5	正戊醇	9.0	3.9	43
	正丁醇	9.0	3.8	42
	三氯甲烷	6.0	3.0	50
6	正戊醇	9.0	4.4	49
	正丁醇	9.0	3.9	43
	三氯甲烷	6.0	3.0	50
7	正戊醇	9.0	3.9	43
	正丁醇	9.0	4.0	44
	三氯甲烷	6.0	3.0	50
8	正戊醇	9.0	3.9	43
	正丁醇	9.0	4.0	44
	三氯甲烷	6.0	3.0	50
9	正戊醇	9.0	3.5	39
	正丁醇	9.0	4.0	44
	三氯甲烷	6.0	3.0	50

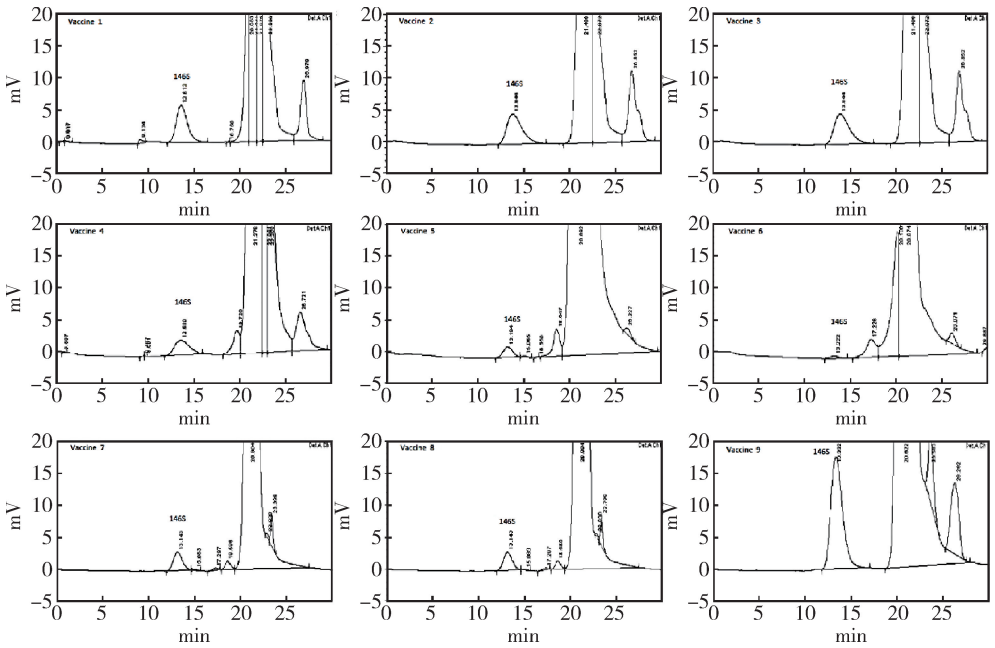


图 3 三氯甲烷前处理 9 批疫苗单次 HPSEC 检测色谱图

Fig 3 HPSEC chromatograms of 9 batches vaccines pretreated by trichloromethane

2.4 146S 抗原含量检测结果 将 146S 峰面积代 量,再乘以水相得率计算得疫苗中 146S 抗原含量
入线性回归方程计算得破乳水相中 146S 抗原含 (表 2)。

表 2 9 批疫苗 HPSEC 检测结果
Tab 2 HPSEC test results of 9 batches of vaccines

疫苗编号	破乳试剂	三次检测结果/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			平均值/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%
1	正戊醇	4.68	4.62	4.63	4.6	0.7
	正丁醇	4.50	4.56	4.54	4.5	0.7
	三氯甲烷	4.49	4.46	4.41	4.5	0.9
2	正戊醇	4.76	4.95	4.89	4.9	2.0
	正丁醇	4.27	4.51	4.51	4.4	3.1
	三氯甲烷	4.77	4.87	4.89	4.8	1.3
3	正戊醇	5.60	5.58	5.62	5.6	0.4
	正丁醇	5.38	5.00	5.34	5.2	4.0
	三氯甲烷	5.79	5.65	5.69	5.7	1.3
4	正戊醇	2.85	2.84	2.86	2.8	0.4
	正丁醇	2.49	2.62	2.60	2.6	2.7
	三氯甲烷	2.65	2.68	2.67	27	0.1
5	正戊醇	1.30	1.40	1.39	1.4	3.9
	正丁醇	1.49	1.46	1.41	1.5	2.7
	三氯甲烷	1.46	1.52	1.52	1.5	2.3
6	正戊醇	0.82	0.83	0.83	0.8	0.7
	正丁醇	0.67	0.65	0.66	0.7	1.4
	三氯甲烷	0.82	0.81	0.82	0.8	0.7
7	正戊醇	2.14	2.17	2.12	2.1	1.2
	正丁醇	1.66	1.68	1.67	1.7	0.6
	三氯甲烷	2.28	2.12	2.15	2.2	3.9
8	正戊醇	4.45	4.41	4.54	4.5	1.5
	正丁醇	4.05	4.02	4.03	4.0	0.4
	三氯甲烷	4.52	4.47	4.50	4.5	0.6
9	正戊醇	11.61	11.58	11.77	11.7	0.9
	正丁醇	10.26	10.26	10.34	10.3	0.4
	三氯甲烷	12.66	12.72	12.67	12.7	0.3

2.5 统计学分析结果 分别对三种不同前处理方法检测 9 批疫苗的均值应用 SAS9.2 软件作统计学分析,结果表明具有统计学意义(表 3);单因素方差分析表明,三种方法的检测结果无显著性差异(表 4)。

表 3 SAS9.2 软件分析结果
Tab 3 SAS9.2 software analysis results

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
method	2	8	7.16	0.0165

表 4 单因素方差分析结果

Tab 4 Anova for a single factor design quantitative data with repeated test						
差异源	SS	df	MS	F	P – value	F crit
组间	1.240741	2	0.62037037	0.059477	0.942396	3.402826
组内	250.3311	24	10.430463	/	/	/
总计	251.5719	26	/	/	/	/

3 讨论与结论

在前期的实验室研究阶段,将口蹄疫抗原浓缩液用 PBS 稀释成不同浓度后,与 ISA206 油佐剂等体积混合,使用正戊醇对口蹄疫疫苗进行破乳,破乳水相得率为 46%^[5,7]。但在疫苗样品的检测中却发现,即使各生产企业均以等体积水相和有机相配苗,但并非每批疫苗都能达到 46% 的水相得率,因此检测过程中需要同时测量水相体积。另一方面,使用正戊醇破乳后,由于水相在底层,导致取样过程极易混入有机相。以上两方面因素不仅增加了操作难度,而且易导致油相进入色谱系统,影响检测结果的准确性。针对以上问题,我们对破乳方法进行了研究,通过比较正戊醇、正丁醇、三氯甲烷这三种破乳试剂在 9 批疫苗产品的 146S 含量检测中的破乳水相得率、检测结果的差异,以及可操作性,进行破乳方法的比较和优化。结果表明,使用三氯甲烷对 9 批疫苗破乳后得到的水相体积最大,并且数值稳定,9 批疫苗水相得率均为 50%;另外两种有机试剂的水相提取率则相对较低,且数值不稳定。应用 SAS9.2 软件对三组 146S 检测结果的分析表明,三组数据具有统计学意义;单因素方差分析表明,三组数据无显著性差异,其中三氯甲烷组和正戊醇组的结果一致性强,正丁醇组数据普遍偏低。使用三氯甲烷进行破乳时,可以通过离心处理加快分层速度,并且破乳后水相在上层,便于取样,降低了操作难度。正戊醇和正丁醇的使用量低于三氯甲烷,对相同体积的疫苗进行破乳处理,正戊醇和正丁醇仅需要疫苗体积的 1/9,使用三氯甲烷则需要与疫苗体积相等才能达到有效破乳。但

HPSEC 检测具有样品用量少的优点,由于三氯甲烷前处理的破乳水相得率稳定,则不需要对样品进行大量破乳用以测量水相体积,从而避免三氯甲烷的大量使用。

综上所述,在应用 HPSEC 对口蹄疫灭活疫苗中的 146S 抗原含量进行检测时,使用三氯甲烷对疫苗进行破乳,不仅检测结果准确,而且操作简便快速,是更为理想的破乳试剂。本实验通过对破乳方法的研究,改进了口蹄疫灭活疫苗中 146S 抗原含量的 HPSEC 检测方法。应用 HPSEC 检测口蹄疫灭活疫苗中的 146S 抗原含量,不仅符合动物实验 3R 原则,而且能够解决当前面临的检验用阴性动物供应困难、检验成本过高等问题。该方法有望成为效力检验的动物实验替代方法,为提高我国口蹄疫灭活疫苗的研制水平和疫病的防控提供有力技术支持。

参考文献:

[1] 刘湘涛,张强,郭建宏. 口蹄疫[M]. 北京:中国农业出版社,2015.
Liu X T, Zhang Q, Guo J H. Foot – and – mouth disease[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2015.

[2] 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 – 7187.

[3] Yang Y L, Li H, Li Z J, *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: 1143 – 1150.

[4] Yang Y L, Zhao Q Z, Li Z J, *et al.* Stabilization study of

inactivated foot and mouth disease virus vaccine by size – exclusion HPLC and differential scanning calorimetry [J]. Vaccine, 2017, 35: 2413 – 2419.

- [5] 徐 嫒, 邹兴启, 李翠, 等. 应用体积排阻色谱法测定口蹄疫灭活疫苗中的 146S 抗原含量[J]. 生物工程学报, 2018, 34(5): 676 – 684.

Xu Y, Zou X Q, Li C, *et al.* Using size – exclusion chromatography to quantify the 146S antigen in inactivated foot – and – mouth disease vaccine[J]. Chin J Biotech, 2018, 34(5): 676 – 684.

- [6] 宋艳民, 杨延丽, 苏志国, 等. 高效体积排阻色谱法定量检测口蹄疫疫苗中 146S 的疫苗预处理方法[J]. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1441 – 1452.

Song Y M, Yang Y L, Su Z G, *et al.* Vaccine pretreatment for

quantification of 146S antigen in foot – and – mouth disease vaccines by high performance size exclusion chromatography [J].

Chin J Biotech, 2019, 35(8): 1441 – 1452.

- [7] 徐 嫒, 邹兴启, 刘晓东, 等. 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[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(1): 7 – 12.

Xu Y, Zou XQ, Liu X D, *et al.* Using high performance size exclusion chromatography to determine antigen (146S) content in Foot – and – mouth disease inactivated vaccine of quality supervision[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(1): 7 – 12.

(编 辑: 李文平)