

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.06.05

三种方法检测口蹄疫 146S 抗原含量及 抗原稳定性的比较研究

杨生海^{1,2}, 柴 静², 郭建荣², 王富强², 刘西兰², 董金杰², 张 军², 翟国元², 张 勇^{1*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 中农威特生物科技股份有限公司, 兰州 730046)

[收稿日期] 2020-03-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 06-0033-09 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为比较三种口蹄疫 146S 抗原含量检测方法, 分别用蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 Cary 100 紫外分光光度计定量法、蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法及高效液相体积排阻色谱法三种检测方法, 对口蹄疫灭活抗原中的 146S 含量进行检测, 对三种检测方法的数据进行统计分析。将口蹄疫 A 型抗原和 O 型抗原各一株分别 4 ℃ 放置 12 个月以及反复多次冷冻处理; 口蹄疫抗原用全能核酸酶处理, 然后用蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法检测处理前后的 146S 抗原含量变化。结果显示, 三种检测方法的检测数值相关性极显著, 呈正相关性; 4 ℃ 放置 12 个月后的抗原含量没有变化, 而反复多次冷冻处理后的抗原含量降解非常多; 全能核酸酶处理后的抗原杂蛋白含量少。研究表明, 基于临床需求, 蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法更适口蹄疫抗原检测; 口蹄疫抗原适合于 4 ℃ 保存; 全能核酸酶能有效去除杂蛋白干扰, 提高色谱纯化效率。

[关键词] 蔗糖密度梯度离心; 口蹄疫 146S; 安捷伦 Cary 100 紫外分光光度计; 安捷伦 1260 液相色谱仪; 高效体积排阻色谱; 全能核酸酶

A Comparative Study on the Antigen Content and Antigen Stability of 146S in FMD Detected by Three Methods

YANG Sheng-hai^{1,2}, CHAI Jing², GUO Jian-rong², WANG Fu-qiang², LIU Xi-lan²,
DONG Jin-jie², ZHANG Jun², ZHAI Guo-yuan², ZHANG Yong^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. China Agricultural Vet. Bio. Science and Technology CO., LTD., Lanzhou 730046, China)

Corresponding author: ZHANG Yong, E-mail: zhychy@163.com

Abstract: The purpose of this study is to compare and analyze three methods for the detection of 146S antigen content of FMD. The 146S content of FMD inactivated antigen was detected by sucrose density gradient

作者简介: 杨生海, 副研究员, 博士研究生, 从事口蹄疫疫苗检验工作。

通讯作者: 张 勇。E-mail: zhychy@163.com

centrifugation combined with Agilent Cary 100 ultraviolet spectrophotometer, sucrose density gradient centrifugation combined with Agilent 1260 liquid chromatography and high performance liquid volume exclusion chromatography, and the data of the three detection methods were analyzed statistically. One strain of FMD A antigen and one strain of FMD O antigen were placed at 4 °C for 12 months and repeatedly frozen. FMD antigen was treated with Benzonase nuclease. The concentration of 146S antigen before and after treatment was determined by sucrose density gradient centrifugation and Agilent 1260 liquid chromatography. The results showed that the correlation among the three methods was significant and positive. The content of FMD antigen did not change after 12 months at 4 °C. However, the antigen content degraded a lot after repeated freezing treatment. The content of heteroprotein in FMD antigen is less after treated with Benzonase nuclease. This study shows that sucrose density gradient centrifugation combined with Agilent 1260 liquid chromatograph quantitative method is more suitable for FMD antigen detection based on clinical needs. FMD antigens are more suitable for preservation at 4 °C. Benzonase nuclease can effectively remove the interference of heteroprotein and improve the efficiency of chromatographic purification.

Key words: sucrose density gradient centrifugation; foot – and – mouth disease 146S; Agilent Cary 100 ultraviolet spectrophotometer; Agilent 1260 liquid chromatography; high performance size exclusion chromatography; Benzonase nuclease

口蹄疫 (Foot – and – Mouth Disease, FMD) 是一种感染牛、羊和猪等偶蹄动物的、具有高度传染性的动物疫病^[1]。口蹄疫病毒 (Foot – and – Mouth Disease Virus, FMDV) 培养物中可以分离出不同密度的粒子,主要有四种:完全病毒粒子 (146S)、空衣壳 (75S)、12S 蛋白质亚单位 (12S)、病毒感染相关成分 (VIA 抗原 4.5S)^[2]。

疫苗对动物的保护效果主要取决于两个方面,一是疫苗毒株与流行毒株的相似程度,二是疫苗中抗原的含量^[3]。146S 抗原含量是决定口蹄疫疫苗质量和免疫效力的关键因素。146S 抗原含量检测方法主要有蔗糖密度梯度离心结合紫外分光光度计定量法、蔗糖密度梯度离心结合液相色谱仪定量法及高效液相体积排阻色谱法三种,目前国内各口蹄疫疫苗生产厂家主要采用蔗糖密度梯度离心法测定 146S 抗原含量并对生产环节进行控制^[4-5]。1974 年,荷兰口蹄疫学家 Barteling 采用蔗糖密度梯度离心的方法定量 FMDV 146S 抗原,能检测出病毒粒子的质量大小^[6],基本原理是 146S 抗原在特定条件下分布在特定浓度的介质中,于 259 nm 处产生最大紫外吸收峰 (用 OD_{259nm} 表示), OD_{259nm} 与

146S 浓度成正比。蔗糖密度梯度离心法即将口蹄疫病毒样品置于蔗糖密度梯度中离心,在离心力的作用下,样品中的病毒粒子将沉降到相应的密度梯度层内,经紫外分光光度计 259 nm 检测时有最高吸收峰,而在其他级份层没有吸收峰。收集 146S 吸收峰级份,用紫外分光光度计进行检测,即可对 146S 含量进行定量^[7]。蔗糖密度梯度离心结合液相色谱仪定量法是董金杰等在紫外分光光度计定量法的基础上演变而来,是将灭活的 FMDV 经超滤浓缩后分别加于 15% ~ 45% 的蔗糖梯度顶部,35000 r/min 超速离心 3 h 后,样品中病毒粒子沉降到相应的密度梯度层内,再用安捷伦 1260 液相色谱仪定量法检测各区带在 259 nm 处的吸光值,绘制吸收峰图谱,并计算峰的面积从而得到 146S 抗原含量^[8]。高效液相体积排阻色谱法由 Spittele 等 2011 年首次建立,中国科学院过程工程研究所率先在国内开发该方法并验证,目前与中国兽药品监察所联合负责该方法的改进和应用^[9]。该方法利用高效液相色谱技术的凝胶色谱柱分子筛机制,使样品进入色谱柱后,不同组分按其分子大小进入相应孔内,大分子因不能进入颗粒内部,在色

谱柱中滞留时间短,先于小分子被流动相洗脱至柱外,通过这种分子筛效应,各组分从大到小依次被洗脱,并进入检测器,由数据处理系统处理色谱信号,即可计算出 146S 抗原的含量。高效体积排阻色谱技术常用于生物大分子的分离和纯化^[10]。为筛选出一种最适合于临床需求的口蹄疫 146S 抗原含量检测方法,对这三种测量方法作一相关性试验,并对不同条件下口蹄疫抗原的稳定性特性及去除检测过程中的杂质干扰进行了研究。

1 材料

1.1 仪器设备 冷冻高速离心机(Thermo 公司)、超速冷冻离心机(Beckman 公司)、超声破碎仪(Bandelin 公司)、安捷伦 1260 高效液相色谱仪、安捷伦 Cary100 紫外分光光度计、全自动密度梯度制备仪(Biocomp 公司)、TOSHO 公司 TSKgel G4000SWXL 色谱柱(基质为亲水修饰的硅胶基质高效液相体积排阻色谱柱)、纯水机、色谱瓶等。

1.2 试剂与溶液 0.01 mmol/L PBS(pH7.6)、正戊醇(分析纯)、三氯乙烯(分析纯)、聚乙二醇(PEG) 6000(优级纯)、无 RNA 酶蔗糖、10% Nonidet P-40(V/V)、无水硫酸钠、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、氯化钠(分析纯)、甲醇(色谱纯)、Benzonase 核酸酶(上海源叶生物科技有限公司)。

1.3 口蹄疫抗原 口蹄疫抗原样品 7 份;口蹄疫抗原 1 号株、口蹄疫抗原 2 号株、口蹄疫抗原 3 号株。

2 方法

2.1 蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 Cary100 紫外分光光度计定量法 取 6 支 12 mL 离心管,每支离心管分别加入 2 mL 的 15% 蔗糖溶液、2.5 mL 的 25% 蔗糖溶液、2.5 mL 的 35% 蔗糖溶液、2.5 mL 的 45% 蔗糖溶液,观察不同浓度之间界限清晰可见,然后置于 4 ℃ 过夜(10~20 h)以形成连续梯度,或用梯度制备仪制备连续梯度,1 支作为对照。取口蹄疫灭活抗原 20 mL 于 50 mL 离心管,加入 5 mL 三氯乙烯(抗原与三氯乙烯比例为 4:1),用力振荡 5 min,置冷冻高速离心机,4 ℃ 3000 g 离心 15 min,

离心后,准确取上清液 10 mL,加入 0.7 g PEG6000,4 ℃ 连续搅拌 4 h,或 40% PEG6000 加入 2.12 mL,混匀,再静置过夜。将前一天 PEG 沉淀抗原液,移入离心管 4 ℃ 10000 g 离心 1 h 以沉淀病毒抗原。弃上清液,于离心管内加入 1 mL 含 1% NP40 的 PBS(pH7.6)浸润沉淀后超声,取 1.0 mL 样品加入装有蔗糖梯度的离心管,10 ℃ 35000 r/min 离心 2.5 h。将安捷伦 Cary100 紫外分光光度计检测波长调为 259 nm,开始测定并记录数据,直至一管样品收集完毕。

样品管 OD 值减去空白对照管相对应每个点的 OD 值,再将每一个样品数据,采用 EXCEL 绘制点线图,对照管为相对比较平滑的直线;测定样品管的数据在 35%~45% 区域有一个明显的峰区;含量越高峰值越高,确定峰区的点后计算 146S 含量。

2.2 蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法 取 6 支 12 mL 离心管,每支离心管分别加入 2 mL 的 15% 蔗糖溶液、2.5 mL 的 25% 蔗糖溶液、2.5 mL 的 35% 蔗糖溶液、2.5 mL 的 45% 蔗糖溶液,观察不同浓度之间界限清晰可见,然后置于 4 ℃ 过夜(10~20 h)以形成连续梯度,或用梯度制备仪制备连续梯度,样品 10000 r/min 离心 5 min,取 1.5 mL 样品加入装有蔗糖梯度的离心管,10 ℃ 35000 r/min 离心 3 h。

将安捷伦 1260 液相色谱仪流速调为 1 mL/min,在 259 nm 波长下测定紫外吸光光度值,电脑自动记录检测曲线,根据检测曲线对 146S 抗原峰手动积分,结合 1 μg 口蹄疫 146S 抗原的峰面积计算所得每毫升抗原的 146S 含量。

2.3 高效液相体积排阻色谱法 配制 50 mmol/L 磷酸缓冲液,含 0.1 mol/L Na₂SO₄,测定 pH 值应在 7.2~7.4,使用孔径 0.2 μm 滤膜,过滤脱气处理后使用。高效液相色谱仪检测波长调为 259 nm,进样量 100 μL,流速 0.6 mL/min,采集时间 30 min。先用纯水冲洗仪器管路,再更换流动相冲洗,待流动相充满仪器管路,接入色谱柱平衡,观察基线平稳后开始检测。用稀释液将 146S 标准品系列稀释,HPLC 进样检测。采用系统自动积分 146S 在 259

nm 下的峰面积,以峰面积为横坐标,相应 146S 浓度为纵坐标,在 EXCEL 程序中绘制过原点的线性趋势线作为标准曲线。

检测样品色谱图中 146S 峰保留时间应与标准品色谱图中 146S 峰的保留时间一致,积分得检测样品 146S 峰面积,将峰面积代入标准曲线,即得 146S 抗原含量。

2.4 三种检测方法的重复性验证 采用蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 Cary100 紫外分光光度计定量法重复检测口蹄疫抗原 1 号株样品 20 次,计算检验结果的相对偏差;采用蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法重复检测口蹄疫抗原 2 号株样品 50 次,计算检验结果的相对偏差;采用高效液相体积排阻色谱法重复检测口蹄疫抗原 3 号株样品 20 次,计算检验结果的相对偏差。

2.5 口蹄疫抗原稳定性实验 蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法重复性好,简便易行,所以将口蹄疫 A 型抗原和 O 型抗原各 1 株 4 ℃ 放置 12 个月后,每个月采用蔗糖密度梯度离心

结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法检测抗原含量的变化,将此 2 株抗原反复多次冷冻融化后检测抗原含量的变化。

2.6 利用全能核酸酶去除杂蛋白干扰的实验 取 2 支口蹄疫抗原,各吸取 2 mL,加入全能核酸酶 (Benzonase 酶) 5 μL,室温下 200 r/min 快速摇匀 1 h 后,3000 r/min 4 ℃ 离心 6 min。按照 2.2 蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法检测 2 支口蹄疫抗原及 Benzonase 核酸酶处理过的抗原含量,根据色谱图分析全能核酸酶是否能有效去除杂蛋白干扰,提高色谱纯化效率。

3 结果与分析

3.1 紫外分光光度计定量法及液相色谱仪定量法检测结果 结果见表 1。对表 1 中的两组数据作单因素方差分析, F 值为 1.659, F_{crit} 值为 4.0069, $P-value$ 值为 0.2028, F 小于 F_{crit} , $P-value$ 高于 0.05,表示两组数据无差异,证明安捷伦 Cary100 紫外分光光度计定量法和安捷伦 1260 液相色谱仪定量法两种方法检测结果相关性显著。

表 1 安捷伦 Cary100 紫外分光光度计定量法和安捷伦 1260 液相色谱仪定量法的检测数值
Tab 1 Detection values of Agilent Cary 100 UV spectrophotometer quantitative method and Agilent 1260 liquid chromatography quantitative method

样品编号	146S 含量/(μg · mL ⁻¹)		样品编号	146S 含量/(μg · mL ⁻¹)	
	安捷伦 Cary 100 紫外 分光光度计定量法	安捷伦 1260 液相 色谱仪定量法		安捷伦 Cary 100 紫外 分光光度计定量法	安捷伦 1260 液相 色谱仪定量法
1	6.266	4.493	16	30.722	19.272
2	3.372	1.075	17	4.37	1.14
3	4.989	3.422	18	35.10	20.73
4	6.685	5.441	19	8.59	6.66
5	11.444	8.095	20	52.16	43.78
6	6.069	4.452	21	7.130	6.017
7	4.00	1.958	22	6.972	6.012
8	8.477	4.930	23	6.695	6.619
9	21.978	16.098	24	6.822	6.702
10	12.777	11.278	25	4.173	2.450
11	17.137	11.358	26	5.763	3.611
12	7.525	3.698	27	18.462	17.501
13	6.925	3.526	28	18.616	17.464
14	6.477	3.548	29	23.844	16.850
15	5.827	3.863	30	6.029	3.451

3.2 紫外分光光度计定量法和液相色谱仪定量法相关性 图 1 结果显示,安捷伦 Cary100 紫外分光光度计定量法和安捷伦 1260 液相色谱仪定量法检测数值相关系数 $R^2=0.9456$,直线回归方程为: $y=0.771x-0.546$,两种方法的检测数值呈正线性相关,并且相关性极显著。

3.3 液相色谱仪定量法和高效液相体积排阻色谱法相关性 对表 2 中的两组数据作单因素方差分析, F 值为 0.0026, F_{crit} 值为 4.1709, $P-value$ 值为 0.9594, F 小于 F_{crit} , $P-value$ 高于 0.05,表示两组数据无差异,证明安捷伦 1260 液相色谱仪定量法和高效液相体积排阻色谱法两种方法检测结果相关性显著。

表 2 安捷伦 1260 液相色谱仪定量法和高效液相体积排阻色谱法的检测数值

Tab 2 Detection values of Agilent 1260 liquid chromatography quantitative method and high performance volume exclusion chromatography

样品编号	146S 含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		样品编号	146S 含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	安捷伦 1260 液相色谱仪定量法	高效液相体积排阻色谱法		安捷伦 1260 液相色谱仪定量法	高效液相体积排阻色谱法
1	25.145	30.13	9	24.602	20.22
2	21.83	20.08	10	25.217	23.19
3	5.787	7.54	11	20.165	19.13
4	6.153	7.14	12	15.619	15.31
5	6.823	7.13	13	5.944	7.61
6	33.605	35.87	14	24.779	23.16
7	37.017	38.52	15	23.928	21.04
8	22.255	24.54	16	15.14	16.21

图 2 结果显示,安捷伦 1260 液相色谱仪定量法和高效液相体积排阻色谱法检测数值相关系数 $R^2=0.9416$,直线回归方程为: $y=0.9656x+0.5053$,两种方法的检测数值呈正线性相关,并且相关性极显著。

3.4 紫外分光光度计定量法重复性试验结果 表 3 结果显示,口蹄疫抗原 1 号株样品检测 20 次,相对偏差大于 10% 的样品数为 6 个,相对偏差在 5% ~ 10% 之间的样品数为 8 个,相对偏差在 1% ~ 5% 之间的样品数为 5 个,相对偏差在 1% 以下的样品数为 1 个,用统计学方法计算此组检测数值的标准偏差 σ 值为 2.1073,证明此检测方法重复性一般。

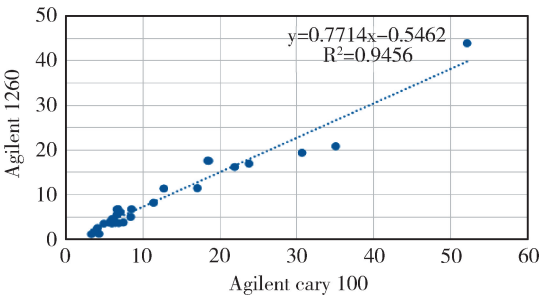


图 1 安捷伦 Cary 100 紫外分光光度计定量法和安捷伦 1260 液相色谱仪定量法检测数值的相关性

Fig 1 Correlation between quantitative method of Agilent Cary 100 UV spectrophotometer and quantitative method of Agilent 1260 liquid chromatography

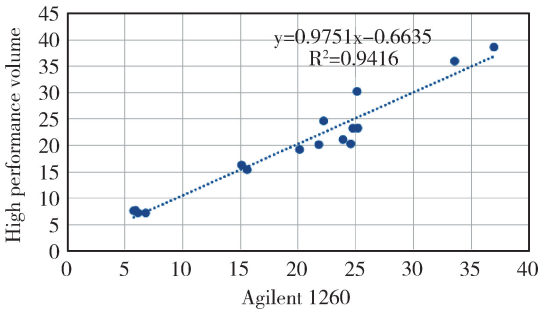


图 2 安捷伦 1260 液相色谱仪定量法和高效液相体积排阻色谱法检测数值的相关性

Fig 2 Correlation between quantitative method of Agilent 1260 liquid chromatograph and detection value of high performance volume exclusion chromatography

表 3 紫外分光光度计定量法检测口蹄疫抗原 1 号株样品 20 次的 146S 含量及相对偏差

Tab 3 146S content and relative deviation of FMD antigen strain 1 detected 20 times
by quantitative method of ultraviolet spectrophotometer

测量值	相对偏差/%	测量值	相对偏差/%	测量值	相对偏差/%	测量值	相对偏差/%
23.67	6.57	20.95	5.67	20.15	9.28	19.34	12.92
24.59	10.72	25.09	12.97	22.03	0.81	24.19	8.91
23.09	3.96	21.61	2.70	21.16	4.73	21.64	2.57
25.67	15.58	21.07	5.13	24.53	10.45	20.43	8.01
22.91	3.15	17.68	20.39	20.64	7.07	23.76	6.98

3.5 液相色谱仪定量法重复性试验结果 表 4 结果显示,口蹄疫抗原 2 号株样品检测 50 次,相对偏差大于 10% 的样品数为 3 个,相对偏差在 5% ~ 10% 之间的样品数为 7 个,相对偏差在 1% ~ 5% 之间的样品数为 26 个,相对偏差在 1% 以下的样品数为 14 个,用统计学方法计算此组检测数值的标准偏差 σ 值为 0.4759,证明此检测方法重复性很好。

表 4 液相色谱仪定量法检测口蹄疫抗原 2 号株样品 50 次的 146S 含量及相对偏差

Tab 4 146S content and relative deviation of FMD antigen strain 2 detected 50 times
by quantitative method of liquid chromatograph

测量值	相对偏差/%	测量值	相对偏差/%	测量值	相对偏差/%	测量值	相对偏差/%	测量值	相对偏差/%
10.22	0.41	9.93	3.23	9.71	5.37	10.67	3.97	10.32	0.56
10.26	0.01	9.82	4.30	10.56	2.90	10.11	1.47	11.63	13.33
10.15	1.08	10.04	2.16	10.33	0.66	9.83	4.20	10.73	4.56
9.76	4.88	10.13	1.28	10.26	0.01	9.92	3.33	9.34	8.98
9.92	3.33	9.76	4.88	10.81	5.34	10.38	1.15	9.96	2.94
10.14	1.18	10.32	0.56	9.85	4.01	10.33	0.66	10.42	1.54
9.92	3.33	10.98	6.99	9.82	4.30	10.34	0.76	10.12	1.38
9.48	7.61	11.47	11.77	10.52	2.51	10.39	1.24	10.25	0.11
9.39	8.49	10.23	0.31	10.73	4.56	10.20	0.60	10.20	0.60
11.29	10.01	10.93	6.51	10.28	0.17	10.62	3.49	10.32	0.56

3.6 高效液相体积排阻色谱法标准曲线 结果见图 3 和图 4。高效液相体积排阻色谱法所用标准品采用系统自动积分 146S 在 259 nm 下的峰面积,以峰面积为横坐标,相应 146S 浓度为纵坐标,在 EXCEL 程序中绘制过原点的线性趋势线作为标准曲线,线性回归方程的相关系数 $R^2 = 0.9923$,大于 0.99,符合标准曲线的标准。

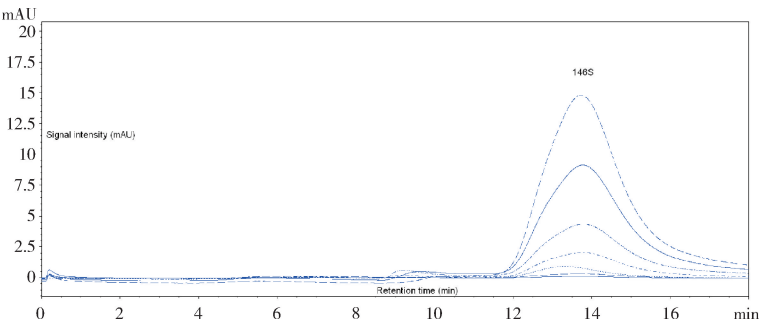


图 3 口蹄疫 146S 抗原标准品色谱图

Fig 3 Standard chromatogram of 146S antigen of FMD

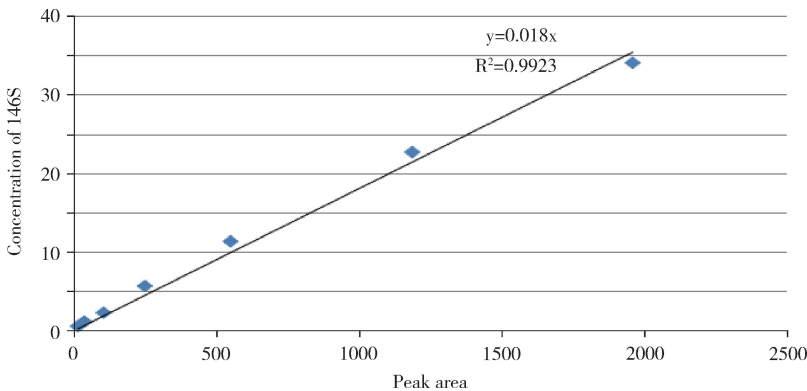


图 4 口蹄疫 146S 抗原标准品曲线

Fig 4 146S antigen standard curve of FMD

3.7 高效液相体积排阻色谱法重复性实验结果 数值的标准偏差 σ 值为 0.2924,证明此检测方法根据表 5 所示,口蹄疫抗原 3 号株样品检测 20 次,重复性非常好。相对偏差都小于 4%,用统计学方法计算此组检测

表 5 高效液相体积排阻色谱法检测口蹄疫抗原 3 号株样品 20 次的 146S 含量及相对偏差

Tab 5 146S content and relative deviation of FMD antigen strain 3 detected 20 times by high performance size exclusion chromatography

测量值	相对偏差/%	测量值	相对偏差/%	测量值	相对偏差/%	测量值	相对偏差/%
15.57	2.32	16.14	1.25	15.52	2.63	16.35	2.57
15.81	0.81	16.19	1.56	15.84	0.62	16.25	1.94
15.95	0.06	16.21	1.69	15.65	1.81	15.74	1.25
16.05	0.69	16.25	1.94	15.58	2.25	15.41	3.32
16.09	0.94	16.27	2.07	15.79	0.94	16.16	1.38

3.8 口蹄疫抗原稳定性实验 表 6、表 7 结果显示,将口蹄疫 A 型抗原和 O 型抗原各一株 4℃放置 12 个月,每月采用蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法检测,结果抗原含量没有变化,将此 2 株抗原多次冷冻融化后检测,抗原含量的降解比较多,所以口蹄疫抗原适合 4℃保存。

表 6 液相色谱仪定量法检测两株抗原 4℃放置 12 个月的含量变化

Tab 6 Changes in the content of two antigens after 12 months at 4℃ by quantitative method of liquid chromatograph

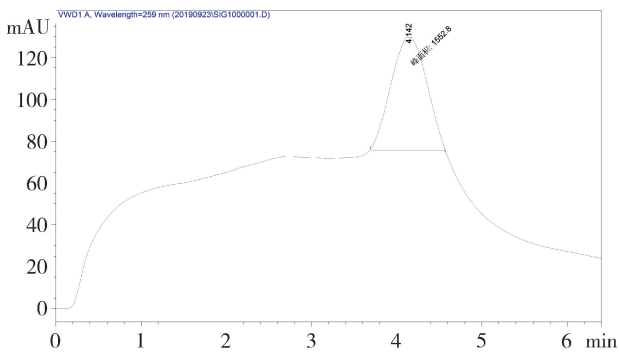
样品名称	146S 含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)											
	第 1 月	第 2 月	第 3 月	第 4 月	第 5 月	第 6 月	第 7 月	第 8 月	第 9 月	第 10 月	第 11 月	第 12 月
口蹄疫 A 型抗原	20.15	20.04	20.11	20.02	19.86	19.79	19.84	19.57	19.23	19.36	19.18	19.11
口蹄疫 O 型抗原	15.46	15.14	15.56	15.24	14.97	15.23	14.84	14.91	14.82	14.79	14.86	14.77

表 7 液相色谱仪定量法检测两株抗原反复多次冻融后抗原含量的变化

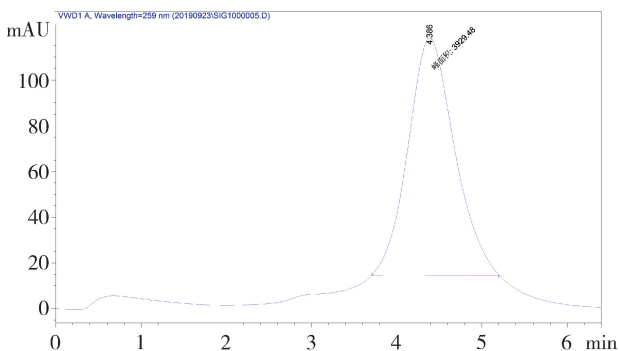
Tab 7 Changes of antigen content after repeated freeze – thaw of two antigens by quantitative method of liquid chromatograph

样品名称	146S 含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)						
	未冷冻时	第一次融	第二次冻融	第三次冻融	第四次冻融	第五次冻融	第六次冻融
口蹄疫 A 型抗原	20.15	18.54	14.28	10.36	8.57	7.35	5.61
口蹄疫 O 型抗原	15.46	13.24	10.18	7.15	6.25	5.12	4.26

3.9 Benzonase 核酸酶处理前后抗原检测图 图 5 结果显示,未加 Benzonase 核酸酶处理的抗原检测图(图 5A)色谱峰出现之前,还出现了杂蛋白的紫外吸收峰,而加 Benzonase 核酸酶处理后的抗原检测图(图 5B)除色谱峰之外,再没有出现杂蛋白的紫外吸收峰,所以 Benzonase 核酸酶能够有效去除杂蛋白干扰,增加蛋白产量,提高色谱纯化的效率。



A(未加Benzonase核酸酶处理的抗原检测图)



B(加Benzonase核酸酶处理后的抗原检测图)

图 5 液相色谱仪定量法检测 1 号抗原色谱图

Fig 5 Quantitative detection of No. 1 antigen by quantitative method of liquid chromatograph

4 讨论与结论

将口蹄疫 A 型抗原和 O 型抗原各一株 4 ℃ 放置 12 个月,每月采用蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法检测,结果抗原含量没有变化,将此 2 株抗原多次冷冻融化后检测,发现抗原含量的降解比较多。因此口蹄疫抗原或疫苗适合 4 ℃ 保存,不能冷冻,冷冻后抗原含量的降解比较多,会大大降低口蹄疫疫苗的免疫效力。Benzonase 核酸酶,是一种核酸内切酶,可将核酸降

解成为 2~5 个碱基的 5' 单磷酸核苷酸,能够有效降低蛋白样品的粘度,提高色谱纯化的效率,去除蛋白样品中核酸污染,并且没有蛋白酶活性残留,它能够完全去除检测过程中干扰物质对 146S 特征峰的影响,获得最佳的检测信号并实现 146S 抗原含量的准确测定。

使用蔗糖密度梯度离心法对口蹄疫 146S 抗原含量进行定量是一种标准方法,该方法操作较复杂,对仪器设备要求较高^[11]。分别用蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 Cary100 紫外分光光度计定量法、蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法及高效液相体积排阻色谱法三种检测方法,对口蹄疫灭活抗原中的 146S 含量进行检测,对三种检测方法的数据作单因素方差分析,结果 F 小于 F_{crit} , P -value 高于 0.05,表明三种检测方法的数据无差异,安捷伦 Cary100 紫外分光光度计定量法和安捷伦 1260 液相色谱仪定量法检测数值相关系数 $R^2 = 0.9456$,安捷伦 1260 液相色谱仪定量法和高效液相体积排阻色谱法检测数值相关系数 $R^2 = 0.9416$,因此三种检测方法的检测数值相关性极显著,呈正相关性,蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 Cary100 紫外分光光度计定量法重复性检测数值的标准偏差 σ 值为 2.1073,此检测方法重复性一般,操作步骤繁琐。高效液相体积排阻色谱法重复性检测数值的标准偏差 σ 值为 0.2924,重复性非常好,自动化程度高,但是操作不够简易,尤其要制作标准曲线,如果每次、每批检测有一种试剂等因素有变动,都需要制作标准曲线,影响检测结果。蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法重复性检测数值的标准偏差 σ 值为 0.4759,此检测方法重复性很好,并且简便易行,所以基于临床需求,蔗糖密度梯度离心结合安捷伦 1260 液相色谱仪定量法更适合口蹄疫抗原检测,通过优化筛选,期望能为口蹄疫疫苗中 146S 抗原含量的检测方法进一步标准化奠定基础,在疫苗质量控制中,可以在生产阶段用抗原含量测定的方法保证疫苗中有效抗原的含量,而在成品疫苗的效力检验时尝试将抗原含量检测方法替代试验动物检测方法

相结合进行综合评价,大批量的终产品检验可以通过抗原含量测定方法试验数据来进行检验,从而减少试验的数量,在终产品的组分发生改变时或者疫苗中添加免疫增强剂等情况时用动物进行效力检验,同时检测疫苗组分改变或添加免疫增强剂后所需要的有效抗原含量新标准,以探索一种有较好重复性、可靠性和易于标准化的替代方法。

参考文献:

- [1] 李纬亮,赵启祖. 口蹄疫灭活疫苗抗原稳定性研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(7): 70-77.
Li W L, Zhao Q Z. The advance in the antigen stability of foot - and - mouth disease inactivated vaccine[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(7): 70-77.
- [2] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997.
Yin Z, Liu J H. Animal virology [M]. The second edition. Beijing: Science Press, 1997.
- [3] Rweyemamu M M, Umehara O, Giorgi W, *et al.* Effect of formaldehyde and binary ethyleneimine (BEI) on the integrity of foot and mouth disease virus capsid[J]. Rev Sci Technol, 1989, 8(3): 747-764.
- [4] 徐娜,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 X Q, 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.
- [5] 王明俊. 兽医生物制品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
Wang M J. Veterinary biological products [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1996.
- [6] Barteling S J, Melen R H. A simple method for the quantifica-

- tion of 140S particles of foot - and - mouth disease virus Arch Ges [J]. Virus Forschung, 1974, 45: 362-364.
- [7] Fayet M T, Fargeaud D, Louisot P, *et al.* Ioumiantzeff; Mesure physico chimique des particules 140S du virus dela fièvre aphteuse[J]. Ann Inst Pasteur, 1971, 121: 107-118.
- [8] 董金杰,祁光宇,刘学荣,等. 用蔗糖密度梯度离心法检测与定量口蹄疫病毒抗原[C]//第三届中国兽药大会-兽医生物制品学,兽医微生物学学术论坛文集. 2010.
Dong J J, Qi G Y, Liu X R, *et al.* Detection and quantification of FMDV antigen by sucrose density gradient centrifugation[C]//Proceedings of the third China Veterinary Medicine Congress - Veterinary Biological Products, Veterinary Microbiology Academic Forum. 2010.
- [9] 朱元源,徐娜,邹兴启,等. 高效液相体积排阻色谱法测定口蹄疫灭活疫苗 146S 抗原含量及疫苗质量评估[J]. 中国农业科学, 2019, 52(20): 3695-3704.
Zhu Y Y, Xu Y, Zou X Q, *et al.* Determination of 146S antigen in inactivated foot - and - mouth disease vaccine by size - exclusion high - performance liquid chromatography and quality evaluation of vaccine [J]. Chinese Agricultural Sciences, 2019, 52(20): 3695-3704.
- [10] 徐娜,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.* Determination of 146S antigen in FMD inactivated vaccine by volume exclusion chromatography [J]. Journal of Bioengineering, 2018, 34(5): 676-684.
- [11] 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[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 4(30): 314-317.
Li L, Miao H S, Xing A G, *et al.* Rapid quantification of FMDV 146S antigen by ELISA method[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008, 4(30): 314-317.

(编辑:李文平)