

• 动物及兽医生物技术 •

## 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

宋艳民<sup>1,2</sup>, 杨延丽<sup>1</sup>, 苏志国<sup>1</sup>, 刘丽丽<sup>1</sup>, 朱元源<sup>3</sup>, 徐嫻<sup>3</sup>, 邹兴启<sup>3</sup>, 赵启祖<sup>3</sup>, 张松平<sup>1</sup>

1 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

2 中国科学院大学 化学工程学院, 北京 100049

3 中国兽医药品监察所, 北京 100081

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. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1441–1452.

Song YM, Yang YL, Su ZG, et al. Vaccine pretreatment for quantification of 146S antigen in foot-and-mouth disease vaccines by high performance size exclusion chromatography. Chin J Biotech, 2019, 35(8): 1441–1452.

**摘要:** 旨在建立一种口蹄疫灭活病毒疫苗的处理方法, 去除尺寸排阻色谱法 (HPSEC) 检测 146S 抗原过程中的杂质干扰, 获得最佳的检测信号并实现 146S 抗原含量的准确测定。分别考察了超速离心法、PEG 沉淀法、核酸酶消化法对两批疫苗样品中的 HPSEC 检测干扰杂质的去除效果。在优化条件下, 超速离心法处理后 146S 检测结果分别为 7.1、7.6  $\mu\text{g/mL}$ , PEG 沉淀法为 9.7、10.4  $\mu\text{g/mL}$ ; 酶消化法处理后的检测值最高, 分别为 10.5、10.4  $\mu\text{g/mL}$ , 且杂质去除完全、处理速度快、操作条件温和。通过响应面法确定最优酶消化处理条件如下: 200  $\mu\text{L}$  水相中添加终浓度 421 U/mL 的 Benzonase, 25.1  $^{\circ}\text{C}$  下反应 1.29 h。在该最优条件下, 对 4 家企业各 3 种不同血清型共 12 批疫苗样品进行 146S 含量检测, 结果表明建立的方法对不同疫苗均有良好适用性, 且重复性好 ( $RSD < 5.3\%$ ,  $n=3$ )。通过该处理方法, 解决了杂质对 146S 定量检测的干扰, 扩大了 HPSEC 检测技术的应用范围, 进一步确保了检测结果的准确可靠。

**关键词:** 尺寸排阻色谱, 口蹄疫疫苗, 146S, 定量, 酶消化

**Received:** January 24, 2019; **Accepted:** March 11, 2019

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 21808226, 21821005).

**Corresponding author:** Songping Zhang. Tel/Fax: +86-10-82544958; E-mail: spzhang@ipe.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 21808226, 21821005) 资助。

# Vaccine pretreatment for quantification of 146S antigen in foot-and-mouth disease vaccines by high performance size exclusion chromatography

Yanmin Song<sup>1,2</sup>, Yanli Yang<sup>1</sup>, Zhiguo Su<sup>1</sup>, Lili Liu<sup>1</sup>, Yuanyuan Zhu<sup>3</sup>, Yuan Xu<sup>3</sup>, Xingqi Zou<sup>3</sup>, Qizu Zhao<sup>3</sup>, and Songping Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

<sup>2</sup> School of Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

<sup>3</sup> China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

**Abstract:** We developed a pre-treatment method to remove interfering substances during quantification of 146S antigens in foot-and-mouth disease (FMD) vaccines by high performance size exclusion chromatography (HPSEC). Three methods, including ultracentrifugation, PEG precipitation and nuclease digestion, were optimized and compared for removal efficiency of the interfering impurities in FMD vaccines. Under optimized conditions, the 146S contents in two batches of FMD vaccines were determined to be 7.1 and 7.6  $\mu\text{g/mL}$  by ultracentrifugation, 9.7 and 10.4  $\mu\text{g/mL}$  by PEG precipitation, and 10.5 and 10.4  $\mu\text{g/mL}$  by nuclease digestion. The optimal condition for nuclease digestion using Benzonase determined by response surface method was as follows: appending Benzonase into 200  $\mu\text{L}$  of antigen phase to a final concentration of 421 U/mL and incubating at 25.1  $^{\circ}\text{C}$  for 1.29 h. This method has advantages including efficient removal of the interfering impurities, fast processing speed, and mild operating conditions. Then 12 batches of FMD vaccines with different serotypes produced by 4 manufacturers were tested to verify the established treatment method. Results showed the method was applicable to various FMD vaccines with good reproducibility ( $RSD < 5.3\%$ ,  $n=3$ ). The developed method removed interference from impurities during quantification of 146S, and therefore would broaden the application of HPSEC in vaccine quality control and ensure the accuracy and reliability.

**Keywords:** size exclusion chromatography, foot-and-mouth disease vaccine, 146S, quantification, enzymatic digestion

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的一种急性、热性、高度接触性传染病。由于其强感染性及存在多种血清型和亚型, FMD 往往难以控制<sup>[1-2]</sup>。目前, 在流行区对口蹄疫的防控主要采取灭活病毒疫苗定期免疫, 使用的灭活疫苗为双相油乳剂疫苗<sup>[2-3]</sup>。随着对疫苗安全性、纯度和整体质量要求的日益严格, 疫苗的质量控制在疫苗开发和生产中的重要性与之俱增<sup>[4-5]</sup>。评价口蹄疫灭活疫苗质量的重要指标之一是疫苗中活性成分即完整病毒粒子 146S 的含量<sup>[6]</sup>, 因此 146S 含量检测技术的研究成为近几年关注的重点。检测 146S 抗原含量的传统方法

为蔗糖密度梯度离心法<sup>[7-8]</sup>, 该方法存在操作复杂、检测速度慢、样品损耗大、结果重复性差等问题<sup>[9-12]</sup>。酶联免疫吸附法 (ELISA) 也有报道<sup>[13-14]</sup>, 但存在难以区分完整抗原 146S 与裂解产物 12S 的缺点, 且准确性差。高效液相尺寸排阻色谱技术 (High performance size exclusion chromatography, HPSEC) 因其灵敏度高、快速、重复性好、自动化程度高等优点, 近年来广泛应用于疫苗的分析检测<sup>[9,15-16]</sup>。该技术的原理是利用不同分子水力学大小上的差异, 在色谱柱中的停留时间不同, 从而实现了对疫苗中不同组分的分离、检测<sup>[17]</sup>。近年来, HPSEC 法在口蹄疫疫苗抗原检测上的应用逐渐受到关注。杨延丽等利用 HPSEC 法对口蹄疫病

毒溶液中的 146S 进行了定量分析和稳定性检测,并结合差示扫描量热技术筛选出对 146S 具有保护效果的稳定剂<sup>[9,18]</sup>。徐嫫等通过优化口蹄疫成品疫苗的破乳条件,建立了油乳剂疫苗产品中 146S 的 HPSEC 定量检测方法,对该方法的精密度、准确度、专属性、耐受性等进行了验证,并应用到了不同血清型的灭活口蹄疫疫苗的市场抽检<sup>[19-20]</sup>,认为 HPSEC 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。

然而 HPSEC 在口蹄疫疫苗质量控制的应用中也存在一些挑战。由于各口蹄疫疫苗生产企业的制备工艺差别较大,疫苗中可能存在与 146S 抗原具有相近尺寸大小的蛋白质、宿主核酸等杂质,干扰 146S 的紫外特征吸收峰,极大地影响 146S 的准确定量,从而限制了该方法的广泛应用。本研究旨在建立一种口蹄疫灭活病毒疫苗的前处理方法,去除对 HPSEC 中 146S 特征吸收峰产生干扰的主要物质,从而实现 146S 的准确定量。经过验证,该方法适用于市面上不同厂家、不同血清型的口蹄疫疫苗产品的处理及后续准确测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent, USA), Neofuge 23R 台式高速冷冻离心机 (上海力申科学仪器有限公司), Sartorius BS 110S 型万分之一电子天平 (Sartorius, Germany), Sorvall WX Ultra Series 离心机 (Thermo Scientific, USA) 及 Surespin 630 水平转子。

### 1.2 主要试剂及测试样品

Benzonase (Sigma 公司, USA), RNase A (Sigma 公司, USA)。所用其他化学试剂均为国产分析纯。供试疫苗样品 16 批,由国内 4 家口蹄疫灭活疫苗生产企业生产,由中国兽医药品监察所

提供。含 O 型 146S 的细胞培养液由兰州兽医研究所提供。146S 纯品是根据文献报道的层析纯化方法,对 146S 细胞培养液进行纯化制备获得<sup>[21]</sup>。

### 1.3 口蹄疫疫苗破乳

使用正戊醇作为破乳剂,按疫苗与正戊醇体积比 9:1 充分振荡混匀,4℃静置 30 min 后,3 000 r/min、4℃离心 5 min,取下层抗原水相进行后续处理或检测。

### 1.4 高效液相尺寸排阻色谱定量检测方法

色谱检测采用 TSK G4000 SW<sub>XL</sub> (7.8 mm×300 mm)色谱柱 (TOSOH);流动相为 50 mmol/L pH 7.5 磷酸缓冲液,含 0.1 mmol/L 硫酸钠;进样体积为 100 μL;流速为 0.6 mL/min;检测波长 259 nm。首先建立用于 146S 定量分析的标准曲线。用上述配置的流动相对 146S 纯品进行梯度稀释,至最低检测浓度为 1 μg/mL。根据上述色谱条件对各浓度的 146S 纯品进行检测,以仪器积分的峰面积为横坐标,146S 浓度为纵坐标,绘制峰面积与浓度的线性回归方程,得到方程  $y=0.0165x$  ( $R^2=0.998$ ,  $n=6$ )。随后采用上述色谱条件对破乳后得到的水相抗原进行检测,将 146S 的积分峰面积代入所得回归方程中,即可计算得到 146S 在破乳水相中的浓度。

### 1.5 超速离心法处理

取 10 mL 疫苗破乳后收集的水相抗原加至 10 mL 超速离心管中,分别于 Sorvall WX Ultra Series 离心机中 20 000 r/min 离心 5 h、30 000 r/min 离心 4 h、40 000 r/min 离心 2 h。弃去上清液后,用 200 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (PBS) (pH 8.0)复溶至 10 mL,进行后续 HPSEC 检测。每个样品及离心条件重复 3 次实验。

### 1.6 PEG 沉淀法处理

取 1 mL 水相抗原,分别加入终浓度 6%–10% (W/V) 的聚乙二醇 2 000、6 000、10 000,以及终

浓度 0–1 mol/L 的氯化钠。混匀后于 4 °C 静置 10 h 充分沉淀 146S, 8 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清后用等体积的 PBS (pH 8.0) 复溶并采用 HPSEC 检测。

### 1.7 核酸酶消化处理

将 Benzonase 和 RNase A 分别预先用 50 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、20 mmol/L NaCl、2 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 缓冲液稀释至一定浓度。取疫苗破乳水相抗原 200 μL, 分别加入 1 μL 稀释后的酶液至终浓度为 50–500 U/mL。混匀后于 20–37 °C 下反应 0.5–3.0 h 后采用 HPSEC 测定。

### 1.8 透射电子显微镜检测

146S 的形貌通过 FEI Tecnai 20 透射电子显微镜检测 (TEM, Royal Philips Electronics, Amsterdam)。将少量样品滴至 400-网眼铜载网, 1% 乙酸双氧铀染色, 自然干燥后测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 无处理的疫苗的 HPSEC 检测

随机挑选 4 批不同血清型的口蹄疫疫苗 (表 1), 按照文献报道的方法<sup>[20]</sup>, 经破乳后直接进行 HPSEC 法定量检测。除非特别说明, 本文中的 146S 含量均为疫苗破乳后水相中的浓度。

根据图 1 中的色谱图, 样品 2、4 的色谱图与报道中的一致<sup>[9]</sup>, 能够很好地检测到 146S 在 13.4 min

表 1 不经预处理疫苗样品的测定结果

Table 1 Results of vaccine samples without pretreatment

No. of samples	Serotype	146S content (μg/mL)
1	A,O, Asia I	NA <sup>a</sup>
2	O, Asia I	5.81±0.07
3	A,O, Asia I	NA <sup>a</sup>
4	O	4.87±0.21

<sup>a</sup>NA represents the 146S concentration was not acquired due to disturbance from impurities.

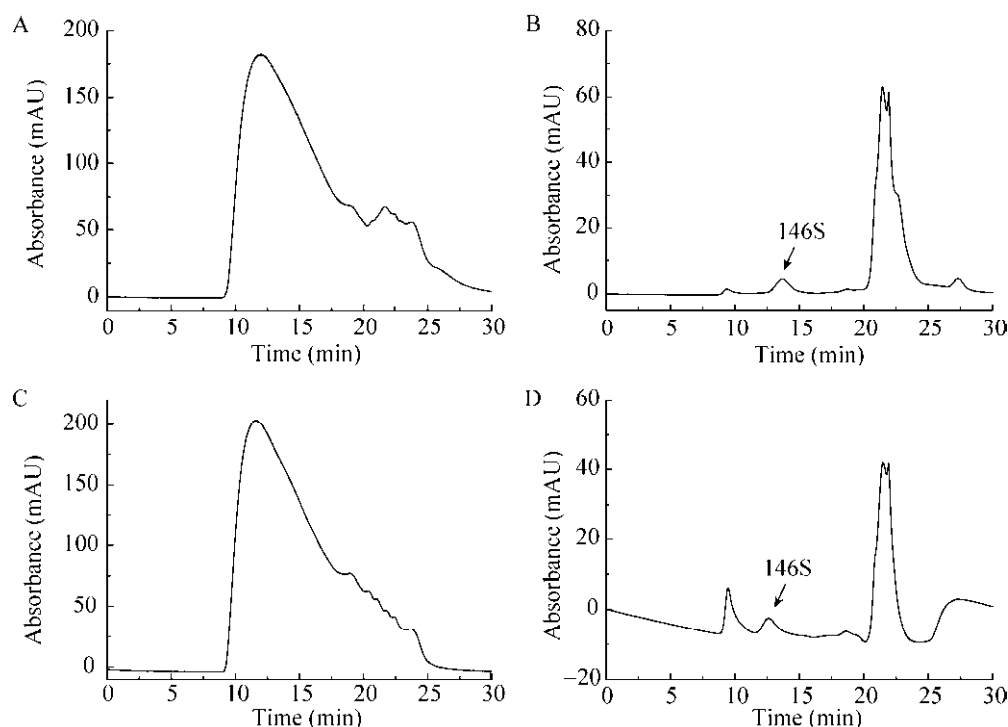


图 1 四种口蹄疫疫苗不经预处理的 HPSEC 测定色谱图

Fig. 1 HPSEC chromatograms of four FMDV vaccines without pretreatment. (A) Sample 1. (B) Sample 2. (C) Sample 3. (D) Sample 4.

左右出现的特征吸收峰,而 1、3 样品的色谱图中存在大量的杂质覆盖了 146S 的吸收峰,无法积分计算含量。因此,这部分口蹄疫疫苗样品,难以直接使用 HPSEC 进行准确定量,从而限制了在口蹄疫疫苗质量控制的应用。为了解决这一问题,去除杂质对 146S 特征峰的干扰,对 1、3 样品分别采用超速离心法、PEG 沉淀法、核酸酶消化法进行处理,优化去除干扰的最佳方法及条件。

## 2.2 超速离心法处理

超速离心的时间和转速都将影响 146S 的沉淀完全与否。转速越高、沉淀时间越长,146S 沉淀的越完全,但过高的离心速度同样会导致杂质的沉淀而降低除杂效果。三种离心条件下处理后样品 1、3 的 HPSEC 检测色谱图如图 2 所示。相比未经处理时,经超速离心收集后的样品其 146S 特征峰附近的干扰杂质大大减少,能逐渐看到 146S 特征吸收峰。然而 146S 损失大,尤其是在 30 000 r/min 离心 4 h 时,未能观测到显著的 146S 特征峰。此外,3 种条件均无法去除 9–14 min 出现的尺寸比 146S 大的杂质。这可能是由于这些杂质具有比 146S 更大的沉降系数,当 146S 被沉降收集时,这些杂质也被一同收集。经过对 146S 峰面积计算,最佳条件为 40 000 r/min 离心 2 h,

测得样品 1 浓度为 7.1  $\mu\text{g/mL}$ ,样品 3 浓度为 7.6  $\mu\text{g/mL}$ 。作为对比,将 7.5  $\mu\text{g/mL}$  的 146S 纯品按照相同操作进行 40 000 r/min 离心 2 h 沉淀并重悬,测得浓度为 5.8  $\mu\text{g/mL}$ ,表明该方法可能会产生抗原损失。

## 2.3 PEG 沉淀处理

首先以样品 3 为考察对象,对 PEG 沉淀过程中添加的 PEG 分子量、PEG 浓度及氯化钠浓度的影响设计了 Box-Behnken 响应面试验,结果见表 2。经过 PEG 沉淀后,对 146S 特征吸收峰有干扰的物质都被不同程度地去除,并能检测到 146S 特征峰。PEG 沉淀的条件不仅影响到干扰杂质的去除效果,同样也会影响 146S 抗原经过沉淀复溶后的收率。根据 Design-Expert 8.0 拟合结果,向水相抗原中加入质量体积比为 10% 的 PEG 6 000, NaCl 浓度为 0 mol/L 时进行沉淀复溶的结果最佳,HPSEC 检测具有最高值。在该条件下对样品 1 和 3 的水相抗原进行处理后进行 HPSEC 检测的结果见图 3。该最佳条件下测得样品 1 浓度为 9.7  $\mu\text{g/mL}$ ,样品 3 浓度为 10.4  $\mu\text{g/mL}$ 。作为对比,将 7.5  $\mu\text{g/mL}$  的 146S 纯品按照相同操作进行 PEG 沉淀及复溶,测得浓度为 7.1  $\mu\text{g/mL}$ ,与原浓度相近,但经过处理后结果略低。

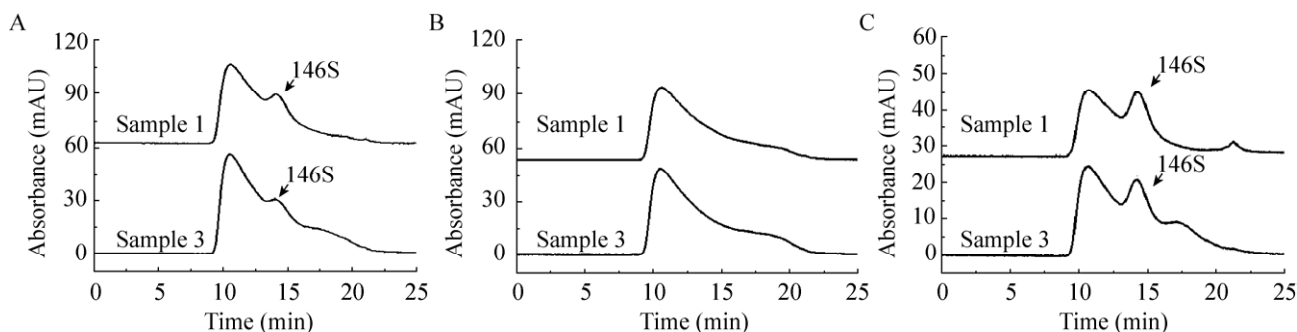


图 2 1 号和 3 号疫苗抗原相超速离心预处理后色谱图

Fig. 2 Chromatograms of sample 1 and sample 3 after treatment by ultracentrifugation at 20 000 r/min 5 h (A), 30 000 r/min 4 h (B), 40 000 r/min 2 h (C), respectively.

表 2 PEG 沉淀试验的 Box-Behnken 设计方案及响应值结果

Table 2 Design and results of RSM of PEG precipitation

Run	Molecular weight of PEG (Da)	Concentration of PEG (% W/V)	Concentration of NaCl (mol/L)	146S content ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	6 000	10	1.0	9.64
2	6 000	8	0.5	9.39
3	6 000	8	0.0	10.24
4	10 000	6	0.5	9.69
5	6 000	10	0.0	10.19
6	6 000	6	1.0	9.67
7	6 000	6	0.0	10.07
8	2 000	6	0.5	0.28
9	10 000	10	0.5	9.50
10	2 000	8	0.0	9.78
11	2 000	8	1.0	0.29
12	6 000	8	0.5	9.54
13	2 000	10	0.5	8.50
14	6 000	8	0.5	9.38
15	10 000	8	0.0	9.91
16	10 000	8	1.0	9.39
17	6 000	8	0.5	9.31

## 2.4 核酸酶消化法试验

口蹄疫疫苗生产所得细胞培养液中可能包含大量的宿主核酸或病毒核酸未被纯化除去而存在于最终制备的疫苗中。为了去除这部分杂质的影响,首先向 200  $\mu\text{L}$  样品 3 的抗原水相中分别加入终浓度为 500 U/mL 的 Benzonase 或 RNase A,于 25  $^{\circ}\text{C}$  下反应 1 h 后进行 HPSEC 检测,结果见图 4A。经过核酸酶消化后,干扰物的紫外吸收均有大幅

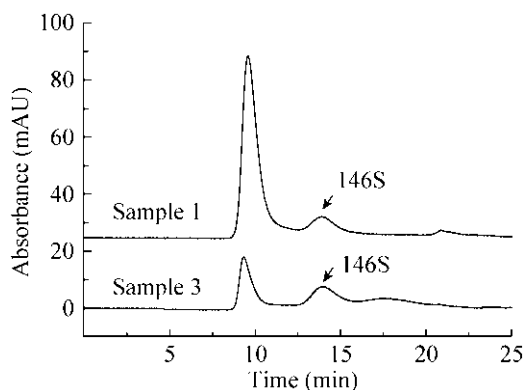


图 3 FMDV 疫苗抗原相 PEG 沉淀预处理后的色谱图  
Fig. 3 HPSEC chromatograms of FMDV 146S antigen phase after PEG precipitation.

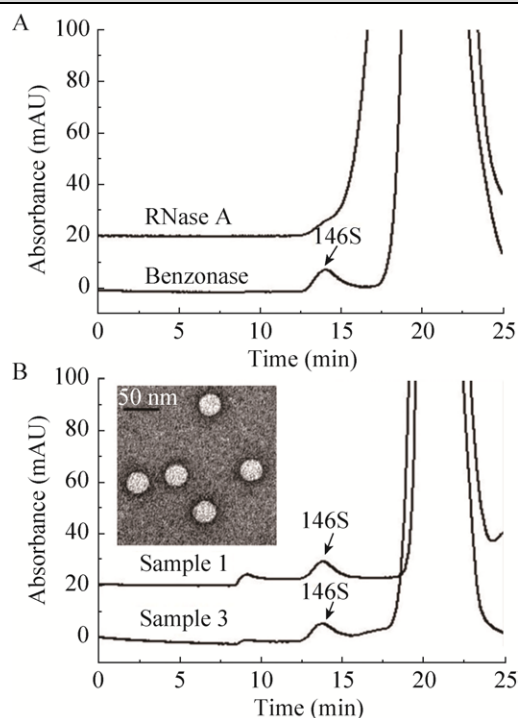


图 4 FMDV 疫苗抗原相核酸酶消化预处理后色谱图  
Fig. 4 HPSEC chromatograms of FMDV 146S antigen phase with nuclease digestion. (A) Sample 3 was digested by RNase A and Benzonase, respectively. (B) Sample 1 and 3 were treated by Benzonase at the optimized conditions. The peak of 146S of sample 1 was collected from HPSEC and was verified by TEM.

度减少, 但 Benzonase 消化后能够检测到完整的 146S 特征峰, 而 RNase A 未能完全去除干扰物, 仍存在极少量干扰峰对 146S 的积分产生影响。RNase A 为内切核糖核酸酶, 具有高度专一性, 可催化 RNA 链的断裂<sup>[22]</sup>。Benzonase 则为多功能非限制性核酸内切酶, 可将不同的 DNA 或 RNA 链完全水解成小片段, 且无蛋白水解活性<sup>[23]</sup>, 可在不破坏病毒蛋白衣壳的同时, 将外部核酸杂质完全水解。因此 Benzonase 的处理效果更理想, 且以上结果也证实对 HPSEC 检测 146S 抗原产生干扰的主要物质应为核酸。收集图 4B 中经

Benzonase 处理后的样品 1 的 146S 特征峰, 经 TEM 验证为完整的 146S 颗粒。

进一步优化 Benzonase 处理条件。提高温度可以提高酶活、减少处理时间, 但由于 FMDV 极不稳定<sup>[24-26]</sup>, 提高温度可能会造成 146S 的裂解。对酶消化的时间、温度、酶浓度三种因素设计了响应面实验, 结果见表 3。对影响 146S 检测浓度的各因素之间的交互作用进行分析, 并绘制响应面曲线图 (图 5)。各变量因素对 146S 检测浓度影响程度的大小顺序依次为: 酶活浓度>温度>时间。利用 Design-Expert 8.0 软件对表 3 数据进行统计

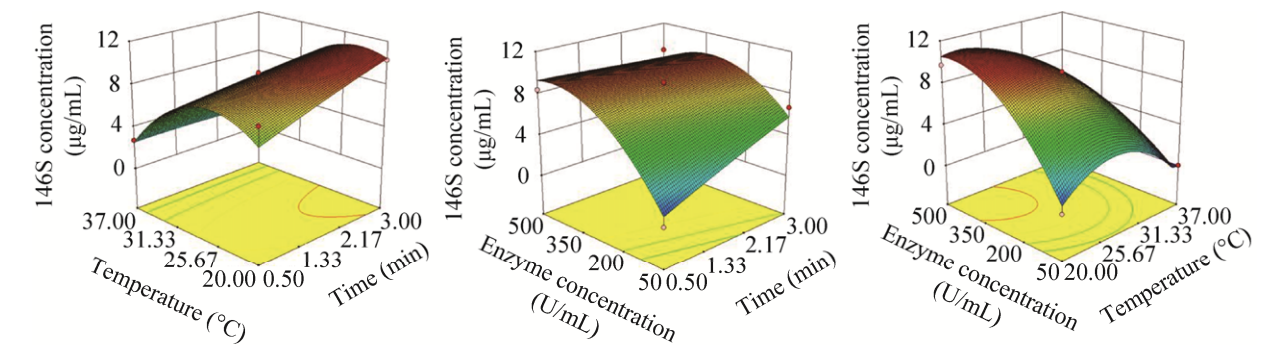


图 5 时间、温度和酶浓度对 146S 测定结果的交互影响  
Fig. 5 Effects of time, temperature and enzyme activity concentration on the detected 146S concentration.

表 3 核酸酶处理响应面设计方案及响应值结果

Table 3 Design and experimental results of RSM in Benzonase digestion

Run	Time (h)	Temperature (°C)	Enzyme activity concentration (U/mL)	146S content (µg/mL)
1	1.75	37.0	50	0 <sup>a</sup>
2	0.50	28.5	50	0 <sup>b</sup>
3	1.75	28.5	275	8.70
4	1.75	20.0	500	9.73
5	3.00	28.5	500	9.21
6	3.00	20.0	275	10.29
7	1.75	28.5	275	8.95
8	3.00	28.5	50	6.70
9	1.75	28.5	275	9.13
10	1.75	20.0	50	0.33
11	0.50	20.0	275	8.19
12	1.75	37.0	500	1.23
13	3.00	37.0	275	0.60
14	1.75	28.5	275	9.05
15	1.75	28.5	275	9.02
16	0.50	28.5	500	8.40
17	0.50	37.0	275	2.73

<sup>a</sup> disturbance was removed after digestion but no 146S was detected, which was probably due to 146S dissociation at 37 °C.  
<sup>b</sup> 146S concentration was not acquired due to disturbance from impurities, no evident 146S peak was observed.



分析,并建立二次回归方程,得  $R^2=0.953\ 9$ ,表明拟合结果较好。经过响应面实验,确定的最佳操作条件为 200  $\mu\text{L}$  水相添加终浓度为 421 U/mL 的酶溶液,25.1  $^{\circ}\text{C}$  环境中反应 1.29 h。将该最优条件用于样品 1、3 处理,色谱图如图 4B 所示。经充分酶消化反应后,大量干扰紫外吸收峰消失,而 20 min 左右的紫外吸收峰显著增大,表明干扰杂质被降解为分子量更小的杂质。随着干扰杂质的去除,能够检测到完整的 146S 特征吸收峰。经积分计算,测得样品 1 浓度为 10.5  $\mu\text{g/mL}$ ,样品 3 浓度为 10.4  $\mu\text{g/mL}$ 。

为进一步验证核酸酶是否会对 146S 的颗粒结构或内部的核酸产生影响,以及该处理温度、时间条件下是否会导致 146S 的损失,在 7.5  $\mu\text{g/mL}$  146S 纯品中分别加入终浓度为 421 U/mL 的 Benzonase 或 RNase A,于 25.1  $^{\circ}\text{C}$  环境中反应 1.29 h,并与加酶孵育前的 146S 进行 HPSEC 色谱图和透射电子显微镜观测比较。如图 6 所示,146S 的特征吸收峰的位置、峰面积以及 TEM 形貌,在加入核酸酶反应前后均未发生明显改变。该结果表明,在优化的酶处理的温度、时间条件下,两种核酸酶处理对 146S 的含量和结构均无影响。并且由于

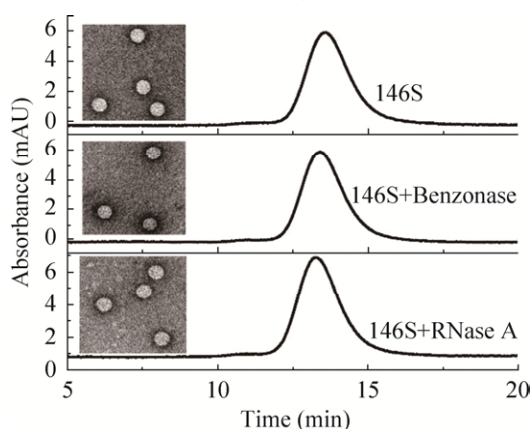


图 6 146S 分别加入两种核酸酶处理前后色谱图对比  
Fig. 6 HPSEC chromatograms of FMDV 146S antigen before and after nuclease digestion. The 146S peak of the three samples were then collected from HPSEC and were detected by TEM, respectively.

146S 在 259 nm 处特征峰的大小没有变化,也进一步证实由于病毒衣壳蛋白间的空隙较小,核酸酶难以进入病毒内部,从而不会作用于病毒内部的 RNA,否则由于 RNA 的降解,其紫外吸收将会发生变化。

## 2.5 三种处理方法比较

对以上 3 种水相抗原的处理方法的比较汇总于表 4。对比 3 种方法的 146S 检测结果,PEG 沉淀与酶消化法均高于超速离心法,且根据 HPSEC 色谱图可知这两种方法能够完全去除干扰物对特征峰的干扰,得到的结果更准确,而超速离心法不仅难以完全去除干扰杂质,还产生较大的抗原损失。但 PEG 沉淀操作可能会产生部分 146S 抗原的损失,使得部分样品的测定结果略低于酶消化法,且 PEG 沉淀法的缺点是处理时间长,需要静置过夜。此外,超速离心法还受限于仪器的处理量,难以应用于大量样品的处理。而 Benzonase 酶消化法不仅处理速度快,操作条件温和,且处理量不限,为 3 种方法中的最优方法。

## 2.6 疫苗样品的测定

对建立的酶消化法的适用性、检测结果重复性及准确性进行了考察。测定了 4 家企业各 3 种不同血清型共 12 批疫苗样品破乳水相中的抗原含量,图 7 分别对比酶处理及未经酶处理的 HPSEC 检测的谱图,计算得到的 146S 含量结果汇总于表 5。

可以看出,由于各企业生产工艺不同,疫苗中 146S 和干扰杂质含量不同,对 146S 检测产生了不同程度的影响。HPSEC 图谱显示 12 批样品的色谱结果存在差异,有些样品干扰杂质含量较高,掩盖了 146S 特征峰,有些无杂质干扰。存在干扰峰的样品经酶处理后均能检测到完整的 146S 特征峰,如图 7 A2、B1、C2、D2 所示,表明酶消化法对不同企业不同血清型的样品均有良好的适用性;无干扰峰的样品经酶处理后的检测结果与酶消化前的图谱一致,如图 7 A1、B2、C1



表 4 三种处理方法比较

Table 4 Comparison of three pre-treatment methods

Pre-treatment methods	Time	Capacity	Removal of interferent	146S content detected by HPSEC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
				Sample 1	Sample 3
Ultracentrifugation	>4 h	6 samples per centrifuge	Un-thoroughly	7.1	7.6
PEG precipitation	>11 h	Unlimited	Thoroughly	9.7	10.4
Benzonase digestion	<2 h	Unlimited	Thoroughly	10.5	10.4

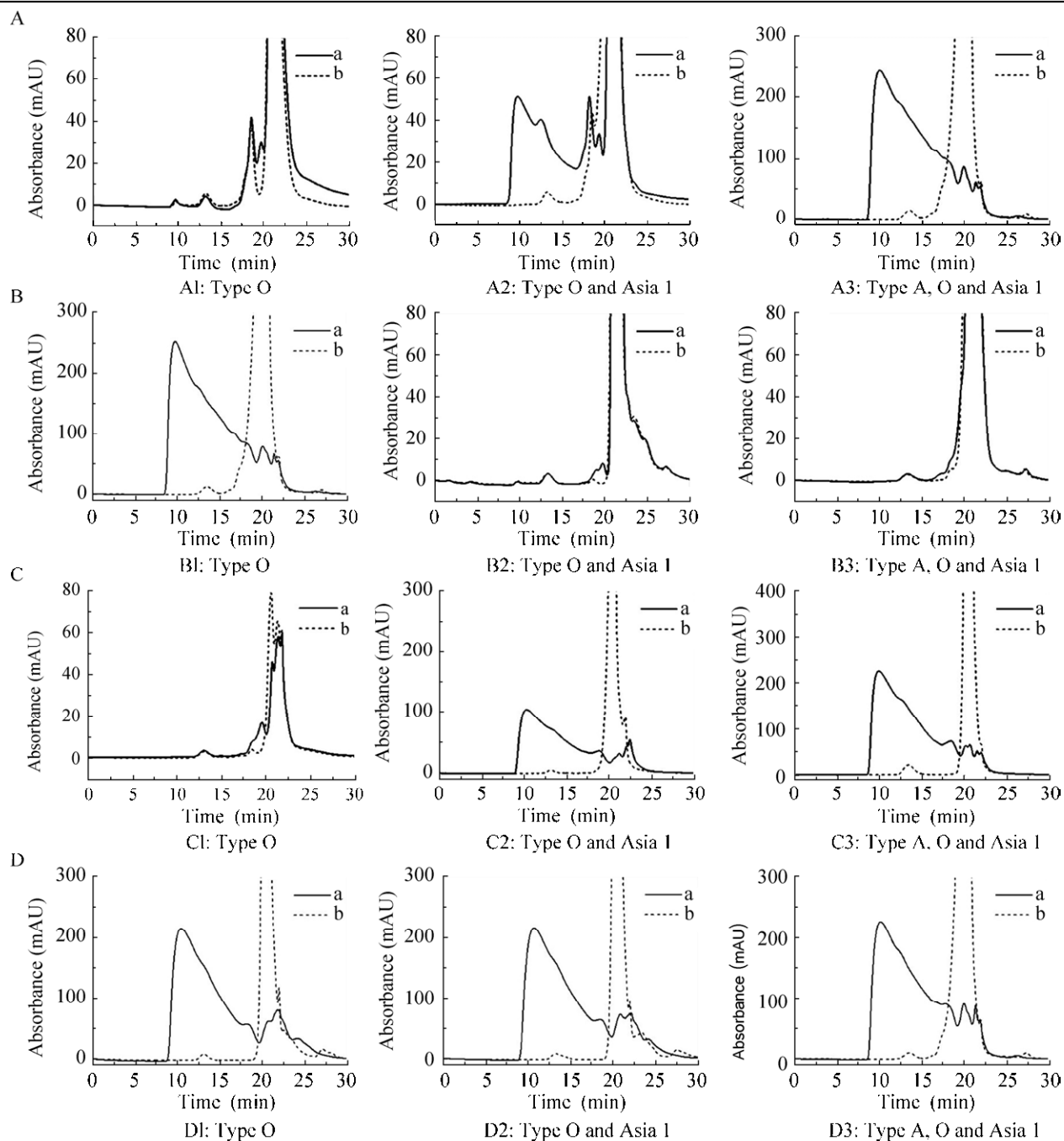


图 7 12 个批次疫苗样品抗原相经过 Benzonase 在优化条件下预处理前后进行 HPSEC 检测的色谱图

Fig. 7 HPSEC chromatograms of the antigen phase of 12 batches vaccine samples before (a) and after (b) Benzonase digestion at the optimized condition. (A–D) Manufacturer code. 1–3: different serotypes of vaccine.

表 5 疫苗样品测定结果

Table 5 Detection results of vaccine samples

Manufacturer code	No. of vaccine	Serotype	146S content determined without treatment ( $\mu\text{g/mL}$ )	146S content determined after treatment ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD with treatment ( $\%$ , $n=3$ )
A	1	O	$6.04\pm 0.06$	$6.42\pm 0.06$	0.9
	2	O, Asia I	NA	$6.97\pm 0.19$	2.7
	3	A, O, Asia I	NA	$18.75\pm 1.00$	5.3
B	1	A, O, Asia I	NA	$15.91\pm 0.27$	1.7
	2	O	$5.79\pm 0.06$	$5.82\pm 0.04$	0.7
	3	A, O, Asia I	$5.24\pm 0.11$	$5.21\pm 0.05$	1.0
C	1	O	$3.29\pm 0.03$	$3.20\pm 0.03$	0.9
	2	O, Asia I	NA	$5.11\pm 0.08$	1.6
	3	A, O, Asia I	NA	$30.86\pm 0.25$	0.8
D	1	O	NA	$11.26\pm 0.13$	1.1
	2	A, O	NA	$9.89\pm 0.07$	0.7
	3	A, O, Asia I	NA	$13.14\pm 0.36$	2.7

所示,表明酶消化法不会造成 146S 的损失。经 3 次重复操作的 *RSD* 均小于 5.3%,表明处理重复性良好。对比无干扰样品加酶前后的检测结果,*RSD* 均小于 5%。

### 3 讨论

HPSEC 作为一种疫苗抗原质量评价的新方法,具有快速、高效、成本低等优点。146S 特征峰与杂质的有效分离是保证其含量准确检测的基础。在应用 HPSEC 分析检测口蹄疫灭活疫苗中的 146S 抗原含量时,因不同企业生产工艺的不同会遇到与杂质的分离度不理想或 146S 吸收峰不明显的情况。文中针对这一问题,综合考察比较了 3 种不同原理的去除杂质干扰的样品处理方法。对处理方法的要求在于,首先要能够完全去除干扰物质对 146S 特征峰的影响,同时要保证处理过程不会造成 146S 的损失。在本研究考察的 3 种方法中,超速离心法利用病毒 146S 具有高的沉降系数从而与杂质分离,但实际去除干扰杂质效果一般,且操作费时费力,设备昂贵;PEG 沉淀法利用 146S 具有较大尺寸,在较低浓度的 PEG 条件下能被沉淀从而与杂质分离,分离效果较好,但

耗时长;核酸酶消化法将长链的残留核酸消化降解为小的片段,从而能在 HPSEC 检测中后出峰,不影响 146S 的特征峰,处理速度快且操作简单、条件温和、无抗原损失。最终对确定的最优酶处理条件的适用性、准确性及重复性进行了验证。通过建立的口蹄疫疫苗样品的处理方法,解决了部分口蹄疫灭活病毒疫苗中杂质含量高、难以定量分析的问题,提高了 HPSEC 检测方法的适用性,保证了 HPSEC 法在口蹄疫疫苗质量控制、降低生物安全风险、提高环保效益等方面的应用前景。

### REFERENCES

- [1] Li ZY, Liu JX. The current state of vaccines used in the field for foot and mouth disease virus in China. *Expert Rev Vaccines*, 2011, 10(1): 13–15.
- [2] Paprocka G. Foot-and-mouth disease vaccines. *Med Weter*, 2013, 69(11): 643–648.
- [3] Cao YM. Adjuvants for foot-and-mouth disease virus vaccines: recent progress. *Expert Rev Vaccines*, 2014, 13(11): 1377–1385.
- [4] Garcia-Cañas V, Lorbetskie B, Girard M. Rapid and

- selective characterization of influenza virus constituents in monovalent and multivalent preparations using non-porous reversed-phase high performance liquid chromatography columns. *J Chromatogr A*, 2006, 1123(2): 225–232.
- [5] Metz B, van den Dobbelsteen G, van Els C, et al. Quality-control issues and approaches in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(2): 227–238.
- [6] Dong JJ, Wang F, Chen MM, et al. Overview of detection methods of 146S content in foot-and-mouth disease inactivated vaccine. *Shandong J Anim Sci Vet Med*, 2017, 38(10): 78–79 (in Chinese).  
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. *山东畜牧兽医*, 2017, 38(10): 78–79.
- [7] Barteling SJ, Melen RH. A simple method for the quantification of 140 S particles of foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Arch Gesamte Virusforsch*, 1974, 45(4): 362–364.
- [8] Spitteler MA, 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. *Vaccine*, 2011, 29(41): 7182–7187.
- [9] Yang YL, Li H, Li ZJ, et al. Size-exclusion HPLC provides a simple, rapid, and versatile alternative method for quality control of vaccines by characterizing the assembly of antigens. *Vaccine*, 2015, 33(9): 1143–1150.
- [10] Steppert P, Burgstaller D, Klausberger M, et al. Purification of HIV-1 gag virus-like particles and separation of other extracellular particles. *J Chromatogr A*, 2016, 1455: 93–101.
- [11] Michel PO, Mäkelä AR, Korhonen E, et al. Purification and analysis of polyhistidine-tagged human parvovirus B19 VP1 and VP2 expressed in insect cells. *J Virol Methods*, 2008, 152(1/2): 1–5.
- [12] Yap WB, Tey BT, Ng MYT, et al. N-terminally His-tagged hepatitis B core antigens: construction, expression, purification and antigenicity. *J Virol Methods*, 2009, 160(1/2): 125–131.
- [13] Harmsen MM, Fijten HPD, Westra DF, et al. Effect of thiomersal on dissociation of intact (146S) foot-and-mouth disease virions into 12S particles as assessed by novel ELISAs specific for either 146S or 12S particles. *Vaccine*, 2011, 29(15): 2682–2690.
- [14] Harmsen MM, Fijten HPD, Westra DF, et al. Stabilizing effects of excipients on dissociation of intact (146S) foot-and-mouth disease virions into 12S particles during storage as oil-emulsion vaccine. *Vaccine*, 2015, 33(21): 2477–2484.
- [15] Vajda J, Weber D, Brekel D, et al. Size distribution analysis of influenza virus particles using size exclusion chromatography. *J Chromatogr A*, 2016, 1465: 117–125.
- [16] Effio CL, Oelmeier SA, Hubbuch J. High-throughput characterization of virus-like particles by interlaced size-exclusion chromatography. *Vaccine*, 2016, 34(10): 1259–1267.
- [17] Tassi M, De Vos J, Chatterjee S, et al. Advances in native high-performance liquid chromatography and intact mass spectrometry for the characterization of biopharmaceutical products. *J Sep Sci*, 2018, 41(1): 125–144.
- [18] Yang YL, Zhao QZ, Li ZJ, et al. Stabilization study of inactivated foot and mouth disease virus vaccine by size-exclusion HPLC and differential scanning calorimetry. *Vaccine*, 2017, 35(18): 2413–2419.
- [19] Xu Y, Zou XQ, Li C, et al. Using size-exclusion chromatography to quantify the 146S antigen in inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Chin J Biotech*, 2018, 34(5): 676–684 (in Chinese).  
徐嫻, 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. 生物工程学报, 2018, 34(5): 676–684.

- [20] Xu Y, Zou XQ, Liu XD, et al. Using high performance size exclusion chromatography to determine antigen (146S) content in foot-and-mouth disease inactivated vaccine of quality supervision. Chin J Vet Drug, 2018, 52(1): 7–12 (in Chinese).  
徐嫻, 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. 中国兽药杂志, 2018, 52(1): 7–12.
- [21] Li H, Yang YL, Zhang Y, et al. A hydrophobic interaction chromatography strategy for purification of inactivated foot-and-mouth disease virus. Protein Expr Purif, 2015, 113: 23–29.
- [22] Raines RT. Ribonuclease A. Chem Rev, 1998, 98(3): 1045–1066.
- [23] Xu GF, Geng XL, Song SH, et al. Optimization of condition for removal of Vero cell DNA in influenza H5N1 vaccine with Benzonase nuclease. Chin J Biol, 2017, 30(5): 540–545 (in Chinese).  
徐国峰, 耿兴良, 宋绍辉, 等. Benzonase 酶去除流感疫苗中 Vero 细胞 DNA 条件的优化. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(5): 540–545.
- [24] Doel TR, Baccarini PJ. Thermal stability of foot-and-mouth disease virus. Arch Virol, 1981, 70(1): 21–32.
- [25] Brown F, Cartwright B. Dissociation of foot-and-mouth disease virus into its nucleic acid and protein components. Nature, 1961, 192(4808): 1163–1164.
- [26] Doel TR, Chong WKT. Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus. Arch Virol, 1982, 73(2): 185–191.

(本文责编 陈宏宇)