

高效液相尺寸排阻色谱-多角度激光散射定量检测灭活禽流感病毒抗原中完整病毒颗粒

郝建敏^{1,2}, 刘幽燕¹, 苏志国², 张松平^{2*}, 李正军^{2*}

1 广西大学化学化工学院, 广西 南宁 530004

2 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

郝建敏, 刘幽燕, 苏志国, 张松平, 李正军. 高效液相尺寸排阻色谱-多角度激光散射定量检测灭活禽流感病毒抗原中完整病毒颗粒[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4295-4307.

HAO Jianmin, LIU Youyan, SU Zhiguo, ZHANG Songping, LI Zhengjun. Quantification of complete viral particles in inactivated avian influenza virus antigen by high performance size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4295-4307.

摘要: 本研究旨在建立一种灭活禽流感病毒原料液中完整病毒颗粒准确定量的方法。针对直接采用高效液相尺寸排阻色谱法(high performance size exclusion chromatography, HPSEC)检测灭活禽流感病毒原液存在杂质干扰的问题, 首先以 H5N8 型抗原为对象, 分别考察了聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)沉淀和离子交换色谱法(ion exchange chromatography, IEC)进行预处理。在优化条件下, 经 DEAE FF 阴离子交换层析纯化预处理, 杂蛋白去除率为 86.87%, 病毒血凝回收率为 100%。HPSEC 分析预处理后的样品, 8.5–10.0 min 处色谱峰样品电泳检测显示主要为 H5N8 病毒蛋白, 动态光散射分析平均粒径为 127.7 nm, 推测为完整病毒特征峰; 在 IEC 预处理后的样品中加入抗体进行 HPSEC 检测, 8.5–10.0 min 处特征峰消失, 显示 IEC 预处理有效去除了杂质干扰。通过将 HPSEC 与多角度激光散射技术(multi-angle laser scattering technique, MALLS)联用, 可以准确获得样品中完整病毒颗粒的数量, 且病毒颗粒数与色谱峰面积具有良好线性关系($R^2=0.997$)。建立的 IEC 预处理-HPSEC-MALLS 检测方法应用于其他亚型(H7N9)、批次和浓度的病毒原液中完整病毒颗粒数的准确检测, 均具有良好适用性, 且重复性好, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) $<5\%$, $n=3$ 。

关键词: 灭活禽流感病毒颗粒; 定量检测; 离子交换层析; 尺寸排阻色谱

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103402); 国家自然科学基金(21808226, 21821005, 21973097)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103402) and the National Natural Science Foundation of China (21808226, 21821005, 21973097).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Songping, spzhang@ipe.ac.cn; LI Zhengjun, lizj@ipe.ac.cn

Received: 2023-02-21; Accepted: 2023-04-17; Published online: 2023-04-19

Quantification of complete viral particles in inactivated avian influenza virus antigen by high performance size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering

HAO Jianmin^{1,2}, LIU Youyan¹, SU Zhiguo², ZHANG Songping^{2*}, LI Zhengjun^{2*}

1 College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

2 State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: We developed a method for accurate quantification of the intact virus particles in inactivated avian influenza virus feedstocks. To address the problem of impurities interference in the detection of inactivated avian influenza virus feedstocks by direct high performance size exclusion chromatography (HPSEC), we firstly investigated polyethylene glycol (PEG) precipitation and ion exchange chromatography (IEC) for H5N8 antigen purification. Under the optimized conditions, the removal rate of impurity was 86.87% in IEC using DEAE FF, and the viral hemagglutination recovery was 100%. HPSEC was used to analyze the pretreated samples. The peak of 8.5–10.0 min, which was the characteristic adsorption of intact virus, was analyzed by SDS-PAGE and dynamic light scattering. It was almost free of impurities and the particle size was uniform with an average particle size of 127.7 nm. After adding antibody to the IEC pretreated samples for HPSEC detection, the characteristic peak disappeared, indicating that IEC pretreatment effectively removed the impurities. By coupling HPSEC with multi-angle laser scattering technique (MALLS), the amount of intact virus particles in the sample could be accurately quantified with a good linear relationship between the number of virus particles and the chromatographic peak area ($R^2=0.997$). The established IEC pretreatment-HPSEC-MALLS assay was applied to accurate detection of the number of intact virus particles in viral feedstocks of different subtypes (H7N9), different batches and different concentrations, all with good applicability and reproducibility, Relative standard deviation<5%, $n=3$.

Keywords: inactivated avian influenza virus particles; quantitative detection; ion-exchange chromatography; size exclusion chromatography

禽流感(avian influenza, AI)是一种由禽流感病毒引起的以感染禽类为主的急性呼吸道类传染性疾病,具有传染性较强、传染速度快等特点^[1-2],易引起禽类的大量死亡,造成巨大的经济损失^[3]。接种灭活病毒疫苗已经被证实是用于禽流感防控的有效方法,但存在部分免疫禽群体抗体合格率低、免疫效果不佳的问题^[4]。疫苗所含抗原量不足是导致该现象的一个重要

原因。因此,准确检测灭活禽流感病毒疫苗中的抗原含量至关重要。

目前对灭活禽流感疫苗的质控主要基于免疫学方法和物理化学法,前者包括单向免疫扩散法、血凝试验等,后者通常采用反相高效液相色谱法、电泳灰度法等^[5-7]。病毒表面的血凝素蛋白(hemagglutination, HA)是最主要的抗原,单向免疫扩散法检测 HA 含量是世界卫生组织

和欧洲药典推荐采用的标准方法,特异性高,但需要与标准化的抗原之间完全同源,参考抗原和特异性抗体的制备周期长,且对病毒纯度要求高^[6,8]。血凝试验具有通量高、耗时短的优点,但却无法检测 HA 抗原的绝对含量,且精度相对较低。相比之下,物理化学法操作简单、耗时短和无需特异性抗体^[9-10],如 Kapteyn 等采用二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)和吐温-80 对 H1N1 病毒样品进行裂解预处理,利用无孔硅胶柱对裂解后的产物进行分析,以 HA1 的峰面积表征 HA 含量,与 Western blotting 印迹法具有较好的相关性。但此法中病毒裂解前处理比较复杂,且忽略了 HA2 在免疫效力中的作用^[11-12]。彭成成等^[13]使用糖苷酶 PNGase F 对 H9N2 亚型禽流感病毒样品脱糖化处理后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析,根据灰度扫描对 HA 进行定量,操作简便,但对病毒纯度要求高,且 HA 单体解聚形成的 HA1 和 HA2 亚基会分别与 NP 和 M1 发生共迁移而难以区分^[5,14]。以上针对禽流感病毒的检测方法主要以 HA 的含量作为疫苗质控的关键因素。然而,对于灭活病毒疫苗而言,完整的病毒颗粒结构往往是发挥免疫效力的基础,如口蹄疫灭活病毒,当 pH 低于 6.0 或温和加热条件下,完整的病毒结构容易裂解而造成免疫活性丧失^[15]。因此,建立准确、快速的灭活禽流感病毒完整颗粒含量的检测方法对于疫苗的质控至关重要。

高效液相尺寸排阻色谱(high performance size exclusion chromatography, HPSEC)是一种简单、快速且通用性好的用于疫苗质量控制的检测方法^[16]。由于尺寸或分子量不同的物质在色谱填料的孔道中的路径长度不同,越大的物质路径越短,出峰时间越早,从而将不同尺寸的物质分离。目前 HPSEC 填料主要是基于硅胶

和亲水修饰的聚合物,具有不同的粒径和孔径,可以根据待分析样品的尺寸等信息选择合适的色谱柱和分离条件,实现疫苗抗原颗粒与杂质的分离和检测。灭活禽流感病毒抗原样品中除了完整的病毒颗粒外,还有宿主核酸、宿主蛋白、培养基、脂质以及破碎的病毒等多种杂质,直接利用 HPSEC 检测会干扰完整病毒颗粒的定量。本研究针对以上问题,利用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)沉淀和离子交换层析(ion exchange chromatography, IEC)对样品预处理,去除对 HPSEC 中病毒特征吸收峰产生干扰的主要杂质,并结合多角度激光散射技术(multi-angle laser scattering technique, MALLs)对完整的病毒颗粒数量进行准确定量。经过验证,该方法重复性好,适用于不同亚型、不同生产批次及浓度的灭活禽流感病毒疫苗产品的定量测定。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器

AKTA purifier (Cytiva 公司), 高效液相色谱仪(Waters 公司), 高速冷冻离心机(Thermo 公司), 梅特勒-托利多 pH 计(Mettler toledo 公司), XS105 电子天平(Mettler toledo 公司), 多角度激光散射仪(Thermo 公司), VARIOSKAN FLASH 多功能酶标仪(Thermo 公司), NANO ZSP 粒度分析仪(马尔文公司)、JEM-1400Flash (HCD)生物型透射电子显微镜(JEOL 公司)。

1.2 主要试剂及测试样品

灭活禽流感病毒原液(H5N8, H7N9)以及对应的阳性血清抗体由辽宁益康生物股份有限公司提供;无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级鸡血购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司;BCA 试剂盒购自 Thermo 公司;DEAE Sepharose FF (简称 DEAE FF)、Q Sepharose FF

(简称 Q FF)介质购自 Cytiva 公司;5×SDS-PAGE 上样缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司; TSKgel G4000 PWxl、TSKgel G5000 PWxl、TSKgel G6000 PWxl 均购自 TOSOH 公司;所用其他化学试剂均为国产分析纯。

1.3 PEG 沉淀法预处理禽流感病毒原液

配制浓度为 4%–20% (质量体积分数)的 PEG-6000 溶液,各取 2 mL 分别与灭活禽流感病毒原液 1:1 的体积比均匀混合,室温静置 2 h 后 4 °C 放置 12 h,10 000 r/min 离心 10.0 min,分离上清和沉淀,沉淀复溶在 0.5 mL 的 PBS 中,分别测其蛋白浓度和血凝滴度。

蛋白去除率(%)=

$$\left(1 - \frac{\text{纯化后蛋白浓度} \times \text{纯化后体积}}{\text{原料液蛋白浓度} \times \text{纯化前体积}}\right) \times 100 \quad (1)$$

HA 血凝回收率(%)=

$$\frac{\text{纯化后血凝滴度} \times \text{纯化后体积}}{\text{原料液血凝滴度} \times \text{纯化前体积}} \times 100 \quad (2)$$

1.4 离子交换色谱法预处理灭活禽流感病毒原液

使用离子交换色谱法预处理,DEAE FF 和 Q FF 两种介质体积约为 1.5 mL (10 mm×20 mm I.D.)。采用原料液直接上样(平衡缓冲液为 20 mmol/L PB+100 mmol/L NaCl, pH 7.2)和原料液稀释 2 倍上样(平衡缓冲液为 20 mmol/L PB+50 mmol/L NaCl, pH 7.2)两种模式,洗脱缓冲液为 20 mmol/L PB+1 mol/L NaCl, pH 7.2。采用 AKTA purifier 进行纯化,流速为 1.0 mL/min,紫外检测波长为 280 nm,上样体积为 1 mL,收集洗脱液和穿透液,并对其测蛋白浓度和血凝滴度。

1.5 血凝试验

在 96 孔 V 型板中加入 100 μL 灭活病毒样品,用 PBS 以 2 倍逐步稀释,最后一列为 PBS 作空白对照。所有孔中加入 50 μL 1%鸡红细胞悬液,轻轻振荡混匀,室温下静置 30 min,观

察结果。以病毒抗原最大稀释倍数为血凝滴度。

1.6 HPSEC-MALLS

HPSEC 色谱柱: TSKgel G4000 PWxl (7.8 mm×300 mm)、TSKgel G5000 PWxl (7.8 mm×300 mm)以及 TSKgel G6000 PWxl (7.8 mm×300 mm)。流动相均为 50 mmol/L pH 7.2 磷酸缓冲液,进样体积为 100 μL,流速为 0.6 mL/min,检测波长为 280 nm。

高效液相色谱仪与多角度激光散射检测器(MALLS, DAWN HELEOS-II, Wyatt Technology Corp)、示差检测器(OPTILAB T-rEX, Wyatt Technology Corp)和动态光检测器(Dynapro NanosStar, Wyatt Technology Corp)连用对样品进行检测,利用 ASTRA[®] (Wyatt Technology)软件进行颗粒数目的分析。

1.7 透射电镜

灭活禽流感病毒形貌通过生物型透射电子显微镜(JEM-1400Flash, JEOL 公司)检测,用 400-网眼铜载网蘸取少量样品,使用磷钨酸进行染色,待自然干燥后可进行测定。

1.8 动态光散射

取 1 mL IEC 纯化后灭活禽流感病毒抗原样品(蛋白浓度约为 0.17 mg/mL)加入到检测皿中,利用粒度仪分析尺寸分布,每个样品重复检测 3 次。

1.9 SDS-PAGE

将纯化前后样品以及 HPSEC 检测时收集的样品与 5×SDS-PAGE 上样缓冲液以 4:1 混合后,100 °C 加热 10 min,上样 10 μL 于电泳胶上,设置运行电压为 90 V,待溴酚蓝染料从凝胶底部流出,用考马斯亮蓝溶液染色 30 min,再脱色至背景完全透明即可。

1.10 BCA 法蛋白浓度测定

测定不同稀释倍数牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)标品的吸光值,建立 BSA 浓度与吸光值之间的标准曲线。将纯化前后的灭活禽流

感病毒样品进行检测, 每个样品检测 3 次, 取平均值, 根据 562 nm 下的吸光值计算蛋白浓度。

2 结果与分析

2.1 HPSEC 直接检测灭活禽流感病毒原液

禽流感病毒粒径一般约为 100–120 nm^[10], 结合不同分析型凝胶过滤色谱柱的孔径和有效分离范围, 考察了 TSKgel G4000 PWxl、TSKgel G5000 PWxl 和 TSKgel G6000 PWxl 这 3 种色谱柱对 H5N8 灭活禽流感病毒原液中完整病毒颗粒的分离检测效果。其中, TSKgel G4000 和 TSKgel G5000 检测时, 因病毒颗粒尺寸较大而无法进入色谱基质的孔道, 一般在外水体积即 10.0 min 前洗脱; 而 TSKgel G6000 色谱基质孔径较大, 病毒颗粒可以进入基质的孔道, 洗脱时间一般在 10.0–15.0 min^[17]。如图 1A 所示, 病毒原液经 TSKgel G4000 和 TSKgel G5000 后在 9.0 min 左右出现了明显的蛋白紫外吸收峰,

且 TSKgel G4000 中 9.0 min 左右的吸收峰更高以及与其他杂质峰有更好的区分度; 而 TSKgel G6000 直到 15.0 min 后才出现很小的洗脱峰。为了进一步确定 TSKgel G4000 检测过程中 9.0 min 左右的洗脱峰为 H5N8 病毒颗粒的特征吸收峰, 利用抗原和阳性血清抗体会特异性结合形成沉淀的特性, 在病毒原液中加入 H5N8 的抗体结合离心后再进行检测。检测结果如图 1B 所示, 抗原+抗体组在 9.0 min 的吸收峰相较于单独的抗原组吸收峰明显降低, 说明此峰确实为 H5N8 病毒颗粒的特征吸收峰。值得注意的是, 抗体样品在 9.3 min 的洗脱峰为杂质吸收峰。进一步对 TSKgel G4000 检测中 H5N8 病毒颗粒的特征吸收峰进行 SDS-PAGE 检测分析, 结果如图 1C 所示, 除了组成 H5N8 病毒的亚基蛋白组分外, 还有其他杂蛋白。因此, 直接使用 HPSEC 难以对样品进行准确分析, 为了排除杂蛋白的干扰, 需要对病毒原液进行纯化预处理。

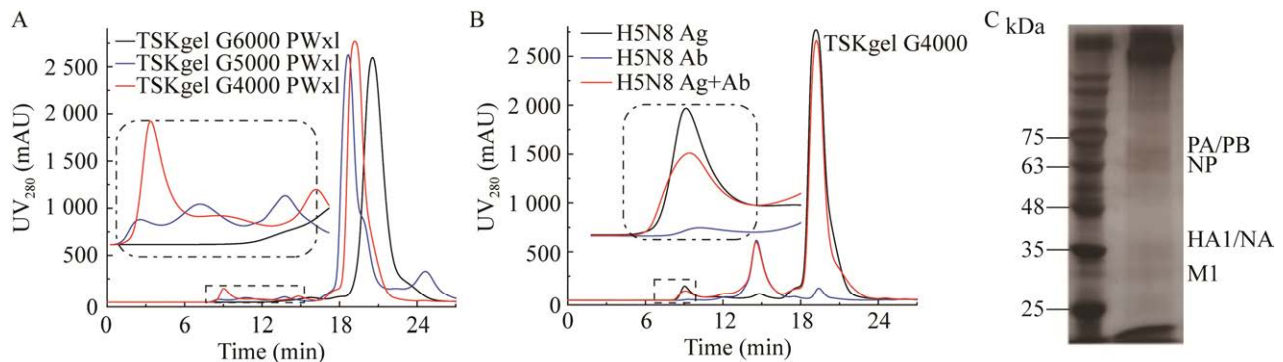


图 1 利用 HPSEC 检测 H5N8 灭活禽流感病毒原液 A: 不同色谱柱直接检测原液的色谱图. B: TSKgel G4000 色谱柱检测 H5N8 病毒抗原(antigen, Ag)、原液阳性血清抗体(antibody, Ab)以及二者(Ag+Ab)混合后的上清液. C: SDS-PAGE 检测 TSKgel G4000 图谱中 8.5–10.0 min 特征吸收峰样品(右侧), 左侧泳道为蛋白 marker

Figure 1 HPSEC analysis of H5N8 inactivated avian influenza virus antigen solution. A: Chromatogram of H5N8 analyzed using different columns. B: Chromatograms of H5N8 antigen (Ag), the H5N8-positive serum antibody (Ab), and the supernatant of their mixture solution (Ag+Ab) analyzed by TSKgel G4000 column. C: SDS-PAGE analysis of characteristic peak eluted from TSKgel G4000 column at 8.5–10.0 min (the right lane), the left lane was the protein marker.

2.2 PEG 沉淀法预处理

PEG 是一种高分子直链聚合物, 可以改变溶剂的介电常数, 降低蛋白的溶解度, 常用于蛋白质和病毒抗原的沉淀分离^[18]。本研究向灭活禽流感病毒抗原原液中加入终浓度为 4%–12% 的 PEG-6000 进行沉淀。结果如表 1 所示, 4% 的 PEG-6000 即可以使病毒颗粒发生沉淀, 沉淀复溶后的病毒血凝回收率为 50.00%, 蛋白去除率为 98.09%; 然而随着 PEG-6000 浓度进一步增大, 沉淀复溶液中的病毒血凝回收率反而降低, 推测 PEG 浓度增加导致复溶困难而损失了大量病毒颗粒。因此, PEG-6000 沉淀法不适宜于 H5N8 灭活病毒的预处理。

2.3 阴离子交换层析法预处理

禽流感病毒等电点在 6.50 左右^[19], 可采用阴离子交换层析对灭活病毒原液进行初步纯化。本研究选取 Q FF 和 DEAE FF 两种阴离子

交换介质进行纯化。根据灭活病毒原液中的无机盐浓度, 考虑采用以下 2 种上样方式进行纯化。从表 2 中的 HA 血凝回收率可知, 利用 DEAE FF 和 Q FF 介质直接上样纯化, 分别有 62.50% 和 87.50% 的 H5N8 病毒在穿透液中。推测原因是样品和平衡液中均含有较高浓度的无机盐, 导致病毒颗粒并不能很好地与介质结合。同时发现, 利用 DEAE FF 介质纯化预处理, 洗脱液中病毒收率更高, 因此, 后续稀释上样主要评价 DEAE FF 纯化效果。图 2C 是 DEAE FF 稀释上样的层析图谱, 结合表 2 中的数据可知, 其中 86.87% 的杂质蛋白穿透, H5N8 灭活病毒与介质结合且洗脱血凝回收率可达 100.00%。对洗脱样品进行 SDS-PAGE 和 HPSEC 分析, 如图 2D 所示, 可以清晰地看到病毒的 M1、HA1/NA、NP、PA/PB 蛋白条带, 其他杂质蛋白很少, 说明 IEC 预处理起到了很好的纯化作

表 1 H5N8 禽流感病毒抗原 PEG-6000 沉淀复溶液中抗原血凝回收率和蛋白去除率

Table 1 Antigen hemagglutination recovery and protein removal rates of H5N8 avian influenza virus in the re-dissolved precipitation after PEG-6000 treatment

Concentration of PEG (% W/V)	HA titer	HA recovery (%)	Protein concentration (mg/mL)	Protein removal rate (%)
4	1:2 ¹¹	50.00	0.40	98.09
6	1:2 ¹¹	50.00	0.24	98.85
8	1:2 ¹⁰	25.00	0.31	98.52
10	1:2 ⁹	12.50	0.29	98.62
12	1:2 ⁸	6.25	0.47	97.76

Protein concentration in H5N8 antigen solution: 5.24 mg/mL; HA titer: 1:2¹⁰.

表 2 离子交换预处理样品血凝回收率汇总表

Table 2 Purification of H5N8 by IEC

Category	HA titer	HA recovery (%)	Protein concentration (mg/mL)	Protein removal rate (%)
Q FF				
Directly loaded				
Flow-through (7.0 mL)	1:2 ⁷	87.50	0.59	21.05
Elution (3.5 mL)	1:2 ⁶	21.88	0.46	69.09
DEAE FF				
Directly loaded				
Flow-through (5.0 mL)	1:2 ⁷	62.50	0.81	22.81
Elution (3.5 mL)	1:2 ⁷	43.75	0.21	86.18
Dilute twice for sample loading				
Elution (2.0 mL)	1:2 ⁸	100.00	0.17	86.87

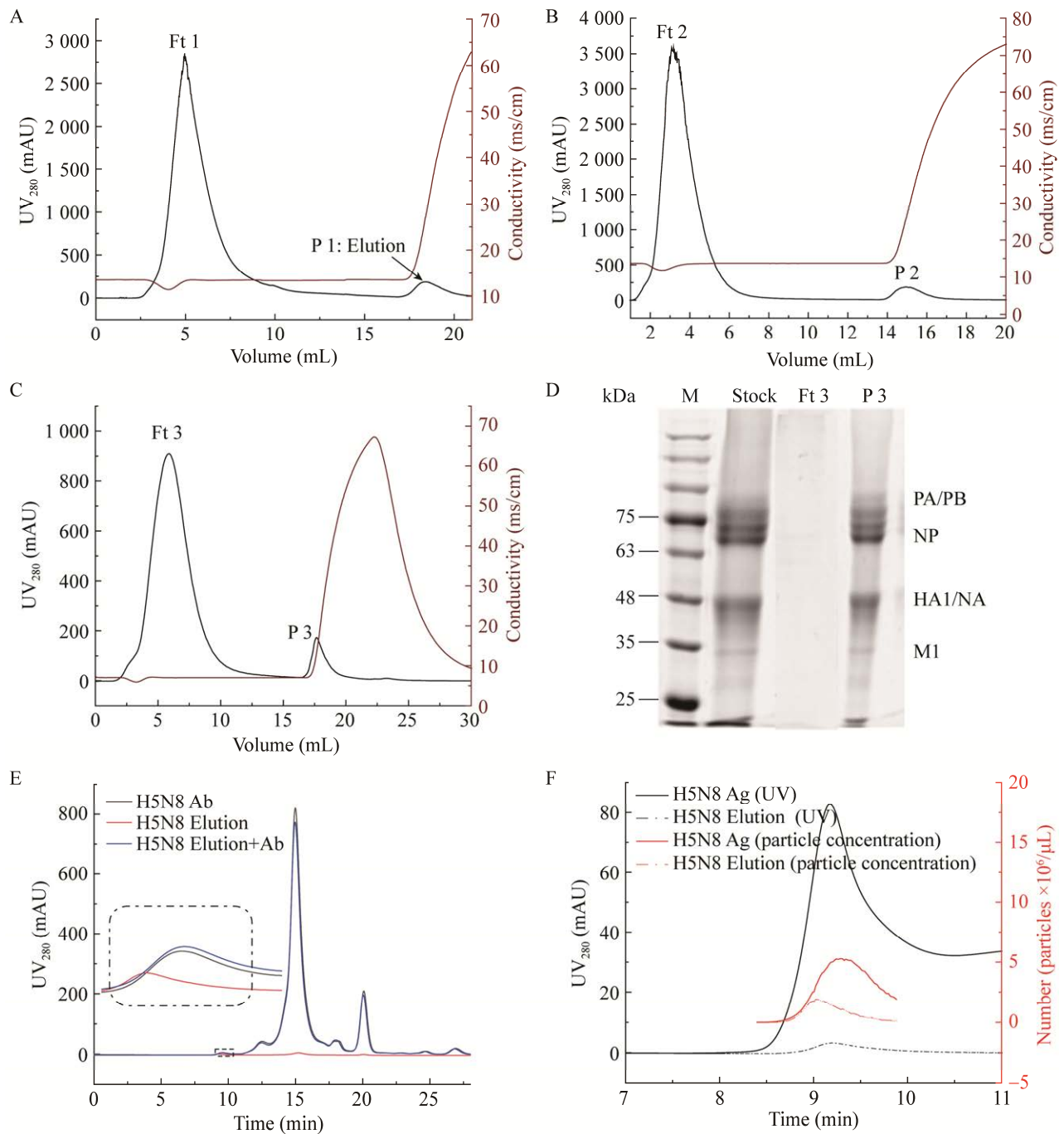


图2 离子交换层析预处理 H5N8 灭活禽流感病毒原料液 A: Q FF 介质(直接上样). B: DEAE FF 介质(直接上样). C: 原料稀释两倍后上样 DEAE FF 介质的纯化谱图. 经 DEAE FF 纯化预处理洗脱峰的检测. D: 纯化前后 SDS-PAGE. E: HPSEC 色谱图. F: MALLS 病毒颗粒数分析图

Figure 2 Ion exchange chromatographic pretreatment of H5N8 inactivated avian influenza virus feedstocks. A: Q FF (directly loaded). B: DEAE FF (directly loaded). C: DEAE FF (loaded after 2-fold dilution) twice diluted on sample). Analysis of the eluted peaks after DEAE FF purification pretreatment. D: SDS-PAGE before and after purification. E: HPSEC chromatogram. F: Viral particle number analysis by MALLS.

用。分析图 2E 中 HPSEC 的检测图谱发现,洗脱样品与抗体混合后,病毒颗粒的特征吸收峰完全消失,表明 IEC 预处理已经去除了干扰 H5N8 病毒 HPSEC 检测的杂蛋白。

此外,通过将 HPSEC 与 MALLs 联用,可以直接检测原液以及 IEC 预处理后样品中的完整病毒数,如图 2F 所示,其中 H5N8 抗原原液(4 倍稀释)的颗粒浓度为 3.37×10^6 个/ μL ; IEC 洗脱样品的颗粒浓度为 2.01×10^6 个/ μL 。经过计算可知洗脱样品颗粒回收率为 74.55%,表 2 的血凝实验数据已经证实 H5N8 灭活病毒经过预处理并没有损失,也说明 HPSEC 直接检测原液时的病毒吸收峰中含有一定量的杂质蛋白,影响了 HPSEC-MALLs 对完整 H5N8 颗粒数的定量,

进一步证实了预处理去除干扰蛋白的重要性。

2.4 定量检测 IEC 预处理后 H5N8 样品中病毒颗粒含量方法的建立

为了对 HPSEC 检测 DEAE 介质预处理后样品进行定量检测,首先对 HPSEC 检测 H5N8 病毒吸收峰的纯度和颗粒性质进行分析。收集 HPSEC 中 9.0 min 处的吸收峰进行电泳检测,如图 3A 所示,条带均为 H5N8 病毒的亚基蛋白,且与文献中报道的病毒条带分子量一致^[13],说明经过 DEAE 预处理后干扰蛋白质被去除。进一步用 MALLs 测定收集样品的分子量为 2.96×10^5 kDa (图 3B)。DLS 检测平均粒径为 127.7 nm (PDI: 0.281) (图 3C);透射电镜检测观察到完整的病毒颗粒,且形态均一(图 3D)。

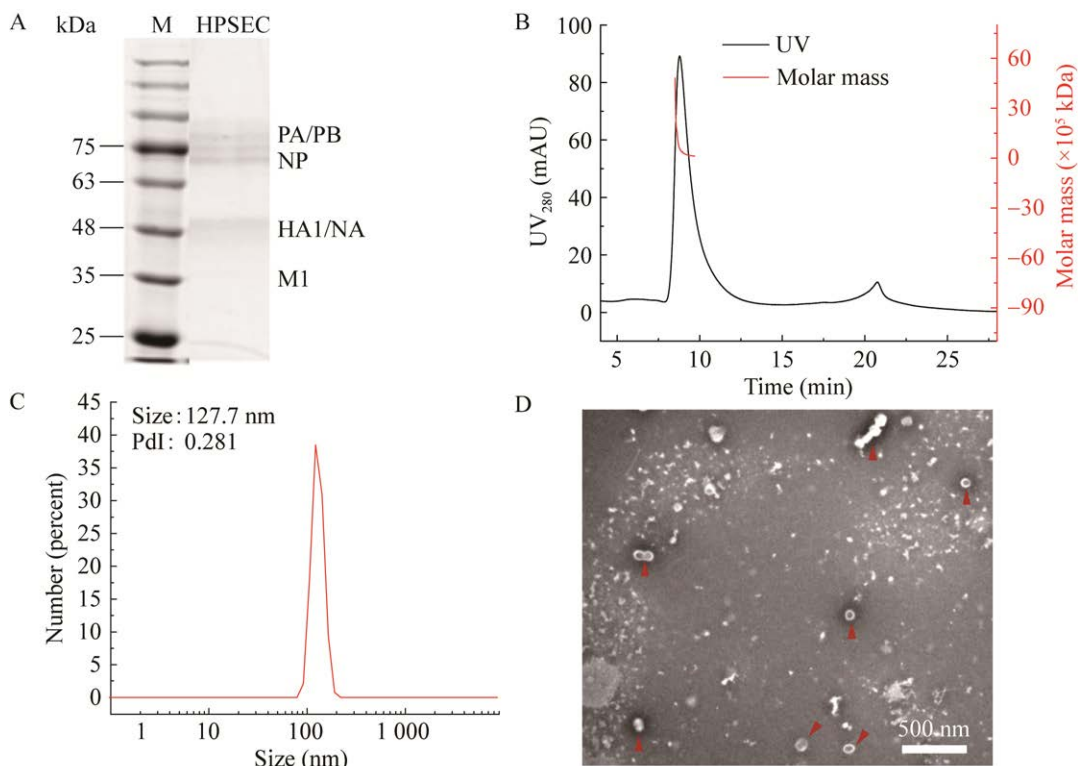


图 3 对 DEAE FF 预处理后 HPSEC 中 H5N8 灭活禽流感病毒特征峰检测 A: SDS-PAGE 检测图. B: 分子量检测. C: DLS 粒径检测图. D: TEM 表征图. 红色箭头指向为灭活禽流感病毒颗粒

Figure 3 The characteristic peaks of H5N8 inactivated avian influenza virus in HPSEC after DEAE FF pretreatment were detected. A: SDS-PAGE. B: Molecular weight detection. C: DLS particle size detection map. D: TEM characterization. Red arrow indicates inactivated avian influenza virus particles.

为了建立 H5N8 样品中病毒颗粒含量的定量检测方法, 收集 IEC 预纯化后的 TSKgel G4000 HPSEC 中病毒特征吸收峰样品, 以此作为灭活禽流感病毒纯品, 系列稀释后上样 HPSEC-MALLs 检测, 获得病毒颗粒数和紫外吸收峰面积。以完整病毒颗粒数为纵坐标, 以峰面积为横坐标进行线性拟合, 得到一元一次方程 $y=0.003\ 6x-0.613$, $R^2=0.997$ 。结果表明, 样品颗粒紫外峰面积与颗粒数呈良好线性关系。在后续样品定量检测时, 根据初步纯化的 H5N8 颗粒紫外峰面积, 即可计算得到完整病毒的颗粒数。

此外对 HPSEC-MALLs 检测方法的检测限 (limits of detection, LOD) 和定量限 (limit of quantification, LOQ) 进行了考察。将流动相作为空白对照, 重复上样, 以对照溶液响应值的 3 倍标准偏差 (3SD) 所对应的待测样品颗粒数为 LOD, 10 倍标准偏差 (10SD) 所对应的待测样品颗粒数为 LOQ。其中, 空白对照溶液的响应值可由仪器直接分析得到为 0.007 3 AU, 将其代入图 4C 中颗粒数与峰高的标准曲线, 计算可得 LOD 和 LOQ 分别为 3.73 个/mL 和 12.55×10^6 个/mL 完整颗粒。

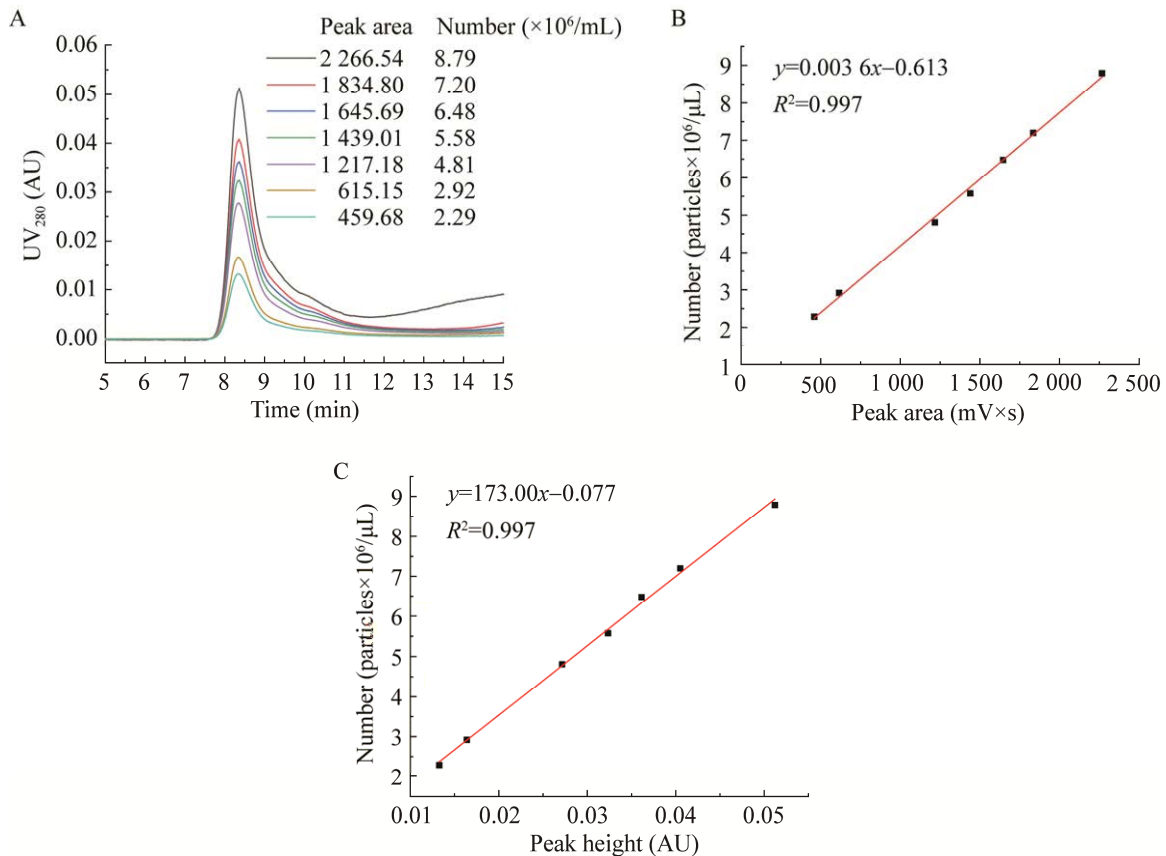


图 4 HPSEC-MALLs 法测定 H5N8 完整颗粒含量 A: H5N8 纯品 HPSEC 图谱. B: 紫外峰面积与颗粒数校准曲线. C: 紫外峰峰高与颗粒数校准曲线

Figure 4 The complete particle content of H5N8 was determined by HPSEC-MALLs method. A: HPSEC of H5N8. B: Calibration curve of UV peak area and particle number. C: Calibration curve of UV peak height and particle number.

2.5 HPSEC-MALLS 定量 H5N8 病毒颗粒的方法学验证

对上述建立的 DEAE FF 介质预处理耦合 HPSEC-MALLS 定量的方法进行重复性和适用性验证,重复测定不同批次和不同浓度的 H5N8 灭活病毒原液中的完整病毒颗粒含量。从表 3 可以看出,对于不同的抗原批次和同批次的不同浓度的样品,每组 3 次重复实验的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于 3%,说明定量方法具有良好的重复性和稳定性;同时,对比不同批次病毒原液和血凝滴度,可以发现颗粒浓度与 HA 滴度之间存在良好的正相关性,例如:批次 1 样品中的颗粒浓度 3 次检测的均值为 3.16×10^6 个/ μL ,血凝滴度为 $1:2^{10}$;批次 2 样品中的颗粒浓度 3 次检测的均值为 2.91×10^6 个/ μL ,血凝滴度为 $1:2^{10}$ 。这一结果进一步说明预处理过程不会造成血凝滴度的损失,所建立的 IEC 预处理耦合 HPSEC-MALLS 的颗粒定量方法具有可行性。当然,如果原料液在储存过程中发生病毒颗粒裂解,经离子交换预处理可能会去除这部分裂解的 HA 蛋白,引起血凝收率的降低。利用本文建立的方法对完整

的病毒颗粒含量的变化进行监测,则可以更加准确地获得疫苗抗原质量的变化情况。

2.6 颗粒定量方法在 H7N9 灭活病毒中的应用

将 HPSEC-MALLS 颗粒定量方法进一步拓展应用于 H7N9 灭活禽流感病毒颗粒的定量研究。如图 5A 所示,经过 DEAE FF 预处理后的样品,与抗体混合后,特征吸收峰完全消失;且该峰的 SDS-PAGE 检测中(图 5B)显示均为病毒的亚基蛋白,说明预处理去除了 HPSEC 中干扰 H7N9 完整颗粒检测的杂质蛋白。因此,DEAE FF 介质预处理耦合 HPSEC 检测可以应用在 H7N9 灭活病毒的定量检测中。

利用 HPSEC-MALLS 检测 H7N9 病毒抗原纯品,获得特征峰处完整病毒颗粒数和紫外吸收峰面积。以完整病毒颗粒数为纵坐标,以峰面积为横坐标进行线性拟合,得到一元一次方程 $y=0.0072x-0.67$, $R^2=0.998$ 。根据建立的线性关系,对 2 个批次的 H7N9 病毒原液进行定量分析,基于 HPSEC 特征峰面积计算可得对应料液中的 H7N9 完整病毒颗粒数目。从表 4 中可以发现,2 个批次所含的 H7N9 的病毒颗粒浓

表 3 不同批次 H5N8 灭活病毒纯化后样品定量分析

Table 3 Quantitative analysis of different batches of pre-treated H5N8 inactivated virus antigen

Batches and protein concentration (mg/mL)	Experiment	HA titer	Peak area (mV \times s)	Particle concentration (particles $\times 10^6/\mu\text{L}$)	RSD (%)
Batch 1 (4.70)	1	$1:2^{10}$	1 069.26	3.24	1.2
	2	$1:2^{10}$	1 031.90	3.10	
	3	$1:2^{10}$	1 046.55	3.15	
Batch 2 (10.48)	1	$1:2^{11}$	1 740.00	5.65	2.9
	2	$1:2^{11}$	1 838.00	6.00	
	3	$1:2^{11}$	1 759.89	5.72	
Batch 2 (5.24)	1	$1:2^{10}$	1 005.92	3.01	2.5
	2	$1:2^{10}$	958.47	2.84	
	3	$1:2^{10}$	970.85	2.88	
Batch 2 (2.71)	1	$1:2^9$	567.87	1.43	2.5
	2	$1:2^9$	540.21	1.33	
	3	$1:2^9$	555.18	1.39	

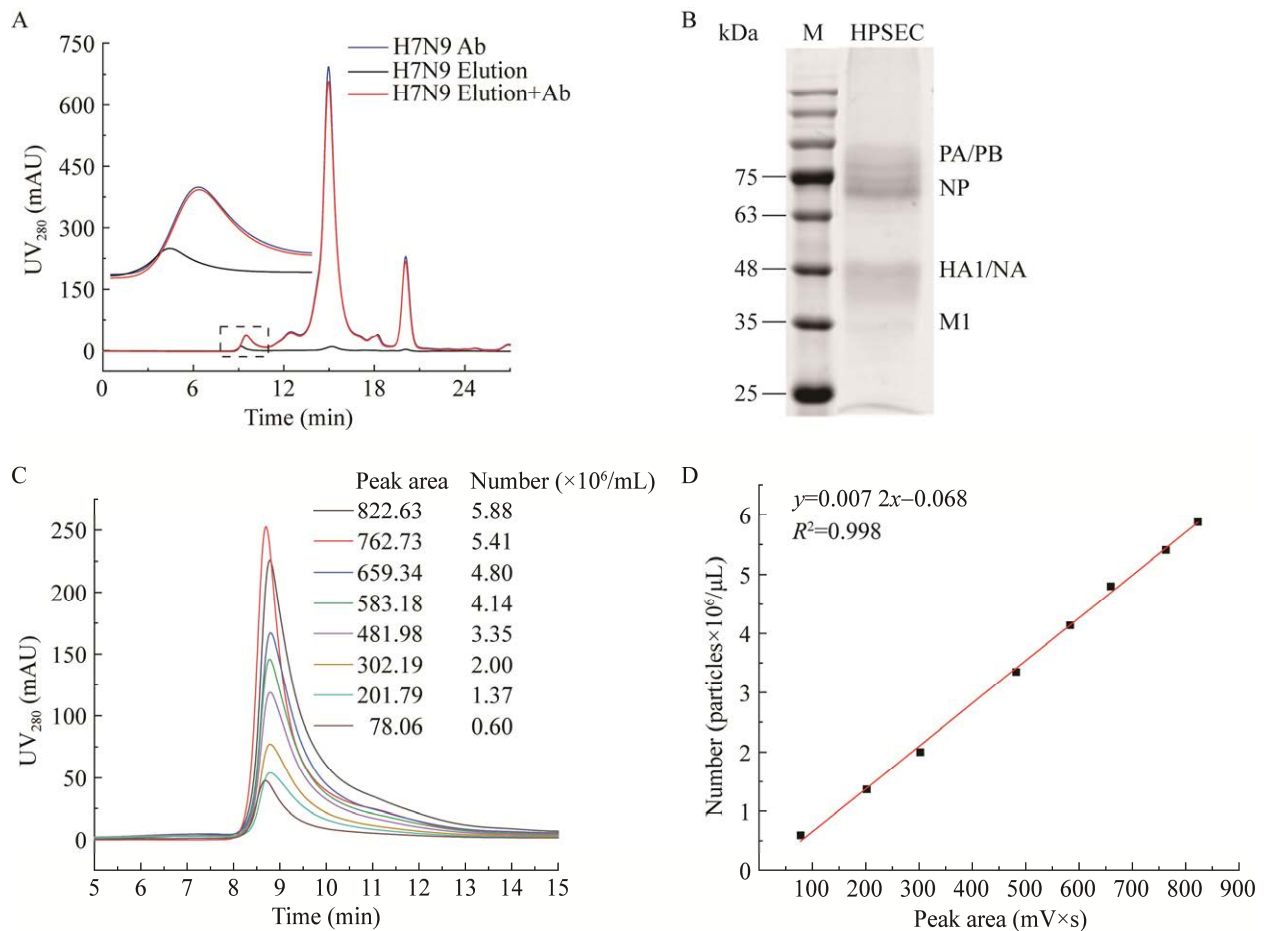


图5 离子交换层析预处理 H7N9 灭活禽流感病毒原料液 A: HPSEC 检测图谱. B: SDS-PAGE 检测图. C: H7N9 纯品 HPSEC 图谱. D: 紫外峰面积与颗粒数校准曲线

Figure 5 Ion exchange chromatographic pretreatment of H7N9 inactivated avian influenza virus feedstocks. A: HPSEC chromatogram. B: SDS-PAGE. C: HPSEC chromatograms of H5N8 virus. D: Calibration curve of UV peak area and particle number.

表4 不同批次 H7N9 灭活病毒 DEAE FF 预处理样品的紫外吸收峰面积和颗粒数、血凝滴度

Table 4 UV absorption peak area, particle number and hemagglutination titer of DEAE FF pretreated samples from different batches of H7N9 inactivated virus

Batch	Peak area (mV×s)	Particle concentration (particles×10 ⁶ /μL)	HA titer
Batch 1	972.97±0.46	6.97	1:2 ¹¹
Batch 2	1 058.68±0.65	7.07	1:2 ¹¹

Protein concentration in H7N9 antigen solution: 4.37 mg/mL; HA titer: 1:2¹¹.

度基本一致,而且测定的血凝滴度也相同,进一步说明了建立的 HPSEC-MALLs 颗粒定量方法也适用于不同的禽流感亚型的检测。

3 讨论与结论

目前禽流感病毒抗原定量的方法有血凝法、反相高效液相等,主要是基于 HA 含量进行检测和定量^[20],但对于灭活全病毒疫苗,完整的颗粒结构往往是发挥免疫效力的基础,

建立对灭活禽流感病毒完整颗粒定量的方法具有重要意义。HPSEC 根据蛋白质尺寸不同,在色谱柱中的路径不同而实现分离,广泛应用在其他疫苗或病毒样颗粒方面^[16],HPSEC-MALLS 也被用于腺病毒和病毒样颗粒的检测和定量分析。本研究以 H5N8 和 H7N9 灭活禽流感病毒抗原为研究对象,直接采用 HPSEC 进行定量时,颗粒特征吸收峰会受杂质干扰。结合病毒颗粒的理化性质,采用 DEAE FF 阴离子交换层析对原料液进行纯化预处理,排除了杂质对 HPSEC 检测颗粒的干扰,且不会造成病毒颗粒的损失和结构破坏。进一步通过 HPSEC 耦合 MALLS 对不同浓度的抗原进行了完整病毒颗粒的分析,并建立了峰面积-完整颗粒数的定量方法,对不同亚型、批次和浓度的原液中完整病毒颗粒的定量检测均具有很好的适用性和重复性。

REFERENCES

- [1] LI M, XIE ZX, XIE ZQ, LIU JB, XIE LJ, DENG XW, LUO SS, FAN Q, HUANG L, HUANG JL, ZHANG YF, ZENG TT, WANG S. Simultaneous detection of eight avian influenza A virus subtypes by multiplex reverse transcription-PCR using a GeXP analyser[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 6183.
- [2] 云水丽, 刘艳玲, 格根塔娜. 禽流感疫苗研究进展[J]. *国外畜牧学(猪与禽)*, 2022, 42(5): 51-53.
YUN SL, LIU YL, GEGEN TN. Research progress of avian influenza vaccine[J]. *Animal Science Abroad (Pigs and Poultry)*, 2022, 42(5): 51-53 (in Chinese).
- [3] 蒋鸿翔. 禽流感灭活疫苗对鸡群的免疫防控探究[J]. *畜禽业*, 2022, 33(1): 67-68.
JIANG HX. Immune prevention and control of inactivated avian influenza vaccine on chickens[J]. *Livestock and Poultry Industry*, 2022, 33(1): 67-68 (in Chinese).
- [4] CHEN RA, LAI HZ, LI L, LIU YP, PAN WL, Zhang WY, XU JH, HE DS, TANG ZX. Genetic variation and phylogenetic analysis of hemagglutinin genes of H9 avian influenza viruses isolated in China during 2010–2012[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 165(3/4): 312-318.
- [5] LI CG, SHAO M, CUI XY, SONG YL, LI J, YUAN LY, FANG HH, LIANG ZL, CRY TD, LI FX, WANG JZ. Application of deglycosylation and electrophoresis to the quantification of influenza viral hemagglutinins facilitating the production of 2009 pandemic influenza (H1N1) vaccines at multiple manufacturing sites in China[J]. *Biologicals*, 2010, 38(2): 284-289.
- [6] MINOR P. Assaying the potency of influenza vaccines[J]. *Vaccines*, 2015, 3(1): 90-104.
- [7] GARCÍA-CAÑAS V, LORBETSKIE B, BERTRAND D, CYR TD, GIRARD M. Selective and quantitative detection of influenza virus proteins in commercial vaccines using two-dimensional high-performance liquid chromatography and fluorescence detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(8): 3164-3172.
- [8] TRICHT EV, GEURINK L, PAJIC B, NIJENHUIS J, BACKUS H, GERMANO M, SOMSEN GW, GRIEND CES. New capillary gel electrophoresis method for fast and accurate identification and quantification of multiple viral proteins in influenza vaccines[J]. *Talanta*, 2015, 144: 1030-1035.
- [9] ENGELHARDT OG, EDGE C, DUNLEAVY U, GUILFOYLE K, HARVEY R, MAJOR D, NEWMAN R, PENN R, SKELDON S, STOREY C, WHEELER J, WOOD J, MINOR P. Comparison of single radial immunodiffusion, SDS-PAGE and HPLC potency assays for inactivated influenza vaccines shows differences in ability to predict immunogenicity of haemagglutinin antigen[J]. *Vaccine*, 2018, 36(29): 4339-4345.
- [10] JING XH, PHY K, LI X, YE ZP. Increased hemagglutinin content in a reassortant 2009 pandemic H1N1 influenza virus with chimeric neuraminidase containing donor A/Puerto Rico/8/34 virus transmembrane and stalk domains[J]. *Vaccine*, 2012, 30(28): 4144-4152.
- [11] KAPTEYN JC, SAIDI MD, DIJKSTRA R, KARS C, TJON JC, WEVERLING G, VOCHT M, KOMPIER R, MONTFORT B, GUICHOUX J, GOUDSMIT J, LAGERWERF F. Haemagglutinin quantification and identification of influenza A&B strains propagated in PER.C6[®] cells: a novel RP-HPLC method[J]. *Vaccine*, 2006, 24(16): 3137-3144.
- [12] MOULICK A, RICHTER L, MILOSAVLJEVIC V, CERNEI N, HADDAD Y, ZITKA O, KOPEL P, HEGER Z, ADAM V. Advanced nanotechnologies in avian influenza: current status and future trends—a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 983: 42-53.

- [13] 彭成成, 吴熠潇, 刘旭平, 谭文松. H9N2 亚型禽流感病毒纯化及病毒 HA 蛋白定量方法研究[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(7): 2069-2078.
PENG CC, WU YX, LIU XP, TAN WS. Study on methods for purification of H9N2 subtype avian influenza virus and quantification of viral HA protein[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(7): 2069-2078 (in Chinese).
- [14] HARVEY R, WHEELER JX, WALLIS CL, ROBERTSON JS, ENGELHARDT OG. Quantitation of haemagglutinin in H5N1 influenza viruses reveals low haemagglutinin content of vaccine virus NIBRG-14 (H5N1)[J]. Vaccine, 2008, 26(51): 6550-6554.
- [15] BROWN F, CARTWRIGHT B. Dissociation of foot-and-mouth disease virus into its nucleic acid and protein components[J]. Nature, 1961, 192(4808): 1163-1164.
- [16] YANG YY, LI H, LI ZJ, ZHANG Y, ZHANG SP, CHEN Y, YU MR, MA GH, SU ZG. 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): 1143-1150.
- [17] VAJDA J, WEBER D, BREKEL D, HUNDT B, MÜLLER E. Size distribution analysis of influenza virus particles using size exclusion chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1465: 117-125.
- [18] 黄静, 杨宇峰, 卞慧芳, 郁正艳, 徐进, 吴自荣. 聚乙二醇修饰蛋白的快速分离与纯化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(4): 191-196.
HUANG J, YANG YF, BIAN HF, YU ZY, XU J, WU ZR. Rapid isolation and purification of pegylated proteins[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2009, 37(4): 191-196 (in Chinese).
- [19] HORKA M, KUBICEK O, KUBESOVA A, ROSENBERGOVA K, KUBICKOVA Z, SLSIS K. Rapid separation and identification of the subtypes of swine and equine influenza A viruses by electromigration techniques with UV and fluorometric detection[J]. Analyst, 2011, 136(14):3010-3015.
- [20] DUROUS L, JULIEN T, PADEY B, TRAVERSIER A, ROSA-CALATRAVA M, BLUM L, MARQUETTE C, PETIOT E. SPRi-based hemagglutinin quantitative assay for influenza vaccine production monitoring[J]. Vaccine, 2019, 37(12): 1614-1621.

(本文责编 郝丽芳)