

# 口蹄疫 O 型、A 型二价灭活疫苗 146S 抗原含量对比评价

武永兴 黄二军 李彦莹 张辉 于刚\*

西安草滩农场有限公司华阴奶牛一场

DOI:10.32629/as.v8i12.3561

**[摘要]** 世界范围内预防口蹄疫的有效方法是进行疫苗免疫,因此口蹄疫疫苗的质量成为是否能有效预防口蹄疫的关键,而疫苗中146S的含量直接决定口蹄疫疫苗的质量和免疫效力。蔗糖密度梯度离心法(sucrose density gradient centrifugation,SDGC)是公认的经典测定口蹄疫146S抗原含量的方法,但存在检测耗时长、过程复杂、重复性差等缺点,影响疫苗的质量监测。使用高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography,HPLC)检测口蹄疫灭活疫苗146S抗原含量,是一种简便、快速、高效、干扰少的测定方法。结果表明,我们在市场上购买了23份牛用口蹄疫O型、A型二价灭活疫苗,使用HPLC法检测146S抗原含量,23份样品均满足国家要求,合格率为100%,但是,不同企业不同批次疫苗146S含量之间仍存在较大差异。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 口蹄疫; 灭活疫苗; 146S

**中图分类号:** S852.4+3 **文献标识码:** A

## Comparative Evaluation of 146S Antigen Content in Inactivated Bivalent Vaccine (Serotype O and A) against Foot-and-Mouth Disease

Yongxing Wu Erjun Huang Yanying Li Hui Zhang Gang Yu\*

Huayin Dairy Farm No.1 of Xi'an Caotan Farm Co., Ltd.

**[Abstract]** The effective way to prevent foot-and-mouth disease worldwide is through vaccination. Therefore, the quality of the foot-and-mouth disease vaccine is the key to whether it can effectively prevent foot-and-mouth disease, and the content of 146S in the vaccine directly determines the quality and immune efficacy of the foot-and-mouth disease vaccine. sucrose density gradient centrifugation (SDGC) is recognized as a classic method for determining the 146S antigen content of foot-and-mouth disease. However, it has disadvantages such as long detection time, complex process and poor repeatability, which affect the quality monitoring of vaccines. The detection of 146S antigen content of inactivated foot-and-mouth disease vaccine by high-performance liquid chromatography (HPLC) is a simple, rapid, efficient and less interfering determination method. The results showed that we purchased 23 doses of bivalent inactivated vaccines of foot-and-mouth disease type O and type A for cattle in the market. The content of 146S antigen was detected by HPLC. All 23 samples met the national requirements, with a qualification rate of 100%. However, there were still significant differences in the content of 146S among vaccines from different enterprises and different batches.

**[Key words]** High performance liquid chromatography; Foot-and-mouth disease; Inactivated vaccine; 146S

口蹄疫是对养猪业危害非常严重的传染病之一。我国对口蹄疫的防控政策是以强制免疫为主、扑杀为辅的策略方针<sup>[1-2]</sup>。口蹄疫疫苗对动物的有效性主要取决于两个方面,首先是疫苗毒株与流行毒株的匹配程度,其次是疫苗中有效抗原含量<sup>[3]</sup>。目前国内各口蹄疫疫苗生产企业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<sup>[4]</sup>。蔗糖密度梯度离心法的操作过程复杂,耗时长,而且不同单位、不同人员操作,检测结果存在较大误差,对操作人员的要求较高,制约了检测方法的

推广。为了解决这个问题,国内外专家积极开发了其他的口蹄疫病毒146S抗原含量检测方法。有研究通过制备级体积排阻色谱将口蹄疫疫苗中的146S与其它杂质分离,采用紫外检测器检测其特征吸收峰,并经过对比,证明体积排阻色谱检测结果与蔗糖密度梯度离心法具有一致性<sup>[5]</sup>。在此基础上,又发展出采用高效液相色谱法测定146S抗原含量,通过高效液相色谱系统及分析色谱柱可进行自动化、高通量、高灵敏度的测定<sup>[6]</sup>。

### 1 设备与材料

## 1.1 设备

设备名称	生产厂家	型号
高效液相色谱仪	安捷伦	1220
pH计	梅特勒-托利多精密仪器有限公司	S210
电子天平	梅特勒-托利多精密仪器有限公司	LE104E/02
高速离心机	德国艾本德	5810R Eppendorf

## 1.2 试剂与耗材

正丁醇(分析纯)、 $\text{NaH}_2\text{P}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (分析纯)、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ (分析纯)、15ml离心管、0.22 $\mu\text{m}$ 针头过滤器或0.45 $\mu\text{m}$ 针头过滤器一次性注射器、100-1000 $\mu\text{l}$ 枪头。

## 1.3 疫苗

分别在三个时间段,在陕西购买不同厂家、不同批次牛用口蹄疫O型、A型二价灭活疫苗。其中,2024年12月购买了6个厂家1个批次疫苗;2025年2月购买了6个厂家12个批次疫苗;2025年4月购买了5个厂家5个批次疫苗。各生产厂家编号之间无关联性。

## 2 检验操作

## 2.1 检测原理

依据体积排阻-高效液相色谱的方法对口蹄疫146S抗原蛋白进行检测。体积排阻色谱法是以多孔凝胶为固定相,借助精确控制凝胶孔径的大小,使样品中的大分子不能进入凝胶孔洞而被排阻,只能沿着多孔凝胶粒子之间的空隙通过色谱柱,首先被流动相冲洗出来;中等大小的分子能进入凝胶的一些孔洞中,但不能进入较小的孔洞,较慢地从柱中洗脱。小分子能进入绝大部分凝胶孔径,最后从柱中洗脱从而实现样品中不同大小分子的分离。处理后的样品经色谱柱分离,逐一流向检测器,检测器捕捉到蛋白质的紫外吸收信号后,将光信号转换成电信号,再将电信号转换为数字信号,经软件处理后,形成液相色谱图。

样品146S的定量采用外标法,即使用已经定量的146S标准品,进行梯度稀释,上样检测后,绘制峰面积-146S含量标准曲线,根据标准曲线对样品中146S进行定量分析。

## 2.2 试剂准备

(1)流动相:每升流动相称取1.01g $\text{NaH}_2\text{P}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,6.18g $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,14.20g $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,称量完成后,用市售娃哈哈纯净水溶解,定容至相应体积,用0.45 $\mu\text{m}$ 膜过滤后,超声脱气5min。

(2)超纯水:使用市售娃哈哈纯净水,用0.45 $\mu\text{m}$ 膜过滤后,超声脱气5min。

(3)42%PEG6000:称取42gPEG6000于250ml烧杯中,加适量蒸馏水,加热搅拌溶解PEG,待PEG完全溶解后,用自来水水浴,使其恢复至室温,用容量瓶定容至100ml。

(4)抗原复溶液:称取0.54g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,12.89g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,8.76g $\text{NaCl}$ ,0.20g $\text{KCl}$ ,用纯化水溶解,定容至1L,0.22 $\mu\text{m}$ 膜过滤后待用。

## 2.3 检验方法

(1)疫苗正丁醇破乳:在15ml离心管中加入疫苗9ml,再加入正丁醇1ml,剧烈振荡离心管5min使疫苗破乳,然后离心10min(4 $^\circ\text{C}$ ,4000rpm)。用注射器吸取最下层水相,用0.45 $\mu\text{m}$ 膜过滤后即可上机检测。

(2)仪器准备:将高效液相色谱仪氙灯进行预热30min以上,更换流动相及纯化水,排气后平衡系统。

(3)上机检测:根据《安捷伦1220型高效液相色谱仪标准操作程序》设置检测参数,上机检测,检测参数设置如下:A.流速:0.6ml/min;B.检测波长:259nm;C.进样量:100 $\mu\text{l}$ ;D.采集时长:30min。

## 2.4 结果计算

(1)标准品稀释:取146S标准品,按照需要的浓度,用流动相对标准品进行梯度稀释,稀释5~7个梯度。稀释完毕后按照标准品实际的含量与各梯度稀释比例,计算出每一梯度146S的实际含量值,以结合峰面积进行下一步的标准曲线绘制工作。

(2)绘制标准曲线:将数据输入Excel表格中,在左侧列一列峰面积或丰度,在右侧列一列标准品146S抗原蛋白含量,选中所列数据,依次执行【插入】、【x,y散点图】、【线性】,即可出现以146S抗原蛋白含量为横坐标,以峰面积纵坐标点状图,选中图中任意一点,右击,选【添加趋势线】并勾选【回归方程】及【R<sup>2</sup>】散点图即可中各点即被连成线,且由软件完成线性拟合,并显示回归方程及拟合常数R<sup>2</sup>值,R<sup>2</sup>应大于0.99。

(3)样品含量计算:样品图谱完成积分分析后,直接读取图谱中峰面积对应的数值,将该数值直接代入标准品峰面积-146S含量的标准曲线的回归方程,即可算出样品中的146S抗原蛋白含量。

## 3 结果与分析

## 3.1 高效液相色谱法标准曲线

高效液相色谱法标准曲线是系统自动积分,积分在259nm下的146S峰面积。以146S浓度为纵坐标,以峰面积为横坐标,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 $R^2=0.994$ ,大于0.99,符合标准曲线的标准,线性回归方程为: $y=825,353.537x+477,535.326$ 。标准曲线如图1。

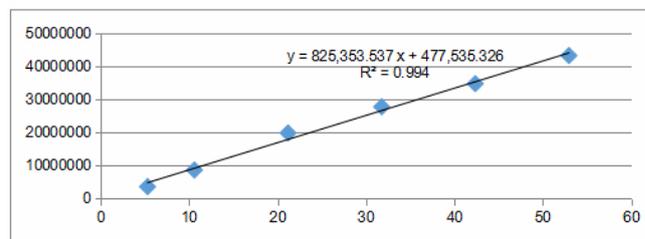


图1 高效液相色谱法标准曲线

## 3.2 疫苗样品高效液相色谱法检测结果

2024年12月购买6个批次疫苗,2025年2月购买12个批次疫苗,2025年4月购买5个批次疫苗,检测结果显示,所有批次疫苗抗原含量均达到国家标准(农业农村部公布产品质量标准:每头

份疫苗中146S含量应不低于1.0 μg),但是,不同企业和相同企业不同批次口蹄疫O型、A型灭活疫苗抗原含量存在差异。具体检测数据见表1~3。

表1 2024年12月陕西口蹄疫O型、A型二价灭活疫苗146S含量检测结果

样品编号	生产厂家	146S含量(μg/头份)
A1	厂家A	20.5
A2	厂家B	15.18
A3	厂家C	14.31
A4	厂家D	23.39
A5	厂家E	25.61
A6	厂家F	22.03

表2 2025年2月陕西口蹄疫O型、A型二价灭活疫苗146S含量检测结果

样品编号	生产厂家	146S含量(μg/头份)
B1	厂家A	12.08
B2	厂家B	29.33
B3	厂家C	12.18
B4	厂家D	33.74
B5	厂家E	11.54
B6	厂家F	16.66
B7	厂家F	26.48
B8	厂家F	25.89
B9	厂家A	14.14
B10	厂家A	14.9
B11	厂家B	27.89
B12	厂家B	27.08

表3 2025年4月陕西口蹄疫O型、A型二价灭活疫苗146S含量检测结果

编号	生产厂家	146S含量(μg/头份)
C1	厂家A	27.26
C2	厂家B	9.52
C3	厂家C	21.35
C4	厂家D	1.88
C5	厂家E	7.03

#### 4 讨论与结论

目前,我国具备口蹄疫灭活疫苗生产资质的企业有10家,每个疫苗企业总体的生产流程类似,都具备细胞悬浮培养工艺、抗原灭活工艺、抗原超速离心和浓缩纯化工艺等,但是生产工艺中的参数略有差异,因此所制备的疫苗中抗原浓度、盐离子成分等成分有所不同<sup>[7]</sup>,蔗糖密度梯度离心法的定量方法在操作过程中存在较大误差,可能导致疫苗在出厂时存在批间差异。由于口蹄疫疫苗在运输和保存过程中,会受到时间、温度、PH等变化,

造成抗原降解,这些因素也会造成疫苗检测抗原含量差异。

蔗糖密度梯度离心法检测口蹄疫146S抗原含量是一种标准方法,该方法操作较复杂,对仪器设备及人员操作要求较高<sup>[8-10]</sup>。文章中使用的液相色谱法是经过改进和优化的,加上标准品的参照,保证了检测数据的准确性。此种方法简单快捷、高效准确,适用于疫苗企业、养殖企业、第三方检测机构等对口蹄疫灭活疫苗抗原含量的评价。

#### [参考文献]

[1]徐小艳,陈昌海,梁永晔,等.口蹄疫O型、A型二价3B蛋白表位缺失灭活疫苗免疫安全性和抗体消长规律研究[J].中国猪业,2021,5(9):49-50.

[2]谭涛,任静雷,倪春霞,等.不同抗体检测方法对猪口蹄疫疫苗临床免疫效果的评估[J].中国猪业,2022,3(16):66-69.

[3]Rweyemamu M M,Umeshara 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(05):676-684.

[5]SOBRINO F,DOMINGO E.Foot and Mouth Disease Virus.CRC Press Inc,2017:292-293.

[6]SPITTELER M A,FERNANDEZ I,SCHABES E, KRIMER A,REGM LIER E G,GUINZBURG M.Foot and mouth disease(FMD) virus:quantification of whole virus particles during the vaccine manufacturing process by size exclusion chromatography[J].Vaccine, 2011,29:7182-7187.

[7]PATRICIA A S,SAMUEL R F.Characterization of virus adsorption by using DEAE-sepharose and octyl-sepharose[J].Applied and Environmental Microbiology,2002,68(8):3965-3968.

[8]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.

[9]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.

[10]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.

#### 作者简介:

武永兴(1983--),男,汉族,陕西渭南人,大学本科,助理畜牧师,研究方向:畜牧业。

于刚(1992--),男,汉族,河南息县人,大专,研究方向:畜牧业。