

生物工程学报
Chinese Journal of Biotechnology
ISSN 1000-3061, CN 11-1998/Q

《生物工程学报》网络首发论文

题目：应用高效体积排阻色谱偶联多角度激光散射鉴定猪圆环病毒 2 型灭活疫苗及病毒样颗粒疫苗抗原

作者：徐嫻, 杨延丽, 邹兴启, 李翠, 朱元源, 秦义娴, 李琰, 盛亚男, 刘业兵, 彭国瑞, 徐小艾, 张松平, 赵启祖

DOI: 10.13345/j.cjb.210937

收稿日期: 2021-12-22

网络首发日期: 2022-03-25

引用格式: 徐嫻, 杨延丽, 邹兴启, 李翠, 朱元源, 秦义娴, 李琰, 盛亚男, 刘业兵, 彭国瑞, 徐小艾, 张松平, 赵启祖. 应用高效体积排阻色谱偶联多角度激光散射鉴定猪圆环病毒 2 型灭活疫苗及病毒样颗粒疫苗抗原[J/OL]. 生物工程学报. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.210937>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

· 动物及兽医生物技术 ·

应用高效体积排阻色谱偶联多角度激光散射鉴定猪圆环病毒 2 型灭活疫苗及病毒样颗粒疫苗抗原

徐嫻^{1#}, 杨延丽^{2#}, 邹兴启¹, 李翠¹, 朱元源¹, 秦义娴¹, 李琰¹, 盛亚男^{2,3}, 刘业兵¹, 彭国瑞¹, 徐小艾¹, 张松平², 赵启祖¹

1 中国兽医药品监察所, 北京 100081

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

3 中国科学院大学 化学工程学院, 北京 100049

徐嫻, 杨延丽, 邹兴启, 李翠, 朱元源, 秦义娴, 李琰, 盛亚男, 刘业兵, 彭国瑞, 徐小艾, 张松平, 赵启祖. 应用高效体积排阻色谱偶联多角度激光散射鉴定猪圆环病毒 2 型灭活疫苗及病毒样颗粒疫苗抗原. 生物工程学报, 2022, 38

XU Yuan, YANG Yanli, ZOU Xingqi, LI Cui, ZHU Yuanyuan, QIN Yixian, LI Yan, SHENG Yanan, LIU Yebing, PENG Guorui, XU Xiaoi, ZHANG Songping, ZHAO Qizu. Characterization of the antigens in inactivated porcine circovirus type 2 vaccines and virus-like particle vaccines by high-performance size-exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering. Chin J Biotech, 2022, 38

摘要:旨在建立基于高效体积排阻色谱(high-performance size-exclusion chromatography, HPSEC)偶联多角度激光散射仪(multi-angle laser light scattering, MALLS)的猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)疫苗抗原检测方法。以纯化的 PCV2 灭活病毒及病毒样颗粒(virus-like particles, VLP)为参照,对 4 家生产企业的 2 种 PCV2 灭活病毒疫苗(a、b)及 VLP 疫苗(c、d)破乳后进行 HPSEC-MALLS 检测及分子量分析;结合 PCV2 抗原检测卡、Western blotting 和透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM),鉴定了特征色谱峰;考察了方法的重复性和检测线性。结果表明,两家企业生产的 PCV2 灭活病毒疫苗破乳液水相经 HPSEC 分离在保留时间约 13.3 min 处出现抗原特征峰;MALLS 计算该色谱峰分子量分别为 $2.61 \times 10^6 (\pm 4.34\%)$ Da 和 $2.40 \times 10^6 (\pm 2.51\%)$ Da。两种 VLP 疫苗也在 13.3 min 处出现抗原特征峰,分子量分别为 $2.09 \times 10^6 (\pm 2.94\%)$ Da 和 $2.88 \times 10^6 (\pm 11.85\%)$ Da,接近 PCV2 的理论分子量;同时在保留时间约 11.4 min 处也出现色谱峰,经检测分子量为 $4.37 \times 10^6 (\pm 0.42\%)$ Da,TEM 表征显示为 VLP 二聚体。取疫

Received: December 22, 2021; **Accepted:** March 22, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (21821005; 31970872); Special Fund for Veterinary Drug Industry in the Public Interest (GY202102)

Corresponding author: ZHAO Qizu. E-mail: zhaoqizu@163.com

基金项目:国家自然科学基金(21821005, 31970872);中国兽医药品监察所“兽药行业公益性重点专项”(GY202102)

苗 d 和 PCV2 VLP 纯品进行重复检测, 抗原色谱峰面积的 RSD ($n=3$) 均小于 1.5%, 重复性好; 将 PCV2 VLP 纯品梯度稀释检测, VLP 及其多聚体的色谱峰面积与浓度均呈良好的线性关系, R^2 分别为 0.999 及 0.997, 能够满足定量及多聚体含量分析。该方法有望成为一种准确、高效的 PCV2 疫苗的体外评价方法, 用于质量评价与提升。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; Cap 蛋白; 病毒样颗粒; 疫苗; 高效体积排阻色谱; 多角度激光散射

Characterization of the antigens in inactivated porcine circovirus type 2 vaccines and virus-like particle vaccines by high-performance size-exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering

XU Yuan^{1#}, YANG Yanli^{2#}, ZOU Xingqi¹, LI Cui¹, ZHU Yuanyuan¹, QIN Yixian¹, LI Yan¹, SHENG Yanan^{2,3}, LIU Yebing¹, PENG Guorui¹, XU Xiaoi¹, ZHANG Songping², ZHAO Qizu¹

1 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

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

3 School of Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: This paper aims to detect the antigens in porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) coupled with multi-angle laser light scattering (MALLS). With purified inactivated PCV2 and PCV2 virus-like particles (VLP) as references, two inactivated vaccines (a and b) and two VLP vaccines (c and d) for PCV2 from four manufacturers were analyzed by HPSEC-MALLS after demulsification. The antigen peaks in HPSEC-MALLS were identified by PCV2 antigen test strips, Western blotting, and transmission electron microscope (TEM). The repeatability and linearity of the method were investigated. The results showed the virus antigens in the two inactivated vaccines were eluted at about 13.3 min in HPSEC. The molecular weight of these antigens was 2.61×10^6 ($\pm 4.34\%$) Da and 2.40×10^6 ($\pm 2.51\%$) Da, respectively, as calculated by MALLS. The antigen peaks of the two VLP vaccines also appeared at 13.3 min and the molecular weight was 2.09×10^6 ($\pm 2.94\%$) Da and 2.88×10^6 ($\pm 11.85\%$) Da, respectively, which was close to the theoretical molecular weight of PCV2. Moreover, an antigen peak of VLP vaccine c was observed at 11.4 min and the molecular weight was 4.37×10^6 ($\pm 0.42\%$) Da. The antigen was verified to be the dimer of VLP by TEM. Vaccine d and purified Cap VLP antigens were tested repeatedly, and the RSD of the peak area ($n=3$) was all $< 1.5\%$, indicating that the method was repeatable. The purified VLP were diluted in serial and tested for linearity. The result suggested good linear relationship between the peak area of VLP or VLP aggregates and the protein concentration of the sample with R^2 of 0.999 and 0.997, respectively. Thus, the method met the requirement for quantification and aggregate analysis. This method is accurate and efficient in *in vitro* quality evaluation and improvement of PCV2 vaccine.

Keywords: porcine circovirus type 2 (PCV2); Cap; virus-like particles (VLP); vaccine; high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC); multi-angle laser light scattering (MALLS)

猪圆环病毒 (porcine circovirus, PCV) 是圆环病毒科(Circoviridae)圆环病毒属成员, 是迄今发现的脊椎动物最小的 DNA 病毒之一。目前已知的猪圆环病毒包括 4 个基因型(PCV1-4)^[1-2]。1974 年, 首次在德国分离的 PCV1 不具有致病性^[3-4]。20 世纪 90 年代末在断奶仔猪多系统衰竭综合征发病猪体内分离出 PCV2^[5]。经研究证明 PCV2 能引发多种症状, 如断奶仔猪多系统衰竭综合征、猪皮炎和肾病综合征、猪呼吸道疾病综合征等, 导致猪群出现大批量死亡, 对畜牧业经济造成了严重威胁^[6]。PCV3 和 PCV4 分别于 2016 年和 2019 年在美国和中国被首次发现^[7-8], 它们的致病性有待深入研究。

目前, 针对 PCV2 的防控措施是免疫接种疫苗。PCV2 疫苗以传统的灭活病毒疫苗和利用基因重组技术构建的亚单位疫苗为主。由于 PCV2 病毒体外增殖能力差, 导致灭活病毒疫苗中的病毒含量普遍较低。此外, 经油佐剂配制的灭活病毒疫苗接种动物后易导致局部不良反应。近年来利用大肠杆菌或杆状病毒等表达系统, 重组表达 PCV2 衣壳蛋白 Cap 制备的亚单位疫苗相继问世, 其中杆状病毒-昆虫细胞表达系统在高效表达可溶性外源蛋白上具有显著优势。PCV2 开放阅读框 2(ORF2) 编码的衣壳蛋白 Cap 是 PCV2 唯一的结构蛋白, 分子量为 26-30 kDa, 12 个 Cap 五聚体排列构成 PCV2 的二十面体对称结构^[9-11]。Cap 蛋白包含重要的中和抗原表位, 具有良好的免疫原性和反应原性。通过杆状病毒重组表达 PCV2 的 Cap 蛋白能够自组装成完整的病毒样颗粒(virus like particles, VLP), 其兼顾安全性和良好的免疫原性^[12]。目前国内已批准的 PCV2 疫苗产品有 11 个, 生产企业近 40 家, 并且一些国外的 PCV2 疫苗也已通过了我国进口兽药注册^[13]。然而众多的 PCV2 疫苗产品没有统一的效力评价和相应种类抗原含量的评价方法, 因此尚未形成统一的标准来评价现有的疫苗产品。

疫苗中抗原含量的高低直接影响疫苗的免疫效果。灭活病毒疫苗及 VLP 疫苗中的抗原通常具有复杂的颗粒结构^[14-15]。常用的酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)等方法往往难以区分具有不同颗粒结构的抗原^[16]。随着色谱技术的发展, 分离生物制品中直径在 10-100 nm 的颗粒已经成为可能^[17]。通过高效体积排阻色谱(high-performance size-exclusion chromatography, HPSEC)和多角度激光散射仪(multi-angle laser light scattering, MALLS)联用可以获取生物样品中的颗粒直径分布、分子质量及分布、颗粒的聚集情况等信息。该方法高效便捷、重复性好, 已在口蹄疫疫苗的质控中被广泛应用^[18-20], 可检测完整病毒粒子, 是对现有的动物实验法和 ELISA 方法有力的技术补充。本文旨在探索应用 HPSEC-MALLS 方法检测 PCV2 灭活疫苗及 VLP 疫苗抗原的新方法, 对疫苗中完整抗原颗粒进行分离鉴定, 并对线性、重复性进行考察, 以期为 PCV2 疫苗的质量控制和评价提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 检测样品

猪圆环病毒 2 型灭活病毒疫苗 2 批(编号为 a、b), 杆状病毒重组表达 VLP 亚单位疫苗 2 批(编

号为 c、d), 均来自不同生产企业。PCV2(YZ 株)经 PK-15 细胞培养并采用 BEI 灭活后的病毒液由扬州优邦生物药品有限公司提供。病毒液经过 8%(W/V)聚乙二醇 6 000 沉淀纯化后作为灭活病毒参照品。经纯化的杆状病毒-昆虫细胞表达的 PCV2 Cap VLP 抗原(浓度 3.65 mg/mL)参照品由扬州优邦生物药品有限公司提供。

1.1.2 主要仪器

LC-2010A HT 液相色谱仪(岛津); DAWN HELEOS II 型激光检测器, Optilab T-rEX 型示差检测器(Wyatt); SRT SEC-500 色谱柱(7.8 mm×300 mm, 赛分科技); 超滤浓缩管(10 K, MWCO, Thermo 公司); 电泳仪(Bio-Rad); FEI Tecnai 20 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM, Royal Philips Electronics)。

1.1.3 主要试剂

PCV2 单抗 7D7(本实验室制备及保存^[21]); HRP 羊抗鼠 IgG(Cwbiotech); 无水硫酸钠, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠, 三氯甲烷、氯化钠(国药集团, 分析纯)。猪圆环病毒 2 型抗原胶体金检测卡(北京标驰泽惠生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 疫苗破乳

使用三氯甲烷作为破乳剂, 按三氯甲烷与疫苗体积比 1 : 1、充分振荡混匀, 6 000 r/min 4 °C 离心 6 min, 取上层水相用于检测。

1.2.2 HPSEC-MALLS 检测

流动相: 50 mmol/L pH 7.4 磷酸缓冲液, 含 0.1 mmol/L 硫酸钠; 进样体积: 100 μL; 流速: 0.6 mL/min; 检测波长: 280 nm。采用上述色谱条件对破乳后的水相抗原进行检测。为了获得样品相对分子量, 分析柱连接至多角度激光散射仪(MALLS, DAWN EOS, λ=690 nm, Wyatt Technology Corp., USA) 及示差折光检测器(RI, OPTILAB DSP, Wyatt Technology Corp., USA)。流动相依次经过相连的 UV, MALLS 和 RI 检测器。样品相对分子量通过 ASTRA[®] 软件(Wyatt Technology, USA)计算获得。

1.2.3 PCV2 抗原鉴定

HPSEC 检测过程中, 收集疑似 PCV2 抗原颗粒保留时间附近的色谱峰。应用 PCV2 抗原检测卡检测 HPSEC 接取的样品。参照操作说明, 向检测卡样品孔中缓慢滴加 70 μL 样品, 水平放置 20 min 后观察结果。使用超滤浓缩管分别对 4 批疫苗收集到的样品进行高速离心, 浓缩 10-30 倍。浓缩液加入 4×非还原型蛋白变性缓冲液, 70 °C 水浴 10 min, 20 μL 上样, 进行 12% SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 将蛋白半干转移至 PVDF 膜, 用含 5%(W/V)脱脂奶的 PBST 4 °C 封闭过夜, PBS 洗涤 3 次, 进行 Western blotting 鉴定。一抗采用 PCV2 单抗 7D7(1:100 倍稀释), 二抗采用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:1 000 倍稀释)。

1.2.4 电镜检测

将 HPSEC 检测过程中接取的疑似 PCV2 抗原颗粒的色谱峰通过 FEI Tecnai 20 TEM 观察颗粒形貌。将少量样品滴至 400-网眼铜载网, 1%乙酸双氧铀染色干燥后测定。

1.2.5 检测重复性及峰面积与蛋白浓度的线性相关性

取疫苗 c 及 PCV2 Cap VLP 纯化抗原，连续进样 3 次，测量检测重复性。用灭菌磷酸盐缓冲液对 PCV2 Cap VLP 纯化抗原进行系列稀释，按上述色谱条件，进样 100 μL 检测。以仪器积分得到峰面积为纵坐标，以稀释后的蛋白浓度为横坐标，考察 HPSEC 检测 PCV2 VLP 峰面积与总蛋白浓度的线性相关性。

2 结果与分析

2.1 HPSEC-MALLS 检测结果

PCV2 病毒颗粒直径为 20–25 nm，选取 HPSEC 色谱柱基质孔径为 50 nm 左右的分析柱，理论上病毒可进入分析柱的孔道内部进行分离。由于大部分杂质蛋白尺寸较小，在 HPSEC 中保留时间与尺寸较大的病毒相比更晚，由此可能实现病毒与杂质的分离与分析。首先对经过纯化的 PCV2 灭活病毒及 Cap VLP 抗原参照品采用 HPSEC 检测，色谱图如图 1 所示。PCV2 灭活病毒和 Cap VLP 抗原分别在 13.3 min 和 13.2 min 左右有主要的吸收峰。病毒与其 VLP 有相近的尺寸，因此在 HPSEC 中具有相近的保留时间。此外，注意到 Cap VLP 抗原在 11.3 min 出现了一个较小的吸收峰。

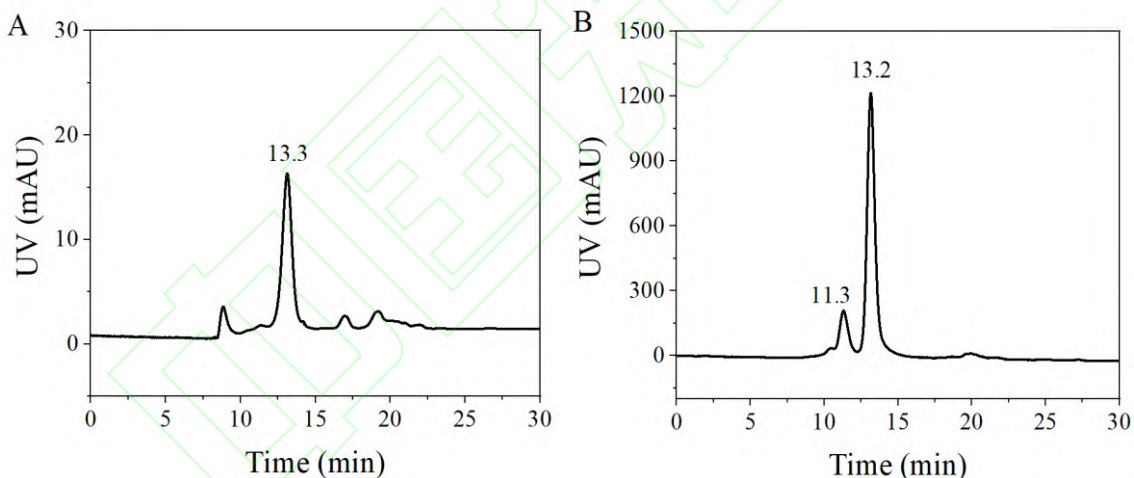


图 1 HPSEC-MALLS 检测(A)PCV2 灭活病毒及 (B)CAP VLP 抗原参照品.

Figure 1 HPSEC-MALLS analysis of (A) the purified inactivated PCV2 and (B) Cap VLP.

将 PCV2 两种灭活疫苗 a、b 及两种 VLP 疫苗 c、d 的破乳后水相分别采用 HPSEC-MALLS 检测，色谱图如图 2 所示。图 2A、图 2B 中显示 PCV2 灭活疫苗 a、b 具有类似的色谱图，主要色谱峰在 17–22 min 之间，该保留时间范围内为尺寸较小的蛋白质，因此认为可能是细胞培养液中的杂质。与 PCV2 灭活病毒参照品相同，在 13.3 min 左右，两种样品均出现一个较小的色谱峰(图 2 中的放大图)，尺寸大于大部分杂质，推测有可能是 PCV2。为了进一步验证，首先采用 MALLS 计算其分子量分布，结果如图 2。该色谱峰的平均分子量分别为 $2.61 \times 10^6 (\pm 4.34\%) \text{Da}$ 及 $2.40 \times 10^6 (\pm 2.51\%) \text{Da}$ ，与 PCV2 的理论分子量相近。

通过杆状病毒重组表达 PCV2 的 Cap 蛋白据报道能够自组装成完整的 VLP。首先采用相同的

HPSEC-MALLS 步骤对两种 VLP 疫苗进行分析。从图 2C、图 2D 可见, 尽管 VLP 疫苗的色谱图与灭活病毒疫苗有所不同, 尤其是疫苗 c, 但在 13.3 min 左右同样出现了一个色谱峰。疫苗 c 在 13.2 min 的色谱峰经 MALLS 计算其分子量为 $2.09 \times 10^6 (\pm 2.94\%) \text{Da}$, 疫苗 d 在 13.4 min 的色谱峰分子量为 $2.88 \times 10^6 (\pm 11.85\%) \text{Da}$, 与全病毒的结果相近。此外, 注意到疫苗 c 与 Cap VLP 抗原参照品相同, 在 11.4 min 也出现了一个较小的吸收峰。该色谱峰经 MALLS 检测分子量为 $4.37 \times 10^6 (\pm 0.42\%) \text{Da}$, 正好为 PCV2 VLP 的 2 倍(图 2C)。

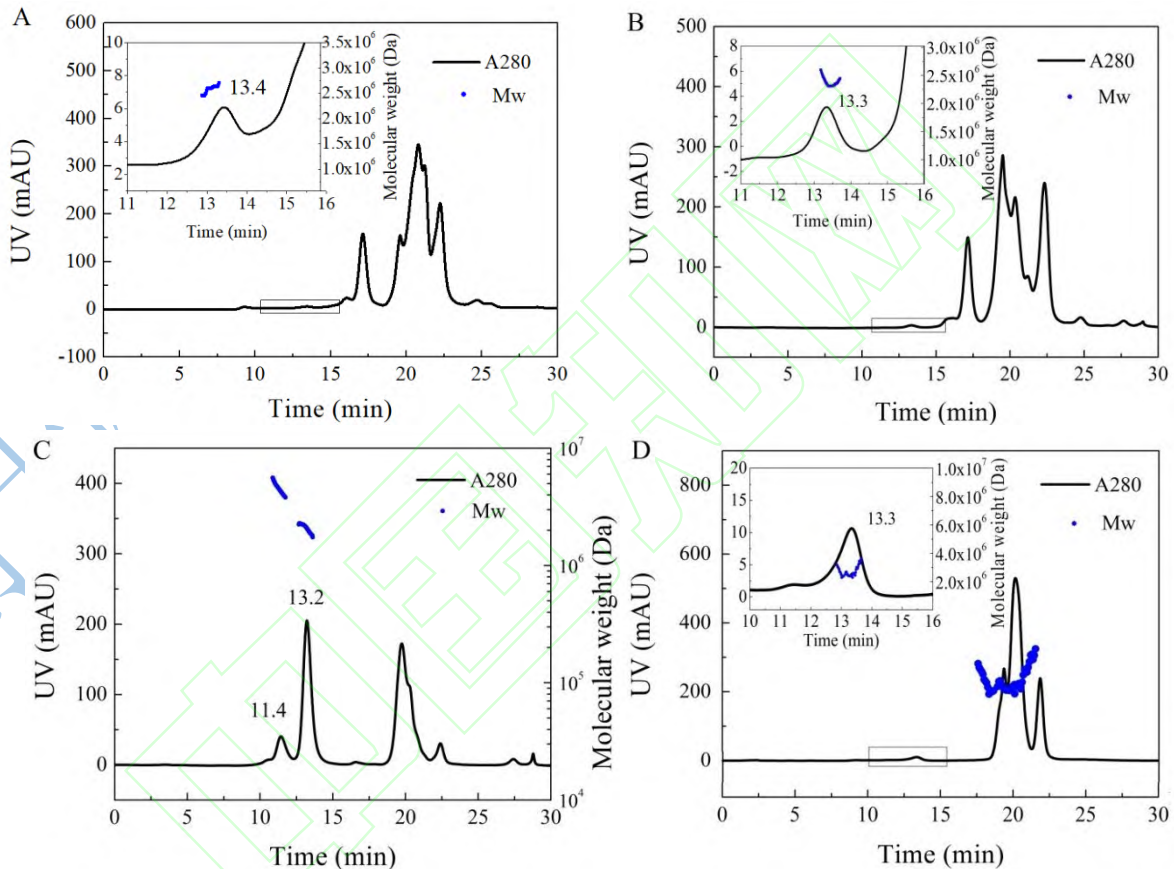


图 2 HPSEC-MALLS 检测 PCV2 灭活疫苗及 VLP 疫苗破乳后的水相抗原

Figure 2 HPSEC-MALLS analysis of the PCV2 antigens in inactivated vaccines and VLP vaccines after demulsification. (A) Vaccine a. (B) Vaccine b. (C) Vaccine c. (D) Vaccine d.

2.2 HPSEC 中 PCV2 抗原吸收峰的鉴定

为进一步验证 HPSEC 中 13.3 min 左右的色谱峰是否为 PCV2 抗原, 接取该色谱峰, 分别采用 PCV2 抗原检测卡、Western blotting 测定。如图 3 所示, 灭活 PCV2 和 Cap VLP 抗原参照品为阳性, 疫苗 a-d 在 13.3 min 左右的色谱峰在抗原检测卡上也均显示阳性。其中灭活疫苗在检测卡上的显色显著弱于 VLP 疫苗。这是由于灭活疫苗中的病毒含量普遍较低, 而重组亚单位疫苗往往可达到较高的表达量。HPSEC 中 13.3 min 的疑似抗原峰的峰高也验证了这一点。灭活病毒疫苗 a、b 中的疑似抗原特征峰的峰高均不超过 4 mAU, 而 VLP 疫苗 c、d 中的峰高均超过 10 mAU, 其中疫苗 c 的

峰高可达 200 mAU 以上，在图 3 中也显示了最高的检测结果。

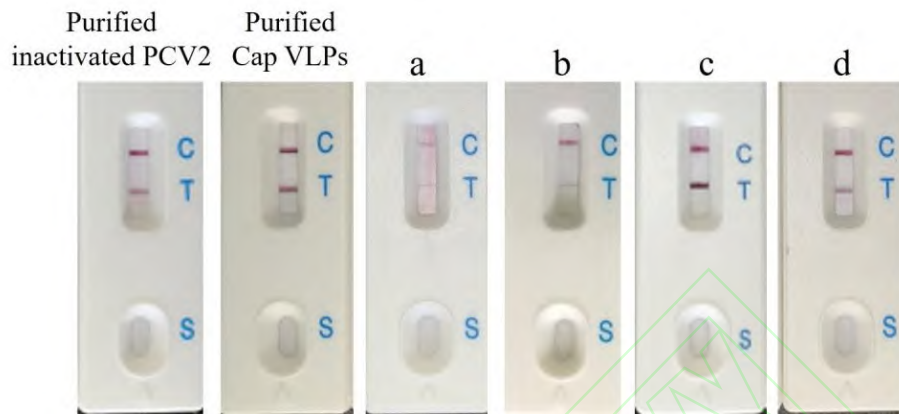


图 3 PCV2 抗原检测卡检测 PCV2 灭活病毒、Cap VLP 抗原参照样品，及疫苗 a、b、c、d 在 HPSEC 13.3 min 左右色谱峰

Figure 3 PCV2 antigen test of the purified inactivated PCV2, purified Cap VLP, and peaks of the four PCV2 vaccines at 13.3 min in HPSEC profile.

Western blotting 结果均显示出四种疫苗的 Cap 蛋白特异性条带，且不同疫苗的条带位置有所差异(图 4)。全病毒灭活疫苗抗原的 SDS-PAGE 条带在 49 kDa 和 98 kDa 左右。根据 Cap 蛋白分子量为 26–30 kDa，推测这两条带为亚基蛋白的二聚体和四聚体。由于 SDS-PAGE 采用的是非还原型电泳，未打开二硫键，该结果表明在全病毒的亚基蛋白间存在二硫键^[22]。两种重组亚单位疫苗抗原均在 28 kDa 附近有主要特异性条带，其中疫苗 c 在 49 kDa 左右有少量的特异性条带。可见，VLP 疫苗的亚基间二硫键相比灭活病毒疫苗抗原少。二硫键通常具有提高颗粒结构稳定性的作用，PCV2 抗原中二硫键的差异可能会导致其稳定性存在差异。综上，抗原检测卡与 Western blotting 的结果均表明 HPSEC 中 13.3 min 的色谱峰为 PCV2 抗原。

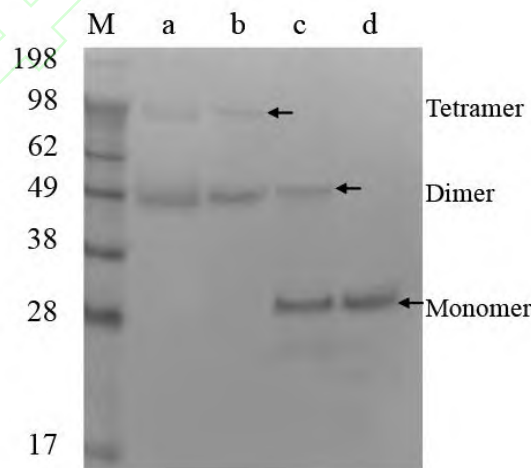


图 4 Western blotting 检测疫苗 a、b、c、d 在 HPSEC 13.3 min 左右的色谱峰

Figure 4 Western blotting of the peaks of the four PCV2 vaccines at 13.3 min in HPSEC profile.

2.3 TEM 检测 PCV2 及 VLP

将 4 种疫苗在 HPSEC 中 13.3 min 左右的色谱峰经 10 倍或 30 倍浓缩后进行 TEM 检测,与 PCV2 灭活病毒、Cap VLP 抗原参照品进行比较。两种灭活病毒疫苗的 TEM 结果检测到了尺寸为 21 nm 左右的病毒颗粒(图 5)。两个 PCV2 亚单位疫苗也均检测到尺寸 21–22 nm 的球形颗粒,表明自组装形成了 VLP。以上结果与 PCV2 灭活病毒及 Cap VLP 抗原参照品 TEM 检测尺寸一致,均为 21–22 nm。以上结果进一步验证了 HPSEC 中 13.3 min 左右的色谱峰为 PCV2 灭活病毒抗原或 VLP 抗原。

收集疫苗 c 在 HPSEC-MALLS 中出现在 11.4 min 且检测分子量为 $4.37 \times 10^6 (\pm 0.42\%)$ Da 的色谱峰,进行 TEM 检测,发现为 2 个 VLP 形成的聚集体,与 MALLS 的检测结果一致。其他文献也报道了 PCV2 Cap VLP 中检测到了聚集体的存在^[23]。由疫苗 c 中 13.2 min 色谱峰的紫外吸收高于其他疫苗 10 倍以上,可以看出该疫苗抗原浓度远高于其他抗原。推测 11.4 min 出现的 VLP 二聚体可能是由于抗原浓度过高形成的。

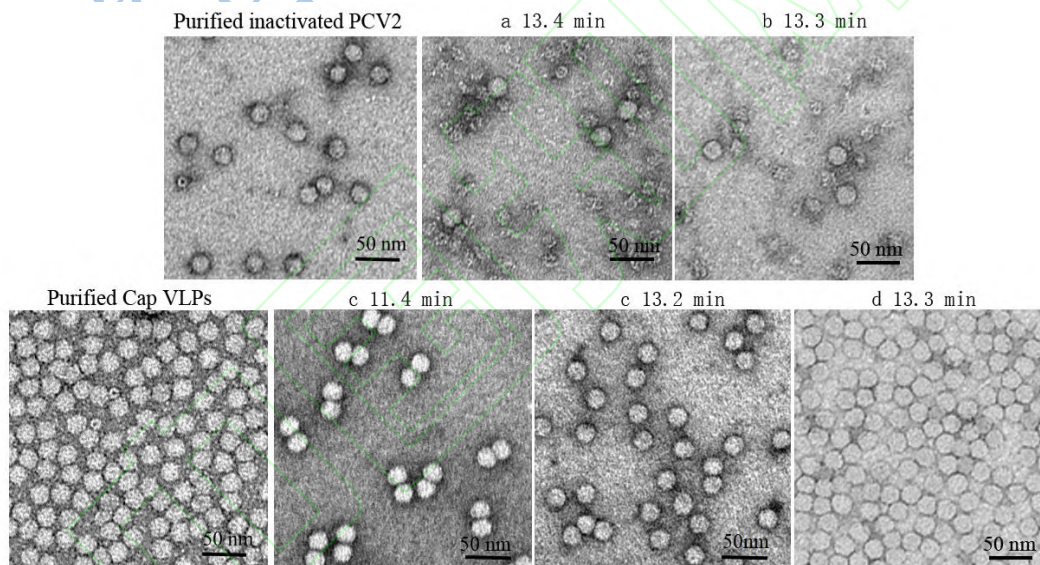


图 5 TEM 检测 PCV2 灭活病毒、Cap VLP 抗原参照品及疫苗 a(30×浓缩)、b(30×浓缩)、c(10×浓缩)、d(30×浓缩)在 HPSEC-MALLS 检测中的特征峰

Figure 5 TEM images of the purified inactivated PCV2, purified Cap VLP, and samples corresponding to the elution peaks of HPSEC of four vaccines.

2.4 HPSEC 检测的重复性

取重组亚单位疫苗 d 的破乳液水相及 Cap VLP 抗原参照品连续进样 3 次(图 6),可以看出疫苗 d 的 VLP 色谱峰峰面积重复性良好($RSD=1.3\%$, $n=3$) (表 1)。研究中发现高浓度的 PCV2 VLP 易发生聚集,分别对其 13.3 min 的 VLP 的吸收峰面积及 11.4 min 多聚体的吸收峰面积进行积分,验证 HPSEC 检测 VLP 及其聚集体含量是否具有重复性。如表 1 所示, VLP 及其聚集体的峰面积均具有良好的重复性, RSD 分别为 0.7% 及 0.6% ($n=3$)。

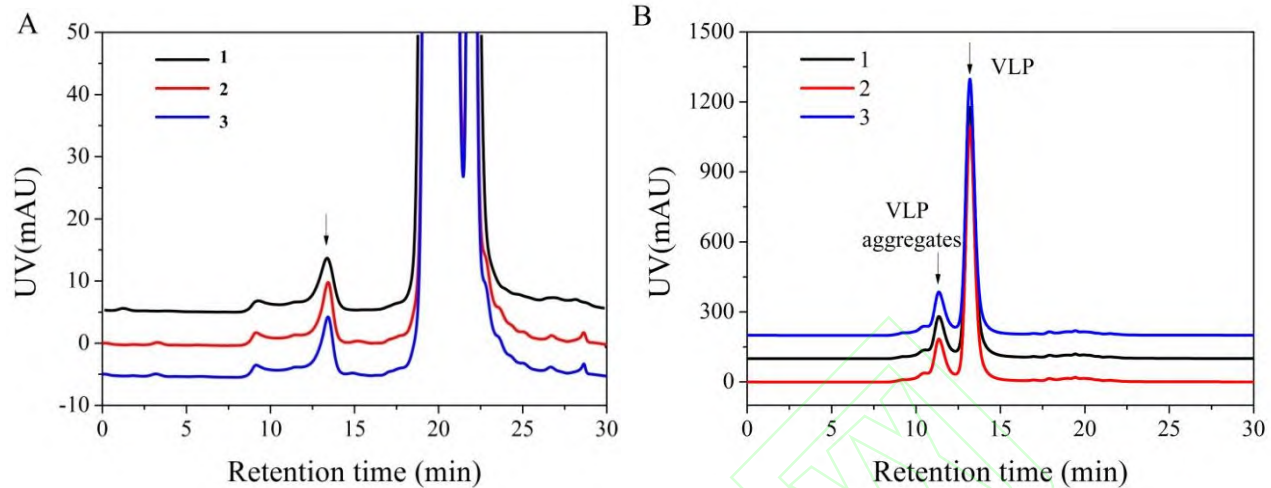


图 6 HPSEC 检测(A)疫苗 d 及(B)Cap VLP 抗原参照品三次重复性检测的色谱图

Figure 6 HPSEC chromatograms of (A) PCV2 VLP vaccine d and (B) purified Cap VLP in triplicates.

表 1 HPSEC 检测疫苗 d 及 Cap VLP 抗原参照品中 VLP、多聚体的吸收峰的峰面积及保留时间的重复性

Table 1 Reproducibility of HPSEC for detecting the peak area and retention time of VLP and VLP aggregates in vaccine d and purified Cap VLP

Sample	No. of injection	Retention time (min)	Peak area (mAU*min)	Average peak area (mAU*min)	RSD (n=3) (%)
Vaccine d	1	13.42	598804	591551	1.3
	2	13.43	582955		
	3	13.42	592893		
Cap VLP	1	13.19	40722934	41080314	0.7
	2	13.19	41173885		
	3	13.20	41344123		
Cap VLP aggregates	1	11.35	5882778	5926121	0.6
	2	11.36	5940089		
	3	11.35	5955497		

2.5 HPSEC 检测峰面积与蛋白浓度的线性相关性

为考察 HPSEC 检测的峰面积与抗原蛋白浓度的线性相关性，将 PCV2 VLP 抗原参照品进行梯度稀释，分别对其 13.3 min 的 VLP 的吸收峰面积及 11.4 min 多聚体的吸收峰面积进行积分，并建立峰面积与抗原总浓度的线性相关性。色谱图如图 7 所示。线性回归处理结果表明，在研究范围内 VLP 及其多聚体的吸收峰面积与浓度均呈良好的线性相关性， R^2 分别为 0.999 及 0.997，满足定量分析的 R^2 要求。此外，VLP 在不同浓度样品中的色谱峰占比为 $87.11\% \pm 0.98\%$ ($n = 10$, $RSD = 1.1\%$)，具有很好的重复性，表明 HPSEC 具有用于监测亚单位疫苗中聚集体含量的前景。

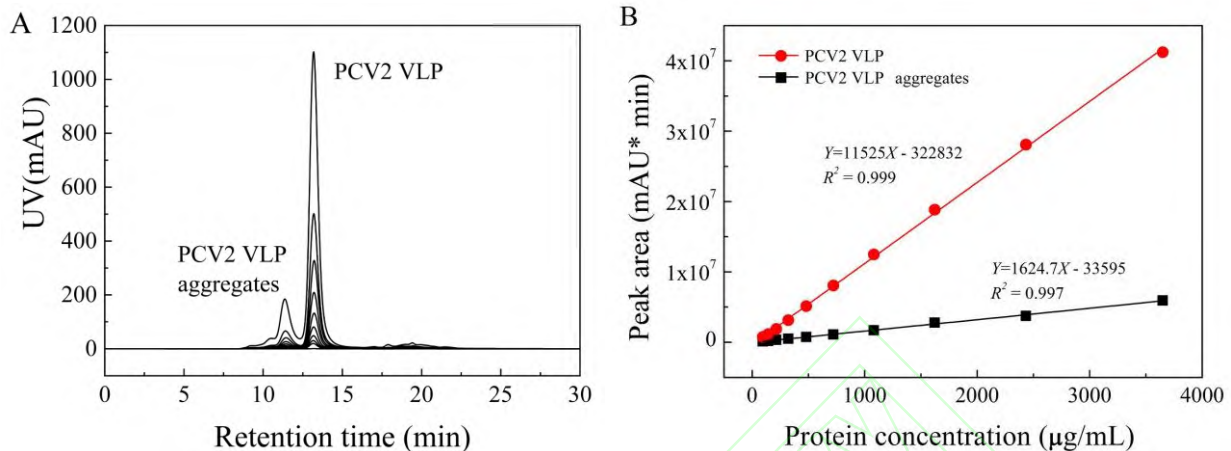


图7 Cap VLP 纯化抗原中 VLP 及多聚体的 HPSEC 检测的峰面积与蛋白浓度的线性相关性 (A) Cap VLP 抗原参照品梯度稀释色谱图。(B) VLP 及 VLP 聚集体的 HPSEC 检测峰面积与抗原蛋白浓度的线性回归曲线

Figure 7 The linear correlation between the HPSEC peak area of VLP and aggregates of purified Cap VLP and the protein concentration. (A) HPSEC chromatograms of Cap VLP diluted to different concentration. (B) Linear response curves between the peak areas of VLP at 13.3 min and VLP aggregates at 11.4 min against protein concentration of the sample.

3 讨论

随着生猪养殖产业的规模化发展和疫病防控的复杂多变, 疫苗作为防控疫病的有效手段, 质量不容小觑。PCV2 作为流行范围较广、合并感染较严重的病原, 使用疫苗的质量尤为关键。然而, 针对目前的 PCV2 疫苗产品众多, 且无统一的质量标准, 亟待对该类疫苗进行全面的评价, 以便更加科学地选用疫苗, 防控疫病。病毒类疫苗产品的质量控制和评价方法多是基于动物或细胞的传统技术, 抗体技术的发展使得病毒测定的特异性和灵敏度显著提升, 然而他们都存在各自的弊端。

近年来, 基于分离和病毒颗粒定量的新技术在疫苗的研发和质量控制中发挥了越来越显著的作用。本研究选用适合分离 PCV2 病毒及病毒样颗粒的体积排阻色谱偶联多角度激光散射仪对样品中分离物质的分子量进行鉴定, 并通过 PCV2 抗原检测卡、Western blotting 和 TEM 技术, 对目标色谱峰进行鉴定, 成功分析了 PCV2 灭活疫苗及病毒样颗粒疫苗中的完整抗原粒子。结果显示, 保留时间 13.3 分钟左右的色谱峰为疫苗中的完整抗原粒子—灭活 PCV2 病毒颗粒或 PCV2 病毒样颗粒。通过 HPSEC-MALLS 检测到 PCV2 VLP 抗原中可能存在聚集体, 而聚集往往会带来抗原活性的改变从而影响疫苗质量。通过 HPSEC 可实现快速定量分析 PCV2 病毒样颗粒疫苗中的组装体及其聚集体组成, 进而指导疫苗质量的提升, 这些是 ELISA 及动物实验难以实现的。通过试验证明该方法具有很好的重复性和检测线性。以上显示了 HPSEC-MALLS 方法在 PCV2 疫苗抗原定量分析和质量评价中的优势。该方法有望成为一种准确、高效的 PCV2 疫苗的体外评价方法, 作为现有方法的补充, 在疫苗的质量监管及提升中发挥作用。

REFERENCES

- [1] Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, et al. Pathological, immunohistochemical, and *in situ* hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol*, 1999, 120(1): 59-78.
- [2] Madec F, Rose N, Grasland B, et al. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55(7): 273-283.
- [3] Tischer I, Miels W, Wolff D, et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol*, 1986, 91(3/4): 271-276.
- [4] Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, et al. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol*, 1995, 44(1): 49-64.
- [5] Ellis J, Hassard L, Clark E, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J = La Revue Veterinaire Can*, 1998, 39(1): 44-51.
- [6] Palinski R, Piñeyro P, Shang PC, et al. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *J Virol*, 2016, 91(1): e01879-e01816.
- [7] Phan TG, Giannitti F, Rossow S, et al. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol J*, 2016, 13(1): 184.
- [8] Zhang HH, Hu WQ, Li JY, et al. Novel *Circovirus* species identified in farmed pigs designated as Porcine *Circovirus* 4, Hunan Province, China. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(3): 1057-1061.
- [9] Crowther RA, Berriman JA, Curran WL, et al. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J Virol*, 2003, 77(24): 13036-13041.
- [10] Meehan BM, McNeilly F, Todd D, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol*, 1998, 79 (Pt 9): 2171-2179.
- [11] Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, et al. *Diseases of Swine*[M]. New York: John Wiley & Sons, 2019.
- [12] Masuda A, Lee JM, Miyata T, et al. Purification and characterization of immunogenic recombinant virus-like particles of porcine *Circovirus* type 2 expressed in silkworm pupae. *J Gen Virol*, 2018, 99(7): 917-926.
- [13] 国家兽药基础数据库[EB/OL].[2021-02-18] <http://www.ivdc.org.cn>. National Veterinary Drug Basic Information Database. <http://www.ivdc.org.cn>.
- [14] 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.
- [15] Liu FX, Ge SQ, Li L, et al. Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens. *Res Vet Sci*, 2012, 93(2): 553-559.
- [16] 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.
- [17] Yang YL, Su ZG, Ma GH, et al. Characterization and stabilization in process development and product formulation for super large proteinaceous particles. *Eng Life Sci*, 2020, 20(11): 451-465.
- [18] 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.
- 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).
- [19] 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 (in Chinese).
- [20] 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.
- 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).

-
- [21] 何天慈. 单克隆抗体夹心 ELISA 检测猪圆环病毒 2 型抗原含量的研究[D]. 北京: 中国兽医药品监察所, .
He TC. Development of a monoclonal antibody sandwich ELISA for antigen detection of porcine circovirus type 2 [D]. Beijing: China Institute of Veterinary Drug Control, 2019 (in Chinese).
- [22] Wu PC, Lin WL, Wu CM, et al. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV₂) capsid particle assembly and its application to virus-like particle vaccine development. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(6): 1501-1507.
- [23] Duan JK, Yang DQ, Chen L, et al. Efficient production of porcine circovirus virus-like particles using the nonconventional yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(2): 833-842.