



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105467138 B

(45)授权公告日 2018.01.26

(21)申请号 201510878606.X

G01N 33/539(2006.01)

(22)申请日 2015.12.04

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105467138 A

CN 103091270 A,2013.05.08,

CN 204613003 U,2015.09.02,

CN 204027897 U,2014.12.17,

(43)申请公布日 2016.04.06

CN 103884839 A,2014.06.25,

(73)专利权人 中国农业科学院兰州兽医研究所  
地址 730000 甘肃省兰州市城关区盐场堡  
徐家坪1号

CN 104634891 A,2015.05.20,

CN 104792985 A,2015.07.22,

CN 101642567 A,2010.02.10,

(72)发明人 冯霞 马军武 孙世琪 靳野  
郭慧琛 刘湘涛 周广青 尚艳丽  
张晓霞 张柳

CN 102329746 A,2012.01.25,

CN 101971030 A,2011.02.09,

CN 103091490 A,2013.05.08,

CN 103076451 A,2013.05.01,

(74)专利代理机构 北京中恒高博知识产权代理  
有限公司 11249  
代理人 吕玉博

覃金胜等.口蹄疫琼脂扩散试验的研究和应  
用.《中国动物检疫》.1987,(第2期),

审查员 舒霏霏

(51)Int.Cl.

G01N 33/94(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

## (54)发明名称

一种确定口蹄疫疫苗组份及估计抗原含量的方法

## (57)摘要

本发明提供一种确定口蹄疫疫苗组份及估计抗原含量的方法,包括以下步骤:1)口蹄疫疫苗破乳,分离出抗原相;2)对抗原相进行浓缩;3)用纯化的口蹄疫病毒亚洲1型、0型、A型三个型的146S抗原免疫动物,制备检测血清;4)将浓缩抗原以不同倍数稀释,分别于检测血清进行免疫扩散试验;5)根据出现沉淀线情况判定口蹄疫疫苗组份,即是0型单价疫苗、或是0型+A型双价疫苗、还是0型+亚洲1型+A型三价疫苗。6)再根据出现沉淀线的最高抗原稀释倍数估算被检疫苗样品中抗原含量。本发明的方法既能对口蹄疫疫苗的组份进行甄别,又能估算出各组份含量。本方法操作简单、特异性强、稳定性好、适合于基层应用。

1. 一种确定口蹄疫疫苗组份的方法,其特征在于:步骤如下:

(1) 对待测口蹄疫疫苗用油佐剂疫苗破乳器进行破乳,分离出抗原相;

(2) 对分离出的抗原相进行浓缩:将步骤(1)收集到的抗原加入Amicon Ultra-30K纯化浓缩管中,以3 000-6 000g 4℃离心30min,上层浓缩管中液体即为浓缩后的抗原;

(3) 用纯化后的口蹄疫病毒亚洲1型、0型、A型三个型别的146S 抗原分别免疫动物,制备亚洲1型、0型、A型三个型别的检测血清;

所述口蹄疫病毒亚洲1型、0型、A型146S 抗原的纯化方法为:

将亚洲1型或0型、A型口蹄疫灭活抗原经200目铜网过滤除去细胞碎片,聚乙二醇6000沉淀,2倍体积的三氯乙烯脱脂,超速离心沉淀及将蔗糖密度梯度离心纯化146S 抗原,收取146S峰值处样品,按公式进行定量: $X = (\sum 128.7 \times OD_{259 i} \times Vi) / (\sum Vi)$ ,其中X为146S抗原含量, $OD_{259 i}$ 为146S抗原峰吸光度, $Vi$ 为146S抗原峰体积;

所述用纯化后的口蹄疫病毒亚洲1型、0型、A型三个型别的146S 抗原分别免疫动物的方法为:

用30%蔗糖调整步骤(3)纯化的146S抗原浓度,使146S抗原含量为200 $\mu$ g/mL,取口蹄疫病毒亚洲1型146S抗原4mL加入4mL弗式完全佐剂乳化,至抗原与佐剂完全均匀混合,用它免疫兔子,每只兔子颈背皮下分6-8点注射1mL乳化物,即100 $\mu$ g 146S抗原/只,30天后,用等量乳化物进行二次免疫,注射部位及方式与第一次相同,二次免疫后10天颈动脉采血,分离血清;56℃水浴灭活30min,加入1‰ ProClin 300 ,效价大于1:5000者即可;

(4) 将浓缩抗原分别与亚洲1型、0型、A型三个型别的检测血清进行免疫扩散试验;

(5) 根据沉淀线情况判定待测口蹄疫疫苗组份:出现沉淀线则证明待测口蹄疫疫苗中含有相应口蹄疫病毒146A抗原;反之,则证明待测口蹄疫疫苗中没有相应口蹄疫病毒146A抗原。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤(1)中所述对待测口蹄疫疫苗破乳是将待测口蹄疫灭活疫苗加入外筒中加有冰水混合物的油佐剂疫苗破乳器中进行破乳。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:在用口蹄疫病毒灭活抗原免疫动物前需要经过纯化以获得146S抗原,在此过程中需要使用研磨重悬装置对口蹄疫病毒抗原的离心沉淀物进行研磨重悬。

4. 一种确定口蹄疫疫苗估计抗原含量的方法,其特征在于:步骤如下:

(1) 对待测口蹄疫疫苗用油佐剂疫苗破乳器进行破乳,分离出抗原相;

(2) 对分离出的抗原相进行浓缩:将步骤(1)收集到的抗原加入Amicon Ultra-30K纯化浓缩管中,以3 000-6 000g 4℃离心30min,上层浓缩管中液体即为浓缩后的抗原;

(3) 用纯化后的口蹄疫病毒亚洲1型、0型、A型三个型别的146S 抗原分别免疫动物,制备亚洲1型、0型、A型三个型别的检测血清;

所述口蹄疫病毒亚洲1型、0型、A型146S 抗原的纯化方法为:

将亚洲1型或0型、A型口蹄疫灭活抗原经200目铜网过滤除去细胞碎片,聚乙二醇6000沉淀,2倍体积的三氯乙烯脱脂,超速离心沉淀及将蔗糖密度梯度离心纯化146S 抗原,收取146S峰值处样品,按公式进行定量: $X = (\sum 128.7 \times OD_{259 i} \times Vi) / (\sum Vi)$ ,其中X为146S抗原含量, $OD_{259 i}$ 为146S抗原峰吸光度, $Vi$ 为146S抗原峰体积;

所述用纯化后的口蹄疫病毒亚洲1型、0型、A型三个型别的146S 抗原分别免疫动物的

方法为：

用30%蔗糖调整步骤(3)纯化的146S抗原浓度,使146S抗原含量为200 $\mu$ g/mL,取口蹄疫病毒亚洲1型146S抗原4mL加入4mL弗式完全佐剂乳化,至抗原与佐剂完全均匀混合,用它免疫兔子,每只兔子颈背皮下分6-8点注射1mL乳化物,即100 $\mu$ g 146S抗原/只,30天后,用等量乳化物进行二次免疫,注射部位及方式与第一次相同,二次免疫后10天颈动脉采血,分离血清;56 $^{\circ}$ C水浴灭活30min,加入1‰ ProClin 300 ,效价大于1:5000者即可;

(4)将浓缩抗原以不同倍数稀释,分别与亚洲1型、0型、A型三个型别的检测血清进行免疫扩散试验;

(5)根据出现沉淀线的最高抗原稀释倍数估算待测口蹄疫疫苗中抗原含量,计算公式:含量=(出现沉淀线的最高稀释倍数 $\times$ 10 $\mu$ g/mL $\div$ 浓缩倍数) $\times$ [抗原相体积/(抗原相+油相)的体积]。

5.根据权利要求4所述的方法,其特征在于:步骤(1)中所述对待测口蹄疫疫苗破乳是将待测口蹄疫灭活疫苗加入外筒中加有冰水混合物的油佐剂疫苗破乳器中进行破乳。

6.根据权利要求4所述的方法,其特征在于:在用口蹄疫病毒灭活抗原免疫动物前需要经过纯化以获得146S抗原,在此过程中需要使用研磨重悬装置对口蹄疫病毒抗原的离心沉淀物进行研磨重悬。

## 一种确定口蹄疫疫苗组份及估计抗原含量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种确定口蹄疫疫苗组份及估计抗原含量的方法。

### 背景技术

[0002] 口蹄疫(foot and mouth disease, FMD)是猪、牛、羊等主要家畜和其它偶蹄动物共患的一种急性、高度接触性传染病。临床特征是在口腔黏膜、蹄部和乳房皮肤发生水疱。该病传播途径多、速度快,曾多次在世界范围内暴发流行,造成巨大政治、经济损失。世界动物卫生组织(OIE)将其列为必须申报的传染病,我国也将其列为一类动物传染病之首。

[0003] 口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)属于微核糖核酸病毒科口蹄疫病毒属,有七个血清型:O型、A型、亚洲I型、C型以及南非1、2、3型。各血清型之间没有交叉保护。现阶段我国主要流行O型、A型和亚洲I型。

[0004] 计划免疫是预防、控制口蹄疫的有效手段之一。目前,口蹄疫灭活疫苗使用最为广泛;为确保它安全有效,应对其质量进行严格的控制。口蹄疫疫苗效力检测的“黄金方法”是本动物攻毒保护试验,或采用PD<sub>50</sub>测定法(欧洲):即用疫苗50%动物保护剂量(PD<sub>50</sub>)来评价疫苗免疫效果,常规疫苗需至少达到3个PD<sub>50</sub>,紧急接种疫苗需至少达到6个PD<sub>50</sub>(根据疫苗使用情况,我国已提高此标准,要求常规疫苗达到6个PD<sub>50</sub>);或采用(PGP)测定法(南美):即用疫苗保护百分率(PGP)来评价疫苗免疫效果,PGP达到75%以上,该疫苗合格。试验用动物必须是来自无口蹄疫地区、无口蹄疫病毒中和抗体的非疫苗免疫本动物。由于我国采取强制免疫手段控制口蹄疫,所以筛选合格的试验动物相当困难;另外,这种方法的成本高、周期长、重复性较差,且需要高安全动物舍,不易操作。

[0005] 众所周知,疫苗是由抗原与佐剂以一定比例、按特定程序乳化而成的,因此,决定其免疫效果的两个关键因素是“抗原”与“佐剂”。“抗原”不同,疫苗就不同,筛选到好的“抗原”,其诱导的免疫保护力强,疫苗的免疫效果就好。当然“佐剂”不同,疫苗也不同。好的“佐剂”可以激发广谱的免疫反应,与“抗原”诱导的免疫反应不同,“佐剂”诱导的是非特异性的;“抗原”诱导的是特异性的,即针对某个型别的口蹄疫。对于疫苗生产商而言,希望“抗原”与“佐剂”都好,强强联合,生产出优质的疫苗。

[0006] 现在国家对于口蹄疫疫苗生产企业均按兽药GMP(生产质量管理规范)进行认证。按此标准,要求企业从原料、人员、设施设备、生产过程、包装运输、质量控制等方面达到国家法规规定的卫生质量要求,具备良好的生产设备,合理的生产过程,完善的质量管理和严格的检测系统,确保疫苗质量符合法规要求。在此条件下,应用的“抗原”(种毒)与“佐剂”是特定的,而有所变动的是各批次间的“抗原含量”,它受细胞培养方式(贴壁或悬浮)及细胞生长状态、培养液的pH值、病毒的复制情况、病毒收获时间、灭活的温度及时间等诸多因素影响,会有一些的变化。鉴于我国已提高口蹄疫常规疫苗的标准(至少含6个PD<sub>50</sub>),而常规生产的抗原含杂蛋白多(如细胞碎片)、有效抗原含量较低,可能达不到这个要求,生产企业会对初始获得的抗原进行纯化和浓缩。而生产工艺越复杂,其批次间抗原含量可能出现波动性的机率就越大。需要我们加强监测,剔除不合格的批次。

[0007] 口蹄疫血清学效力检测是通过检测疫苗免疫后的抗体滴度水平来评价疫苗免疫效力,它可以综合评价免疫抗原及佐剂的效果。主要包括病毒中和试验(Stellman等1968; Pay等1976)和液相阻断ELISA试验(马军武等 2006)。1968年,Stellman等提出了用中和抗体滴度分析疫苗效力的统计学方法;到1976年,Pay等根据中和抗体滴度和疫苗效力的关系建立了疫苗的抗原剂量、中和抗体滴度和保护率的相关公式。马军武等通过液相阻断ELISA检测疫苗免疫抗体与攻毒保护分析确定了牛、羊、猪等口蹄疫免疫抗体与攻毒保护的关系。疫苗免疫血清抗体效价检测须用非口蹄疫疫苗免疫动物,无法从根本上取代本动物的使用,动物的选择仍存在困难。而且这两种方法是“事后评价”,不能在疫苗使用前对疫苗的质量加以评估,剔除不合格的产品。并且这两种方法对试验室的要求高,病毒中和试验必须在高安全实验室进行,防止病毒外散;ELISA必须有恒温培养箱、酶标仪等,不适合基层应用。

### 发明内容

[0008] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明提供了一种确定口蹄疫疫苗组份及估计抗原含量的方法,本发明方法从根本上取代了时疫苗免疫血清抗体效价检测本动物的使用,使得动物的选择变得容易,而且在疫苗使用前就能对疫苗的质量加以评估,剔除不合格的产品。

[0009] 本发明先对口蹄疫疫苗破乳,获得抗原,并对其进行浓缩,之后根据它与检测血清(纯化的146S 抗原制备)的免疫扩散试验所出现沉淀线情况判定疫苗的组份(即是亚洲1型单价疫苗、0型单价疫苗、或是0+A双价疫苗、还是0+亚+A型三价疫苗)及抗原含量的方法。本发明操作简单、特异性强、稳定性好、非常适合于基层应用。

[0010] 本发明提供一种确定口蹄疫疫苗组份的方法,步骤如下:

[0011] (1)对待测口蹄疫疫苗破乳,分离出抗原相;

[0012] (2)对分离出的抗原相进行浓缩;

[0013] (3)用纯化后的口蹄疫病毒亚洲1型、0型、A型三个型别的146S 抗原分别免疫动物,制备亚洲1型、0型、A型三个型别的检测血清;

[0014] (4)将浓缩抗原分别与亚洲1型、0型、A型三个型别的检测血清进行免疫扩散试验;

[0015] (5)根据沉淀线情况判定待测口蹄疫疫苗组份:出现沉淀线则证明待测口蹄疫疫苗中含有相应口蹄疫病毒146A抗原;反之,则证明待测口蹄疫疫苗中没有相应口蹄疫病毒146A抗原。

[0016] 作为优选,步骤(1)中所述对待测口蹄疫疫苗破乳是将待测口蹄疫灭活疫苗加入外筒中加有冰水混合物的油佐剂疫苗破乳器中进行破乳。

[0017] 作为优选,在用口蹄疫病毒灭活抗原免疫动物前需要经过纯化(获得146S抗原),在此过程中需要使用研磨重悬装置对口蹄疫病毒抗原的离心沉淀物进行研磨重悬。

[0018] 本发明还提供一种确定口蹄疫疫苗估计抗原含量的方法,步骤如下:

[0019] (1)对待测口蹄疫疫苗破乳,分离出抗原相;

[0020] (2)对分离出的抗原相进行浓缩;

[0021] (3)用纯化后的口蹄疫病毒亚洲1型、0型、A型三个型别的146S 抗原分别免疫动物,制备亚洲1型、0型、A型三个型别的检测血清;

[0022] (4)将浓缩抗原以不同倍数稀释,分别与亚洲1型、0型、A型三个型别的检测血清进

行免疫扩散试验;

[0023] (5) 根据出现沉淀线的最高抗原稀释倍数估算待测口蹄疫疫苗中抗原含量, 计算公式: 含量 = (出现沉淀线的最高稀释倍数  $\times$  10 $\mu$ g/mL  $\div$  浓缩倍数)  $\times$  [抗原相体积 / (抗原相 + 油相) 的体积]。

[0024] 作为优选, 步骤(1)中所述对待测口蹄疫疫苗破乳是将待测口蹄疫灭活疫苗加入外筒中加有冰水混合物的油佐剂疫苗破乳器中进行破乳。

[0025] 作为优选, 在用口蹄疫病毒灭活抗原免疫动物前需要经过纯化(获得146S抗原), 在此过程中需要使用研磨重悬装置对口蹄疫病毒抗原的离心沉淀物进行研磨重悬。

[0026] 以下对本发明的方法进行详细的描述。

[0027] 本发明的一种确定口蹄疫疫苗组份及估计抗原含量的方法包括以下步骤:

[0028] 步骤一, 口蹄疫疫苗破乳及抗原的分离: 将口蹄疫灭活疫苗加入外筒中加有冰水混合物的油佐剂疫苗破乳器(新型专利号: 201520326388.4)中, 按5:1的体积比例加入破乳剂(如正戊醇或正丁醇), 即每10mL灭活疫苗加入2mL破乳剂, 用搅拌棒搅动疫苗与破乳剂混合物10秒钟(要观察到疫苗已破乳), 取出搅拌棒, 静置约30分钟, 观察到破乳的疫苗已清晰分层, 记录上层油相佐剂与下层液相抗原的体积, 收集下层抗原, 备用;

[0029] 步骤二, 抗原的浓缩: 将步骤一收集到的10mL抗原加入Amicon Ultra-30K纯化浓缩管中, 以3 000-6 000g 4 $^{\circ}$ C离心30min, 记录离心后上层浓缩管中液体的体积, 计算出抗原浓缩倍数(一般在5至20倍之间)。上层浓缩管中液体即为浓缩后的抗原, 收集、备用;

[0030] 步骤三, 口蹄疫病毒亚洲1型146S 抗原的纯化(或O型、A型, 共三个型): 利用蔗糖密度梯度法(Barteling and Meloen; 1974)纯化。大致过程如下: 亚洲1型(或O型、A型)口蹄疫灭活抗原经铜网(200目)过滤除去细胞碎片, 聚乙二醇6000沉淀, 2倍体积的三氯乙烯脱脂, 超速离心(136 000g 4 $^{\circ}$ C离心120min)沉淀及将蔗糖密度梯度(45%、35%、25%、15%)离心(110 000g 8 $^{\circ}$ C离心150min)纯化146S 抗原。收取146S峰值处样品, 按公式进行定量:  $X = (\sum 128.7 \times OD_{259} i \times Vi) / (\sum Vi)$ , 其中X为146S抗原含量,  $OD_{259} i$ 为146S抗原峰吸光度,  $Vi$ 为146S抗原峰体积, 备用。本发明使用“研磨重悬装置”(新型专利号: 201420465197.1)对离心沉淀物进行研磨重悬。该装置可有效避免常规操作时146S抗原的降解, 提高纯化产量。

[0031] 步骤四, 口蹄疫病毒亚洲1型特异性(或O型、A型, 共三个型)检测血清的制备: 用30%蔗糖调整步骤三纯化的146S抗原浓度, 使146S抗原含量为200 $\mu$ g/mL。取口蹄疫病毒亚洲1型146S抗原(或O型、A型, 共三个型)4mL加入4mL弗式完全佐剂乳化(Sigma公司产品)(约25min), 至抗原与佐剂完全均匀混合(滴入水中1min不会扩散), 用它免疫兔子(8只), 每只兔子颈背皮下分6-8点注射1mL乳化物, 即100 $\mu$ g 146S抗原/只。30天后, 用等量乳化物进行二次免疫, 注射部位及方式与第一次相同。二次免疫后10天颈动脉采血, 分离血清。56 $^{\circ}$ C水浴灭活30min, 加入1% ProClin 300 (SUPELCO, BELLEFONTE, PA, USA), 分成小份, 或5mL/瓶或200 $\mu$ L/支, -80 $^{\circ}$ C冻存, 备用。取一支用ELISA方法检测(具体步骤见专利申请号: 201310055748.7, 201310017378.8, 201310017209.4), 效价达1:5000以上者可用于本发明。

[0032] 步骤五, 免疫扩散试验: 将步骤四所获检测血清分别加于三个中间孔中, 即1号中间孔加亚洲1型特异性检测血清, 2号中间孔加O型特异性检测血清、3号中间孔加A型特异性检测血清, 将步骤二所获的浓缩抗原以不同倍数稀释分别加在对应的外周孔, 包括不稀释的、1:2、1:4、1:8(可根据情况自行变动)。抗原和血清加量均为20-30 $\mu$ L。另外设4号中间孔

加阳性抗原及阴性抗原,4号外周孔加检测血清对照,阳性抗原为含亚洲1型146S抗原、0型146S抗原和A型146S抗原三个型各20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合抗原,阴性抗原为细胞培养液,均重复一次。置于湿盒中,室温放24-48小时,观察。

[0033] 步骤六,口蹄疫疫苗组份的甄别及抗原含量的估算:24-48小时后根据出现沉淀线情况判定口蹄疫疫苗组份。具体方法如下:

[0034] 首先,4号梅花的阳性抗原与检测血清之间出现沉淀线,且阴性抗原与检测血清没有出现沉淀线,试验成立。否则试验不成立,需要重做。试验成立时,才能进行以下判定。

[0035] 在试验成立时,若1号梅花出现沉淀线,即浓缩抗原中含有亚洲1型抗原,若仅为不稀释的浓缩抗原出现沉淀线,则其含量约为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (在本发明中,我们用不同已知浓度的146S抗原进行试验,发现该方法的最低可检测值是10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,低于此含量,不出现沉淀线);若不稀释的和1:2的均出现沉淀线,则其含量约为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;若不稀释的、1:2的和1:4的均出现沉淀线,则浓缩抗原中含有亚洲1型抗原含量约为40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;以此类推,知道浓缩抗原中含有亚洲1型抗原含量,再除以浓缩倍数,就可以估算出为出疫苗中含有亚洲1型抗原的量。

[0036] 在试验成立时,若2号梅花出现沉淀线,即浓缩抗原中含有0型抗原,若仅为不稀释的浓缩抗原出现沉淀线,则其含量大约为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;若不稀释的和1:2的均出现沉淀线,则其含量大约为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;若不稀释的、1:2的和1:4的均出现沉淀线,则浓缩抗原中含有0型抗原含量大约为40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;以此类推,知道浓缩抗原中含有0型抗原含量,再除以浓缩倍数,就可以估算出为出疫苗中含有0型抗原的量。

[0037] 在试验成立时,若3号梅花出现沉淀线,即浓缩抗原中含有A型抗原,若仅为不稀释的浓缩抗原出现沉淀线,则其含量大约为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,若不稀释的和1:2的均出现沉淀线,则其含量大约为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;以此类推,知道浓缩抗原中含有A型抗原含量,再除以浓缩倍数,就可以估算出为出疫苗中含有A型抗原的量。

[0038] 若在最大稀释倍数时仍出现沉淀线,有可能抗原含量高,需进一步稀释,应再进行1:8,1:16,甚至1:32的稀释,保证有不出现沉淀线的倍数出现。就能够较为准确地定量了。

[0039] 在试验成立时,在1号-3号梅花中,仅有1号梅花出现沉淀线,即是亚洲1型单价疫苗;若仅有2号梅花出现沉淀线,即是0型单价疫苗;若仅有3号梅花出现沉淀线,即是A型单价疫苗;若1号和2号梅花均出现沉淀线,3号梅花未出现沉淀线,是亚洲1型+0型双价疫苗、若2号和3号梅花均出现沉淀线,1号梅花未出现沉淀线,是0型+A型双价疫苗、若1号、2号和3号梅花均出现沉淀线,是亚洲1型+0型+A型三价疫苗。

[0040] 这样我们就可以对口蹄疫疫苗的组份进行甄别(破乳、过滤、离心、免疫扩散)并估算各组分的抗原含量了。

[0041] 本发明提供的一种确定口蹄疫疫苗组份及估计抗原含量的方法,既能对口蹄疫疫苗的组份进行甄别,又能估算出各组份含量。本方法操作简单、特异性强、稳定性好、适合于基层应用。

### 具体实施方式

[0042] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为市售。

## [0043] 实施例1

[0044] 1. 口蹄疫疫苗破乳及抗原的分离:将6个口蹄疫灭活疫苗(编号1-1、1-2、1-3、1-4、1-5、1-6)各25 mL加入外筒中加有冰水混合物的油佐剂疫苗破乳器(发明专利号:201520326388.4)中,加入5mL正戊醇,用搅拌棒搅动疫苗与破乳剂混合物10秒钟(要观察到疫苗已破乳),取出搅拌棒,静置约30分钟,观察到破乳的疫苗已清晰分层,记录上层油相佐剂与下层液相抗原的体积(见表1),收集下层抗原,备用。

[0045] 表1 6份口蹄疫病毒灭活疫苗破乳后油相与抗原相的体积(mL)

疫苗编号	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6
上层油相(不含破乳剂)	12.5	12.0	12.8	13.0	12.4	13.4
下层抗原相	12.5	13.0	12.2	12.0	12.6	11.6
合计	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0

[0047] 2. 抗原的浓缩:将步骤一收集到的10mL抗原加入Amicon Ultra-30K纯化浓缩管中,以3 000-6 000g 4℃离心30min,记录离心后上层浓缩管中液体的体积,计算出抗原浓缩倍数(见表2)。上层浓缩管中液体即为浓缩后的抗原,收集、备用。

[0048] 表2 6份口蹄疫病毒灭活疫苗(已破乳)浓缩倍数(mL)

疫苗编号	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6
上层浓缩管中液体的体积	1.0	0.8	2.0	1.5	1.4	0.6
下层废液管中液体的体积	9.0	9.2	8.0	8.5	8.6	9.4
浓缩倍数	10.00	12.50	5.00	6.67	7.14	15.67

[0050] 3. 口蹄疫病毒亚洲1型146S 抗原的纯化(或O型、A型,共三个型):利用蔗糖密度梯度法(Barteling and Meloen;1974)纯化。大致过程如下:3 000mL亚洲1型(或O型、A型)口蹄疫灭活抗原(由中农威特股份有限公司质量检测部提供)经铜网(200目)过滤除去细胞碎片,聚乙二醇6000沉淀,2倍体积的三氯乙烯脱脂,超速离心(136 000g 4℃离心120min)沉淀及将蔗糖密度梯度(45%、35%、25%、15%)离心(110 000g 8℃离心150min)纯化146S 抗原。收取146S峰值处样品,按公式进行计算: $X = (\sum 128.7 \times OD_{259} \times V_i)$ ,其中X为146S抗原获量, $OD_{259} \times V_i$ 为146S抗原峰吸光度, $V_i$ 为146S抗原峰体积,单位为 $\mu\text{g}$ (见表3)。备用。本发明使用“研磨重悬装置”(发明专利号:201420465197.1)对离心沉淀物进行研磨重悬。该装置可有效避免常规操作时146S 抗原的降解,提高纯化产量。

[0051] 表3 亚洲1型、O型、A型 3 000 mL口蹄疫病毒灭活抗原纯化所得146S 抗原( $\mu\text{g}$ )

疫苗编号	$OD_{259-12}$	$V_{12}$	$OD_{259-13}$	$V_{13}$	$OD_{259-14}$	$V_{14}$	$OD_{259-15}$	$V_{15}$	146S 抗原合计
亚洲1型灭活抗原	1.851	3.3	2.870	3.4	2.695	3.3	1.276	3.3	3 728.5
O型灭活抗原	0.923	3.3	2.394	3.4	1.263	3.4	0.852	3.3	2 354.1
A型灭活抗原	1.034	3.3	2.060	3.4	1.395	3.3	0.914	3.3	2 321.2

[0053] 4. 口蹄疫病毒亚洲1型特异性(或O型、A型,共三个型)检测血清的制备:用30%蔗糖调整步骤3纯化的146S 抗原浓度,使146S 抗原含量为200 μg/mL。取口蹄疫病毒亚洲1型146S 抗原(或O型、A型,共三个型)4mL加入4mL弗式完全佐剂乳化(Sigma公司产品)(约25min),至抗原与佐剂完全均匀混合(滴入水中1 min不会扩散),用它免疫兔子(8只),每只兔子颈背皮下分6-8点注射1mL乳化物,即100 μg 146S 抗原/只。30天后,用等量乳化物进行二次免疫,注射部位及方式与第一次相同。二次免疫后10天颈动脉采血,分离血清。56℃水浴灭活30min,加入1‰ ProClin 300 (SUPELCO, BELLEFONTE, PA ,USA),分成小份,或5mL/瓶或200 μL/支,-80℃冻存,备用。取一支用ELISA方法检测(具体步骤见专利申请号:201310055748.7,201310017378.8,201310017209.4),亚洲1型检测血清效价为1:7000,O型检测血清效价为1:6000,A型检测血清效价为1:6000,均可用于本发明。

[0054] 5. 免疫扩散试验:将步骤4所获检测血清分别加于三个中间孔中,即1号中间孔加亚洲1型特异性检测血清,2号中间孔加O型特异性检测血清、3号中间孔加A型特异性检测血清,将步骤2所获的浓缩抗原(编号1-1、1-2、1-3、1-4、1-5、1-6)以不同倍数稀释分别加在对应的外周孔,包括不稀释的、1:2、1:4,至1:32。抗原和血清加量均为20-30μL。另外设4号中间孔加阳性抗原及阴性抗原,4号外周孔加检测血清对照,阳性抗原为含亚洲1型146S抗原、O型146S抗原和A型146S抗原三个型各20μg/mL的混合抗原,阴性抗原为细胞培养液,均重复一次。置于湿盒中,室温放24-48小时,观察。

[0055] 6. 口蹄疫疫苗组份的甄别及抗原含量的估算:24-48小时后根据出现沉淀线情况判定口蹄疫疫苗组份。计算公式:含量=(出现沉淀线的最高稀释倍数×10÷浓缩倍数)×[抗原相体积/(抗原相+油相)的体积](见表4)。

[0056] 表4 6个检测疫苗中每毫升疫苗中三型口蹄疫病毒146S 抗原含量(μg)结果(免疫扩散)

[0057]

疫苗编号	亚洲1型检测血清				O型检测血清				A型检测血清				型别判定	146S含量 μg/mL
	0	1:2	1:4	1:8	1:4	1:8	1:16	1:32	1:2	1:4	1:8	1:16		
1-1	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	亚+O+A 三价苗	亚: 2.0 O: 3.0 A: 4.0
1-2	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	亚+O 双价苗	亚: 1.66 O: 6.65 A: 0
1-3	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	O+A 双价苗	亚: 0 O: 7.81 A: 7.81
1-4	1:4 +	1:8 +	1:16 +	1:32 -	-	-	-	-	-	-	-	-	亚洲1型 单价苗	亚: 11.51 O: 0 A: 0
1-5	-	-	-	-	1:4 +	1:8 +	1:16 +	1:32 -	-	-	-	-	O型 单价苗	亚: 0 O: 11.29 A: 0
1-6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	A型 单价苗	亚: 0 O: 0 A: 2.37

“+”出现沉淀线,“-”:没有沉淀线;含量=(出现沉淀线的最高稀释倍数×10÷浓缩倍数)×[抗原相体积/(抗原相+油相)的体积]

[0058] 由上述实验可以看出,本发明的方法能够对疫苗的类型做出判断,同时又能估算

出各组分含量,从根本上取代了时疫苗免疫血清抗体效价检测本动物的使用,使得动物的选择变得容易,而且在疫苗使用前就能对疫苗的质量加以评估,剔除不合格的产品。

[0059] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。



