



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104634959 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201310552088. 3

(22) 申请日 2013. 11. 08

(71) 申请人 丽珠集团疫苗工程股份有限公司

地址 519040 广东省珠海市金湾区红旗镇联
港工业区双林片区创业北路 38 号 C02
楼 202 室

(72) 发明人 罗翀 李刚 关欣 陈小芳

李云富 汪恩浩

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理

事务所(普通合伙) 11382

代理人 李渤 张伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

权利要求书1页 说明书13页

(54) 发明名称

一种处理液以及采用其测定铝盐吸附型疫苗
中抗原含量的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于解吸附铝盐吸附型疫苗中的抗原的处理液,所述处理液为磷酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液,并包含蛋白质以及一种或多种酸和/或它们的盐。本发明还公开了一种采用该处理液检测铝盐吸附型疫苗中抗原含量的方法。本发明方法减少了乙脑疫苗中的铝佐剂对抗原含量检测的干扰,为一种能够快速、准确测定吸附型乙型肝炎灭活疫苗中抗原含量的方法。此外,本发明的方法具有耐用性强、准确度及精密度高的特点,可以为铝佐剂吸附型乙脑灭活疫苗的质量控制提供参考。

1. 一种用于解吸附铝盐吸附型疫苗中的抗原的处理液,其特征在于,所述处理液为磷酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液,并包含蛋白质以及一种或多种酸和 / 或它们的盐。

2. 根据权利要求 1 所述的处理液,其特征在于,所述处理液的 pH 为 6.5-9.0 ;

优选地,所述处理液为 0.02-2.0mol/L pH6.5-9.0 的磷酸盐缓冲液 ;所述 pH 更优选为 7.0-8.5,进一步优选为 7.0。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的处理液,其特征在于,所述酸为选自以下的有机酸 :水合或非水合的柠檬酸或酒石酸 ;

优选地,所述盐为柠檬酸钠或酒石酸钠 ;

优选地,所述酸和 / 或它们的盐在所述处理液中各自的浓度为 100-1000meq. /L。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的处理液,其特征在于,所述蛋白质为白蛋白,优选血清白蛋白 ;

优选地,所述蛋白质在所述处理液中的浓度为 10 - 30% (w/v),优选 30% (w/v)。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的处理液,其特征在于,所述处理液为含有 0.05mol/L 氯化钠、1000meq. /L 柠檬酸和 30% 牛血清白蛋白的 2.0mol/L pH7.0 的磷酸盐缓冲液。

6. 一种用于检测铝盐吸附型疫苗中抗原含量的方法,其特征在于,所述方法包括 :采用根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的处理液处理待检测疫苗。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤 :

(1) 将待检测疫苗配制成溶液,然后与所述处理液混匀后孵育 ;

(2) 采用酶联免疫吸附法检测步骤(1)得到的混合液中的抗原含量。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法,其特征在于,所述疫苗为乙脑灭活疫苗,所述抗原为乙脑病毒抗原 ;

优选地,所述铝盐为氢氧化铝和 / 或磷酸铝佐剂。

9. 根据权利要求 6 至 8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)包括 :用等渗磷酸盐缓冲液稀释待检测疫苗至抗原含量为 0.08-2.6EU/ml,然后以溶液与所述处理液按照体积比 1:10-10:1 混匀后孵育 ;

优选地,所述待检测疫苗用 pH6.0-8.0 的等渗磷酸盐缓冲液配制成抗原含量为 0.08-2.6EU/ml 的溶液 ;进一步优选地,所述待检测疫苗用 pH6.0-8.0 的等渗磷酸盐缓冲液配制成抗原含量为 1.5EU/ml 的溶液 ;

优选地,所述供试品溶液 :所述处理液的体积比为 10:1 ;

优选地,所述孵育为在室温下或者在 4-50℃ 的气浴或水浴中孵育 1-48 小时,优选 0.5-1.5 小时 ;进一步优选地,所述孵育为在 20-30℃、优选 25℃ 孵育 1 小时。

10. 根据权利要求 6 至 9 中任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)包括 :将待检测疫苗以 pH6.0-8.0 的等渗磷酸盐缓冲液配制成抗原含量为 1.5EU/ml 的溶液,然后以溶液 :所述处理液的体积比为 10:1 混匀后在 25℃ 下孵育 1 小时。

11. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的处理液在配制铝盐吸附型疫苗中抗原含量的检测试剂中的用途。

一种处理液以及采用其测定铝盐吸附型疫苗中抗原含量的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域。具体而言,本发明涉及吸附型灭活疫苗中抗原解吸附的处理液及所述抗原的含量测定方法。

背景技术

[0002] 乙型脑炎病毒抗原是乙型脑炎灭活疫苗中的主要有效成分,其有效含量与疫苗接种后的保护效果直接相关,因此,其抗原含量是乙型脑炎灭活疫苗质量控制中的一项重要检测项目。

[0003] 目前,对乙型脑炎病毒抗原含量的检测大多采用酶联免疫吸附法,其原理是将可溶性的乙型脑炎病毒单克隆抗体或高纯度的多克隆抗体吸附在酶联反应板上,使供试品中的待检抗原与其发生特异性结合,再加入酶标抗体,使其与吸附在酶联反应板上的抗原结合形成免疫复合物,通过酶反应底物在酶的作用下产生显色反应,并根据颜色变化对供试品中的抗原做定量分析。这种方法具有操作简便、准确度高等优点,但是其检测结果易受供试品中其他非抗原成分的干扰,出现假阳性或假阴性结果。并且,乙型脑炎灭活疫苗中的抗原为灭活病毒抗原,在接种后诱导机体产生的免疫反应要弱于减毒疫苗,因此,为了使接种者更有效的获得免疫,常需要加入佐剂制备成吸附型疫苗,诱导机体对病毒抗原产生免疫识别。铝盐佐剂是目前惟一可用于人体的佐剂,这类佐剂包括氢氧化铝佐剂、磷酸铝佐剂、铝佐剂。它们会与抗原表面携带的负电荷基团发生共价或配位结合,以颗粒的方式包裹抗原,与可溶性抗原一起形成沉淀,从而使复合物更具免疫性。铝盐佐剂与抗原的结合屏蔽了抗原表面的特异性结合位点,进而在抗原的体外检测过程中,抗原无法与酶联反应板或酶标抗体上的特异性抗体相结合,从而导致抗原检出量偏低或无法检出。针对这一类吸附疫苗还没有成熟的抗原含量检测方法,特别是对吸附乙型脑炎疫苗的病毒抗原检测,也未见文献报道。

[0004] 目前国外对于铝盐吸附疫苗中的抗原含量检测也仅处于研究阶段。相关研究表明铝盐佐剂与抗原之间的相互吸附作用主要是通过以下三种方式实现:静电吸引力、疏水作用以及配基交换作用。为了能够准确测定吸附疫苗中的病毒抗原,需要首先破坏抗原与佐剂之间的这三种相互作用力,使抗原先从佐剂上解离下来,暴露出抗原表面上相应的抗原决定簇,再通过酶联免疫吸附法或电泳等方法对其进行检测。据文献报道,一些金属离子螯合剂、表面活性剂、有机酸、乙二醇等物质可以针对抗原与佐剂之间存在的一种或几种相互作用力进行破坏,达到解离抗原的目的。因此,以这些化学物质为基础设计的样品处理液屡见报道,主要有如下两种样品处理液:

[0005] 以不同浓度的表面活性剂(包括十六烷基磺酸钠,曲通-100,西氯吡铵,盐酸胍)作为样品处理溶液,其作用机理可能是通过表面活性剂与抗原的交联作用使其从铝佐剂上解离下来。文献表明,使用10mM的阳离子表面活性剂西氯吡铵处理氢氧化铝佐剂吸附的卵清蛋白疫苗,其解离效果最好,卵清蛋白的回收率可达50%。但是,几乎所有的表面活性剂都会

或多或少的对蛋白质的结构造成破坏,引起蛋白质变性,因此抗原回收率很少达到 60%。同时,不同蛋白质的理化性质不同,对同一种表面活性剂的耐受程度也会存在较大的差异。吸附乙型脑炎灭活疫苗中的乙脑抗原在阳离子表面活性剂以及阴离子表面活性剂中均较易受到破坏;实验表明,使用 5mM 的西氯吡啶溶液或使用浓度为 0.1-5% 的十二烷基磺酸钠溶液对铝佐剂吸附乙型脑炎灭活疫苗处理 5 分钟,都会对乙脑抗原表面的特异性靶点结构造成损害,导致抗原无法检出。在表面活性剂中,尿素属于温和变性剂,对抗原结构的影响较小,但将其应用于吸附乙型脑炎灭活疫苗的解吸附,其抗原回收率也仅有 20% 左右,这表明乙型脑炎病毒抗原的结构容易受到表面活性剂的破坏,表面活性剂并不适宜作为吸附乙型脑炎灭活疫苗样品的处理液。

[0006] 另一种样品处理溶液为羊组织间液,使用该溶液孵育吸附型疫苗,相当于模拟吸附型疫苗在体液环境中缓慢解离并释放抗原的过程,这种样品处理液与上述的表面活性剂处理液相比,可以更加缓和的释放抗原,也不会对抗原蛋白结构造成大规模破坏。但这种方法的应用受限于抗原的理化性质,例如:对于与氢氧化铝佐剂吸附系数为 0.086 的卵清蛋白,需要反应 4 小时才能完全解吸附;对于与氢氧化铝佐剂吸附系数为 6 的乙肝抗原,在作用 48 小时后,其抗原解离率还不到 1%。除此之外,羊组织间液还具有不易制备,成本较高,检测耗时长等缺点,难以推广。因此,Stanley L. Hem 等人针对羊组织间液中的主要有效成分进行了进一步的研究,他们认为羊组织间液中含有的一些成分可以与铝佐剂更强有力的结合,从而解除铝佐剂与抗原之间的配基交换作用,将抗原解离下来。但是,这种建立在模拟体液环境下的样品处理液,与羊组织间液一样,仅能够对铝佐剂-抗原之间的配位交换作用力起到一定程度的破坏作用,而对于含有多种相互作用力的铝盐佐剂-复合物,则起不到很好的解吸附效果。实验表明,使用这种样品处理液对吸附乙型脑炎疫苗处理 48 小时,其解吸附率仅达到 30%。这表明乙型脑炎抗原与铝盐佐剂之间的吸附机制不仅仅是配基交换作用,可能同时包含较强的疏水作用力、静电吸引力。

[0007] 因此,有必要针对乙型脑炎抗原与铝佐剂之间的强吸附特点,开发一种新型样品处理液,从而突破现有技术障碍,使其可以同时破坏抗原与佐剂之间较强的配位交换作用力、疏水作用力以及静电吸引力,在较短时间内解离 80% 以上的抗原,并可以通过酶联免疫法或电泳等方法对解离后的乙型脑炎抗原进行准确定量。

发明内容

[0008] 本发明要解决的技术问题是要克服现有方法还不能够对吸附型乙型脑炎灭活疫苗中的抗原含量进行体外检测,以打破无法直接对该疫苗中抗原含量进行有效的质量控制这一难题,最终目的在于提供一种准确、有效的方法检测吸附型乙型脑炎灭活疫苗中的抗原含量。

[0009] 因此,本发明的一个目的是提供一种用于解吸附铝盐吸附型疫苗中的抗原的处理液。本发明的另一个目的是提供采用该处理液检测铝盐吸附型疫苗中抗原含量的方法。本发明的又一个目的是提供该处理液在配制铝盐吸附型疫苗中抗原含量的检测试剂中的用途。

[0010] 为解决上述技术问题,本发明主要通过以下技术方案实现:

[0011] 一方面,本发明提供一种用于解吸附铝盐吸附型疫苗中的抗原的处理液,所述处

理液为磷酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液,并包含蛋白质以及一种或多种酸和/或它们的盐。本发明提供的这种处理液将会对铝盐吸附型灭活疫苗、特别是乙型脑炎灭活疫苗中的抗原与铝佐剂进行解吸附处理,使得被解吸附的抗原能够用于采用酶联免疫乙脑病毒抗原检测试剂盒或电泳方法对其含量进行测定。

[0012] 优选地,所述处理液的 pH 为 6.5-9.0。优选地,所述处理液为 0.02-2.0mol/L pH6.5-9.0 的磷酸盐缓冲液;所述 pH 更优选为 7.0-8.5,进一步优选为 7.0。

[0013] 在所述处理液中,所述酸为选自以下的有机酸:水合或非水合的柠檬酸或酒石酸;所述盐优选为柠檬酸钠或酒石酸钠;

[0014] 优选地,所述酸和/或它们的盐在所述处理液中各自的浓度为 100-1000meq./L。

[0015] 并且,所述蛋白质为白蛋白,优选血清白蛋白;优选地,所述蛋白质在所述处理液中的浓度为 10-30% (w/v),优选 30% (w/v)。

[0016] 根据本发明的具体实施方式,所述处理液为含有 0.05mol/L 氯化钠、1000meq./L 柠檬酸和 30% 牛血清白蛋白的 2.0mol/L pH7.0 的磷酸盐缓冲液。

[0017] 另一方面,本发明一种用于检测铝盐吸附型疫苗中抗原含量的方法,所述方法包括:采用本发明提供的上述处理液处理待检测疫苗。

[0018] 优选地,所述方法包括以下步骤:

[0019] (1) 将待检测疫苗配制成溶液,然后与所述处理液混匀后孵育;

[0020] (2) 采用酶联免疫吸附法检测步骤(1)得到的混合液中的抗原含量。

[0021] 其中,所述疫苗优选为乙脑灭活疫苗,所述抗原优选为乙脑病毒抗原;

[0022] 优选地,所述铝盐为氢氧化铝佐剂和/或磷酸铝。

[0023] 并且,所述步骤(1)优选包括:用等渗磷酸盐缓冲液稀释待检测疫苗至抗原含量为 0.08-2.6EU/ml,然后以溶液与所述处理液按照体积比 1:10-10:1 混匀后孵育;

[0024] 其中优选地,将待检测疫苗以 pH6.5-8.0 的等渗磷酸盐缓冲液配制成抗原含量在 0.08-2.6EU/ml 范围内的溶液;进一步优选地,所述待检测疫苗以 pH6.5-8.0 的等渗磷酸盐缓冲液配制成抗原含量为 1.5EU/ml 的溶液;

[0025] 优选地,所述溶液:所述处理液的体积比为 10:1;

[0026] 优选地,所述孵育为在室温下或者在 4-50°C 的气浴或水浴中孵育 1-48 小时,优选 0.5-1.5 小时;进一步优选地,所述孵育为在 20-30°C、优选 25°C 下孵育 1 小时。

[0027] 根据本发明的具体实施方式,所述步骤(1)包括:将待检测疫苗以 pH6.5-8.0 的等渗磷酸盐缓冲液配制成抗原含量为 1.5EU/ml 的溶液,然后以溶液:所述处理液的体积比为 10:1 混匀后在 25°C 下孵育 1 小时。

[0028] 具体而言,本发明所述一种检测铝盐吸附型疫苗中抗原含量的方法示例性地包括以下步骤:

[0029] (1) 制备处理液

[0030] 用二水合磷酸二氢钠和十二水合磷酸氢二钠配制 2.0mol/L pH7.0 的磷酸盐缓冲液,然后向该缓冲液中分别加入氯化钠、柠檬酸、牛血清白蛋白,使终溶液中分别含有 0.05mol/L 氯化钠、1000meq./L 柠檬酸,30% 牛血清白蛋白。

[0031] (2) 采用处理液预处理疫苗样品

[0032] 取氢氧化铝佐剂制备的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品,其抗原含量在

0.08-2.6EU/ml 之间。按照 10:1 体积比的比例加入处理液,涡旋震荡 10 秒钟混匀,然后在室温下孵育 1 小时。

[0033] (3) 检测抗原含量

[0034] 用酶联免疫乙脑病毒定量检测试剂盒对上述第(2)步处理后的混合液进行抗原含量检测。抗原含量检测范围为 0.0031-0.05EU/ml。阳性参考品为北京天坛生物制品股份有限公司生产的乙脑灭活疫苗冻干制剂;阴性对照品为不含乙型脑炎抗原的样品稀释液;标准品为酶联免疫乙脑病毒定量检测试剂盒中的 1.0EU/ml 乙脑灭活疫苗冻干制剂,临用前用该试剂盒内的样品稀释液将其依次稀释为抗原浓度为 0.0031EU/ml、0.0062EU/ml、0.0125EU/ml、0.025EU/ml、0.05EU/ml 的标准溶液。具体检测方法如下:

[0035] (3-1) 样品稀释:取 100 μ l 处理后的样品,用样品稀释液稀释到 0.0031-0.05EU/ml 的抗原含量范围内;

[0036] (3-2) 上样:向已包被乙脑病毒抗体的 96 孔微孔板中依次加入阴性对照品、0.0031、0.0062、0.0125、0.025、0.05EU/ml 浓度的标准溶液、阳性参考品、待测样品。除阴性对照品外,标准品、阳性参考品和待测样品均再做一个平行孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时;

[0037] (3-3) 用样品洗涤液洗净微孔板,每孔加入 100 μ l 酶标记乙脑病毒抗体工作液,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 20min;

[0038] (3-4) 用洗涤液洗净微孔板,依次加入 50 μ l 过氧化氢显色液,50 μ l TMB 显色液,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 10min;

[0039] (3-5) 每孔加入 50 μ l 4N 盐酸终止反应;

[0040] (3-6) 将微孔板稍加震荡混匀,置于酶标仪上,进行 450nm-630nm 双波长扫描,得到样品的吸光度。

[0041] (4) 结果计算

[0042] 以标准品吸光度的对数值为纵坐标,对标准品抗原含量的对数值作一标准曲线。将供试品的吸光度值带入该标准曲线方程得到该供试品的抗原含量。

[0043] 又一方面,本发明根据上述处理液在配制铝盐吸附型疫苗中抗原含量的检测试剂中的用途。

[0044] 本发明提供了一种疫苗处理液,其能够使铝盐吸附型灭活疫苗、特别是乙脑灭活疫苗中的抗原与铝佐剂解吸附。并且基于该处理液,本发明建立了一种能够准确、有效检测吸附型乙型脑炎灭活疫苗中的抗原含量的检测分析方法,该方法涉及的样品处理过程减少了铝盐佐剂对吸附型乙型脑炎灭活疫苗中抗原含量检测的干扰,具有耐用性强、准确度高、精密度高的特点,为吸附型活疫苗、特别是乙型脑炎灭活疫苗的质量控制提供了有效的体外抗原含量检测技术。

[0045] 本发明采用该处理液处理氢氧化铝佐剂制备的吸附型乙型脑炎疫苗样品,然后再使用酶联免疫吸附法进行乙型脑炎抗原含量检测,结果表明所述处理液对乙型脑炎疫苗抗原含量检测无干扰;又对该疫苗中的抗原含量进行分析,分别配制了一系列抗原含量不同的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品,用上述方法进行检测,验证了本发明方法的准确性(详见表 2、表 3)。

[0046] 本发明还比较了多种样品处理液对该方法准确性的影响,并以其中一种样品处理液为例说明了处理条件以及处理液中一些关键组成成分的最优浓度范围。并且,本发明对

该方法的重复性及精密度进行了分析：由同一实验人员对六支吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品同时进行抗原含量检测，其变异系数为 1.1%；由同一实验人员对六支吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品在不同时间进行抗原含量检测，其变异系数亦为 1.1%；由四个实验人员对四支吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品进行抗原含量检测，其变异系数为 1.2%，以上变异系数均小于 2%，表明本发明方法的重复性高，精密度高（详见表 9）。

[0047] 本发明还对样品处理过程中的温度和时间耐用性进行了考察，表明处理过程中的孵育温度在 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 范围内，孵育时间在 0.5-1.5 小时范围内，对吸附乙型脑炎灭活疫苗的抗原含量测定无干扰，表明本发明方法的耐用性好（详见表 10）。

具体实施方式

[0048] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

[0049] 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吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品均为自制；试剂均为市售；酶联免疫乙脑病毒定量检测试剂盒与阳性对照品均为北京天坛生物制品股份有限公司购买。

[0050] **实施例 1** 检测样品处理溶液的抗原含量，并对六个不同浓度的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品的抗原含量进行检测。

[0051] 分别取抗原浓度为 7.4EU/ml 的疫苗原液 0.702ml、0.252ml、0.176ml、0.088ml、0.044ml、0.022ml 加入试管中，分别向各管加入氢氧化铝佐剂溶液（北京博枫科生物科技有限公司）至终浓度为氢氧化铝溶液 / 混合液 = 20% (v/v)，并加入超纯水补足各管体积至 2ml。即配制成了理论上抗原含量为 0.08EU/ml、0.16EU/ml、0.32EU/ml、0.65EU/ml、1.3EU/ml、2.6EU/ml 的疫苗样品，每个浓度各配制四支。对这些含不同抗原浓度的疫苗样品按以下步骤进行检测：

[0052] (1) 检测吸附率

[0053] 取上述 0.08EU/ml、0.16EU/ml、0.32EU/ml、0.65EU/ml、1.3EU/ml、2.6EU/ml 的疫苗样品各一支经 10000rpm 离心 15 分钟后取上清液各 100 μl ，用酶联免疫乙脑病毒定量检测试剂盒进行抗原含量检测。各浓度疫苗样品的抗原吸附率按下述公式进行计算：吸附率 (%) = $[1 - (\text{测定抗原含量} / \text{理论抗原含量})] \times 100\%$ 。具体结果见表 1。

[0054] (2) 制备处理液

[0055] (2-1) 用二水合磷酸二氢钠和十二水合磷酸氢二钠配制 2.0mol/L pH7.0 的磷酸盐缓冲液，然后向该缓冲液中分别加入氯化钠、柠檬酸、牛血清白蛋白，使终溶液中分别含有 0.05mol/L 的氯化钠、1000meq./L 柠檬酸，30% 牛血清白蛋白。

[0056] (2-2) 用柠檬酸和柠檬酸钠配制 1000meq./L 的柠檬酸盐缓冲液，溶液 pH 为 7.0，然后向该缓冲液中分别加入氯化钠、牛血清白蛋白，使终溶液中分别含有 0.05mol/L 氯化钠、30% 牛血清白蛋白。

[0057] (2-3) 用二水合磷酸二氢钠和十二水合磷酸氢二钠配制 2.0mol/L pH8.5 的磷酸盐缓冲液，然后向该缓冲液中分别加入氯化钠、酒石酸钠、牛血清白蛋白，使终溶液中分别含有 0.05mol/L 氯化钠、0.5mol/L 酒石酸钠、30% 牛血清蛋白。

[0058] (3) 采用处理液处理疫苗样品

[0059] 分别取抗原含量为 0.08EU/ml、0.16EU/ml、0.32EU/ml、0.65EU/ml、1.3EU/ml、2.6EU/ml 的疫苗样品各 3 支,每支 1ml,按照 10:1 的体积比分别加入 0.1ml 上述(2-1)处理液,(2-2)处理液、(2-3)处理液,涡旋震荡 10 秒钟混匀,然后在室温下孵育 1 小时。每个浓度各做三个平行样品。

[0060] (4) 抗原含量检测

[0061] 用酶联免疫乙脑病毒定量检测试剂盒对上述第(2)步处理后的混合液进行检测。抗原含量检测范围为:0.0031-0.05EU/ml。阳性参考品为北京天坛生物制品股份有限公司生产的乙脑灭活疫苗冻干制剂;阴性对照品为不含乙脑抗原的样品稀释液;标准品为一支抗原含量为 1.0EU/ml 的乙脑灭活疫苗冻干制剂,为试剂盒自带标准品。

[0062] (4-1) 样品稀释:用试剂盒自带的样品稀释液将 0.08EU/ml、0.16EU/ml、0.32EU/ml、0.65EU/ml、1.3EU/ml、2.6EU/ml 处理后的铝佐剂吸附型乙脑灭活疫苗样品稀释至理论抗原含量在 0.0031-0.05EU/ml 浓度范围内;并将 1.0EU/ml 的乙脑灭活疫苗标准品依次稀释为抗原浓度为 0.05EU/ml、0.025EU/ml、0.0125EU/ml、0.0062EU/ml、0.0031EU/ml 的标准溶液。

[0063] (4-2) 上样:取已包被乙脑病毒抗体的 96 孔微孔板,第一孔为空白孔,第二孔加入不含乙型脑炎抗原的阴性对照品,从第 3 孔依次加入 0.0031EU/ml、0.0062EU/ml、0.0125EU/ml、0.025EU/ml、0.05EU/ml 的标准溶液、阳性参考品、样品处理液、稀释后的供试品(即待测样品)各 100 μ l,除阴性孔外,其他每个样品均做一个平行孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时;

[0064] (4-3) 用样品洗涤液洗净微孔板,每孔加入 100 μ l 酶标记乙脑病毒抗体工作液,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 20min;

[0065] (4-4) 用洗涤液洗净微孔板,依次加入 50 μ l 过氧化氢显色液,50 μ l TMB 显色液,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 10min;

[0066] (4-5) 每孔加入 50 μ l 14N 盐酸终止反应。

[0067] (4-6) 将微孔板置于酶标仪上,进行 450nm-630nm 双波长扫描,得到样品的吸光度。

[0068] (5) 结果计算:

[0069] 以标准品吸光度的对数值对样品的抗原含量对数值作标准曲线,得到具有线性相关的一次项方程。将供试品测定的吸光度值带入该方程,得到每个供试品所对应的抗原含量,对同一抗原浓度的三个供试品的抗原含量测定值取平均值,计算供试品中的抗原回收率。

[0070] 回收率计算:回收率(%) = (疫苗样品测得平均抗原含量 / 疫苗样品理论抗原含量) \times 100%。具体结果见表 2。

[0071] 表 1 实施例 1 吸附率检测结果汇总

[0072]

序号	疫苗样品理论抗原含量 (EU/ml)	疫苗样品测得平均抗原含量 (EU/ml)	吸附率 (%)
1	2.6	<0.0031	>99.8
2	1.3	<0.0031	>99.8
3	0.65	<0.0031	>99.5
4	0.32	<0.0031	99%
5	0.16	<0.0031	>98%
6	0.08	<0.0031	96.1%

[0073] 分析：用乙脑酶联免疫定量检测试剂盒对实施例 1 中配制的各浓度疫苗样品进行直接检测，其平均抗原含量均小于 <0.0031EU/ml，经计算后可以表明其吸附率均已达到 95% 以上，即抗原吸附完全。

[0074] 表 2 实施例 1 使用 (2-1) 处理液抗原回收率测定结果汇总

[0075]

序号	疫苗样品理论抗原含量 (EU/ml)	疫苗样品测得平均抗原含量 (EU/ml)	回收率 (%)
1	0 (样品处理液 2-1)	<0.0031	/
2	2.6	2.4	92.3
3	1.3	1.2	92.3
4	0.65	0.53	81.5
5	0.32	0.29	90.6
6	0.16	0.14	87.5
7	0.08	0.08	100
抗原回收率在 80%-100% 之间，准确度高。			
以理论抗原含量对测定抗原含量作曲线，得到如下方程： $Y=0.9268X-0.016$ ， $R^2=0.999$ 。			

[0076] 表 3 使用 (2-2) 处理液抗原回收率测定结果

[0077]

序号	疫苗样品理论抗原含量	疫苗样品测得平均抗原含量	回收率
----	------------	--------------	-----

[0078]

	(EU/ml)	(EU/ml)	(%)
1	0 (样品处理液 2-2)	<0.0031	/
2	2.6	1.8	69
3	1.3	0.85	65.4
4	0.65	0.44	67.7
5	0.32	0.25	78.1
6	0.16	0.12	75.0
7	0.08	0.06	75.0
抗原回收率在 65%-78%之间。			
以理论抗原含量对测定抗原含量作曲线, 得到如下方程: $Y=1.4631X-0.0067, R^2=0.9986$ 。			

[0079] 表 4 使用 (2-3) 处理液抗原回收率测定结果

[0080]

序号	疫苗样品理论抗原含量 (EU/ml)	疫苗样品测得平均抗原含量 (EU/ml)	回收率 (%)
1	0 (样品处理液 2-3)	<0.0031	/
2	2.6	2.4	92.3
3	1.3	1.2	92.3
4	0.65	0.52	80.0
5	0.32	0.25	78.1
6	0.16	0.16	100
7	0.08	0.08	100
抗原回收率在 80%-100%之间。			
以理论抗原含量对测定抗原含量作曲线, 得到如下方程: $Y=1.3588X-0.0289, R^2=0.9967$ 。			

[0081] 分析: 表 2 至表 4 中的样品处理液抗原含量均小于 0.0031EU/ml, 可以视为这三种样品处理液对抗原含量检测无干扰, 表明样品处理液对该方法的专属性无影响。用 (2-1)、(2-3) 样品处理液处理六个不同浓度的疫苗样品, 其抗原回收率达到 80%-100%, 且线性较好, $R^2 > 0.99$ 。用 (2-2) 处理液处理待检疫苗, 其抗原回收率亦在 50% 以上。该实施例结果表明本发明方法突破了原有技术对这类疫苗样品无法检出的障碍, 而且准确度高; 且理论

抗原含量与检测抗原含量成线性相关,表明该实施对抗原含量在 0.08-2.6EU/ml 的疫苗样品可以进行定量检测。

[0082] 由于样品处理液(2-1)和(2-3)均可以使 0.08-2.6EU/ml 浓度范围内供试品达到 80%-100% 的抗原回收率,因此,在后续的实施例中仅以(2-1)样品处理液为例进行具体说明。

[0083] **实施例 2** 样品处理液中牛血清白蛋白的含量对吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品的抗原含量检测的影响

[0084] 在实施例 1 中(2-1)样品处理液的基础上,分别配制含牛血清白蛋白含量为 5%(w/v)、10% (w/v)、15% (w/v)、20% (w/v)、30% (w/v)、40% (w/v) 的样品处理液,考察其对该检测方法的影响。具体如下:

[0085] 按照实施例 1 中的方法配制六支含 1.3EU/ml 乙脑抗原的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品,分别向其中加入含 5%、10%、15%、20%、30%、40% 牛血清白蛋白的样品处理液,按实施例 1 中的处理方法进行处理,再进行抗原含量检测,结果计算方法也如实施例 1 中所述。实施结果见表 5。

[0086] 表 5 实施例 2 结果汇总

[0087]

样品理论抗原含量 (EU/ml)	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
处理液中的牛血清白蛋白含量(w/v)	5%	10%	15%	20%	30%	40%
实测抗原含量 (EU/ml)	0.75	0.99	1.1	1.1	1.2	1.1
抗原回收率 (%)	57.7	76.1	84.6	84.6	92.3	84.6

[0088] 分析:实施例 2 结果表明牛血清白蛋白的含量 <10% 时,其抗原回收率偏低,其含量在 10%-40% 之间时对样品中抗原的解离起到了关键的作用,当牛血清白蛋白的含量超过 30% 时,因其较难溶解,造成了样品的抗原含量回收率偏低。因此,样品处理液中牛血清白蛋白的含量宜在 10%-30% 之间,在 30% 时可以对乙脑灭活疫苗中的抗原达到最好的解离效果。

[0089] **实施例 3** 说明样品处理液与吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品的配制比例。

[0090] 按照实施例 1 中的方法配制六支含 1.3EU/ml 乙脑抗原的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品 1ml,分别向其中加入 10ml、5ml、1ml、0.5ml、0.1ml、0.05ml 的(2-1)样品处理液,其它步骤按实施例 1 中的处理方法进行处理,再进行抗原含量检测,结果计算方法也如实施例 1 中所述。实施结果见表 6。

[0091] 表 6 实施例 3 结果汇总

[0092]

样品理论抗原含量 (EU/ml)	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
样品溶液体积 (ml)	1	1	1	1	1	1
处理液体积 (ml)	10	5	1	0.5	0.1	0.05
实测抗原含量 (EU/ml)	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	0.55
抗原回收率 (%)	92.3	92.3	92.3	92.3	92.3	42.3

[0093] 分析:从实施例 3 中的结果可以看出,待检测疫苗与样品处理液按照 1:10 至 1:0.1 的体积比配制后,其最终的抗原回收率相近,均为 92.3%,当再减少样品处理液的体积至 50 μ l 时,即此时待检测疫苗与样品处理液的体积比为 20:1 时,抗原的解吸附效果急剧下降,因此,样品处理液与待检测疫苗的体积比可以控制在 10:1-1:10 范围内。

[0094] 实施例 4 使用(2-1)样品处理液对吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品进行处理,说明其处理时间对检测方法的影响。

[0095] 本实施例主要说明了对样品进行气浴或水浴加热时,使待检测样品中的乙脑抗原解离的最佳时间和最佳温度范围。

[0096] 取 13 支含 1.5EU/ml 乙脑抗原的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品,经(2-1)样品稀释液处理后各取 100 μ l 按本发明方法进行抗原含量检测,具体操作除样品处理和样品稀释步骤具体如下外,其他操作步骤均与实施例 1 相同,在此不再赘述。

[0097] 样品处理:将 13 支供试品溶液分别与实施例 1 中提及的(2-1)样品处理溶液按照 10:1 的比例混合。涡旋震荡 10 秒钟混匀,然后分别在 4 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C 水浴以及在上述各温度的气浴条件下孵育 1 小时;25 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1 小时,6 小时,12 小时,24 小时,48 小时。

[0098] 样品稀释:取经上述处理后的供试品,用样品稀释液稀释至抗原含量在 0.0031-0.05EU/ml 范围内上样。具体结果见表 7。

[0099] 表 7 实施例 4 实验结果汇总

[0100]

	水浴孵育 1 小时 (°C)				气浴孵育 1 小时 (°C)			
	4	25	37	45	4	25	37	45
抗原含量 (EU/ml)	1.0	1.4	1.4	1.4	0.9 5	1.3	1.0	0.85
回收率 (%)	66.7	93.3	93.3	93.3	63. 3	86.7	66.7	56.7
	水浴 25°C 孵育 (小时)							
	1	6	12	24	48			
抗原含量 (EU/ml)	1.4	1.4	1.4	1.4	1.3			
回收率 (%)	93.3	93.3	93.3	93.3	86.7			

[0101] 分析:从实验结果可以看出将供试品与处理液的混合液置于 25°C -45°C 之间水浴 1 小时,其最终检测出的抗原含量稳定在 1.4EU/ml 左右,因此优选为水浴 25°C 孵育 1 小时。对于气浴孵育条件,可以看出在孵育温度达 25°C 时为最佳,其抗原回收率为 86.7%,要低于水浴同温度下孵育 1 小时的抗原回收率。由上述结果可以看出无论在气浴还是水浴条件下孵育 4-45 小时,对于供试品都可以达到 50% 以上的抗原回收率,优选为 25°C 水浴孵育 1 小时。

[0102] 进一步对水浴 25°C 孵育条件下的孵育时间进行考察,在表 7 中可以看出,水浴孵育 1-48 小时范围内,都可以使供试品中的抗原回收率维持在 85% 以上。因此,孵育时间更优选为 1 小时。

[0103] 实施例 5 检测经处理前后的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品中的抗原含量,说明方法的重复性。

[0104] 分别用酶联免疫吸附法对经 (2-1) 样品处理液处理前后的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品进行抗原含量检测。结果表明了处理过程对供试品中抗原含量检测的关键性,并说明了本发明方法有很好的重复性。

[0105] 取六支含 1.5EU/ml 乙脑抗原的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品,由同一操作人员分别取 100 μ l 供试品溶液直接进行上述实施例 1 第 (4) 步的抗原含量检测。

[0106] 再取六支同样的疫苗样品按本发明方法进行抗原含量检测,具体操作除样品处理和样品稀释步骤具体如下外,其他操作步骤均与实施例 1 相同,在此不再赘述。实施结果见表 7。

[0107] 样品处理:将供试品溶液与实施例 1 中提及的 (2-1) 样品处理溶液按照 10:1 的比例混合。涡旋震荡 10 秒钟混匀,然后在室温下孵育 1 小时。

[0108] 样品稀释:取经上述处理后的供试品,用样品稀释液稀释至抗原含量在 0.0031-0.05EU/ml 范围内上样。

[0109] 表 8 实施例 5 结果汇总

[0110]

未经处理过程		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	重复 6
	抗原含量 (EU/ml)	<0.0031	<0.0031	<0.0031	<0.0031	<0.0031	<0.0031
经处理过程		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	重复 6
	抗原含量 (EU/ml)	1.4	1.5	1.4	1.3	1.4	1.4
	$X_{(\text{平均值})}=1.4$, $SD=1.53$, $CV=1.1\%$; 平均抗原回收率 = (抗原含量平均值 / 理论抗原含量) $\times 100\% = 1.4/1.5 = 93\%$						

[0111] 实施例 5 的结果表明,对吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品直接进行抗原含量检测,在 0.0031EU/ml 的定量限内根本无法检出抗原;而在对供试品进行预处理后,其平均抗原回收率可达 93%,表明处理过程为该方法的不可或缺的关键性环节。且该实施结果的变异系数为 1.1%,小于 2%,表明本发明方法针对由氢氧化铝佐剂制备的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品进行抗原含量检测的重复性较高。

[0112] 实施例 6 测定本发明方法的中间精密度

[0113] 取六支含 1.5EU/ml 抗原的氢氧化铝佐剂吸附型乙脑灭活疫苗样品,由同一操作人员按本发明方法分别在 2013 年 3 月 28 日,4 月 22 日、23 日、24 日、25 日,2013 年 5 月 7 日六个不同时间进行检测。除样品处理及样品稀释过程与实施例 2 相同外,其他所有操作步骤均见实施例 1,在此不再赘述。实施结果见表 9。

[0114] 实施例 7 测定本发明方法的中间精密度

[0115] 由四个实验人员按照本发明方法对含 1.5EU/ml 抗原的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品进行检测。除样品处理及样品稀释过程与实施例 2 相同外,其他所有操作步骤均见实施例 1,在此不再赘述。实施结果见表 9。

[0116] 表 9 实施例 6-7 结果汇总

[0117]	实验日期 (月.日)	03.28	04.22	04.23	04.24	04.25	05.07
	抗原含量 (EU/ml)	1.5	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
	$X_{(\text{平均值})}=1.4$, $SD=1.55$, $CV=1.1\%$						
		实验员 A	实验员 B	实验员 C	实验员 D		
	抗原含量 (EU/ml)	1.4	1.4	1.5	1.4		
$X_{(\text{平均值})}=1.4$, $SD=1.65$, $CV=1.2\%$							

[0118] 实施例 6、实施例 7 实验结果的变异系数均小于 2%,表明该方法在不同的检测时

间,由不同操作人员进行检测,其结果都具有一定的稳定性,表明本发明方法的中间精密度高。

[0119] 实施例 8 测定本发明方法的耐用性

[0120] 取 5 支含 1.5EU/ml 抗原的吸附型乙型脑炎灭活疫苗样品,由同一操作人员按照本发明方法进行实验,除样品处理与样品稀释步骤具体如下外,其他所有操作步骤均见实施例 1,在此不再赘述。

[0121] 样品处理:分别取 1ml 铝佐剂吸附型乙脑灭活疫苗样品于试管中,各加入 0.1ml (2-1) 样品处理液,分别置于 25℃、20℃ 孵育 1 小时,30℃ 孵育 0.5 小时、1 小时、1.5 小时,每个条件下做三个平行管。

[0122] 样品稀释:用样品稀释液分别将上述处理后的供试品稀释至抗原含量在 0.0031-0.05EU/ml 范围内,检测抗原含量。结果详见表 10。

[0123] 表 10 实施例 8 实验结果汇总

[0124]

处理条件	20℃ 孵育 1h	30℃ 孵育 1h	25℃ 孵育 0.5h	25℃ 孵育 1h	25℃ 孵育 1.5h
平均抗原含量 (EU/ml)	1.3	1.4	1.3	1.4	1.4
25±5℃ 孵育 1h: $X_{(平均值)}=1.3$, $SD=0.94$, $RSD=0.7\%$					
25℃ 孵育 1±0.5h: $X_{(平均值)}=1.4$, $SD=0.92$, $RSD=0.7\%$					

[0125] 实施例 8 表明了该方法在水浴条件下,在 25℃ 上下波动 5℃ 以及孵育时间在 1h 上下波动 0.5h,其变异系数均小于 1%,说明该方法的耐用性好。

[0126] 以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明,本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形,只要不脱离本发明的精神,均应属于本发明所附权利要求的范围。

专利名称(译)	一种处理液以及采用其测定铝盐吸附型疫苗中抗原含量的方法		
公开(公告)号	CN104634959A	公开(公告)日	2015-05-20
申请号	CN201310552088.3	申请日	2013-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	丽珠集团疫苗工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	丽珠集团疫苗工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	丽珠集团疫苗工程股份有限公司		
[标]发明人	罗翀 李刚 关欣 陈小芳 李云富 汪恩浩		
发明人	罗翀 李刚 关欣 陈小芳 李云富 汪恩浩		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56983		
代理人(译)	李渤 张伟		
其他公开文献	CN104634959B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于解吸附铝盐吸附型疫苗中的抗原的处理液，所述处理液为磷酸盐缓冲液或柠檬酸盐缓冲液，并包含蛋白质以及一种或多种酸和/或它们的盐。本发明还公开了一种采用该处理也检测铝盐吸附型疫苗中抗原含量的方法。本发明方法减少了乙脑疫苗中的铝佐剂对抗原含量检测的干扰，为一种能够快速、准确测定吸附型乙型脑炎灭活疫苗中抗原含量的方法。此外，本发明的方法具有耐用性强、准确度及精密度高的特点，可以为铝佐剂吸附型乙脑灭活疫苗的质量控制提供参考。

序号	疫苗样品理论抗原含量 (EU/ml)	疫苗样品测得平均抗原含量 (EU/ml)	吸附率 (%)
1	2.6	<0.0031	>99.8
2	1.3	<0.0031	>99.8
3	0.65	<0.0031	>99.5
4	0.32	<0.0031	99%
5	0.16	<0.0031	>98%
6	0.08	<0.0031	96.1%