

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2012.04.015

柯萨奇病毒 A 组 16 型抗原的 ELISA 定量检测方法建立

贾继宗 韩金乐 杨亮 李川^① 何德磊^① 张娜 陈芹芹 叶祥忠^② 李益民
(北京万泰生物药业股份有限公司,北京 102206)

中国图书分类号 R373.2⁺3 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2012)04-0351-04

[摘要] 目的:建立柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)抗原的双抗体夹心 ELISA 定量检测方法,用于 CA16 灭活疫苗的研发和生产过程的抗原定量检测。方法:以 CA16 中和单抗 T26H12 为包被抗体、NA14B9 为标酶抗体,构建定量检测 CA16 抗原的双抗体夹心 ELISA 方法,并对方法的特异性、灵敏度、精密度、准确性、线性和稳定性进行分析。结果:建立了双抗体夹心定量检测 CA16 抗原的 ELISA 方法。方法的线性相关系数 $R^2 = 0.998$,线性范围为 8~128 ng/ml,定量限度为 8 ng/ml;变异系数 $CV < 15\%$;回收率介于 87.0%~113.8%之间;37℃6 天的回收率 $> 80\%$;与 CA16 以外的其他样本没有交叉反应。结论:构建的 CA16 抗原 ELISA 定量检测方法的各项性能符合定量检测需要,可用于 CA16 疫苗的研发和生产过程的抗原活性的定量检测。

[关键词] 柯萨奇病毒 A 组 16 型;抗原;双抗体夹心 ELISA

Development of a quantitative ELISA detection method for Coxsackievirus A group 16 strain (CA16) antigen

JIA Ji-Zong, HAN Jin-Le, YANG Liang, LI Chuan, HE De-Lei, ZHANG Na, CHEN Qin-Qin, YE Xiang-Zhong, LI Yi-Min. Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Ltd., Beijing 102206, China

[Abstract] **Objective:** To develop a quantitative enzyme linked immunosorbent assay (Q-ELISA) to determine the concentration of Coxsackievirus A Group 16 Strain (CA16) antigen. This method was used to determine CA16 antigen content at each stage of CA16 vaccine developing and manufacturing process. **Methods:** A double antibody sandwich Q-ELISA was developed to determine concentration of CA16 antigen, which was based on the high-affinity neutralizing monoclonal antibodies T26H12 as capture antibodies and NA14B9 as HRP-labeled antibody. The performance of reagent were evaluated. **Results:** The Q-ELISA for CA16 antigen content was successfully developed. The reagent had good performance. The quantitation scope was 8-128 ng/ml, the coefficient correlation was 0.998, the limit of detection was 8 ng/ml, the recovery was between 87% and 113.8%. The stability was up to 80% after reagent was heated for 6 days at 37°C. The variation coefficient was lower than 15% and thereagent was no reaction with other sample except CA16 antigen. **Conclusion:** The Q-ELISA for CA16 antigen was developed with good specificity, accuracy, precision and stability. The method can be used to determine CA16 antigen content during development and production of CA16 vaccine.

[Key words] Coxsackievirus A Group 16 Strain (CA16); Antigen; Double antibody sandwich ELISA

柯萨奇病毒 A 组 16 型(Coxsackievirus A Group 16 Strain, CA16)是手足口病(Hand, Foot and Mouth Disease, HFMD)的主要病原之一,与肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)所致的手足口病在临床上很难区别^[1-3]。CA16 研究较少,长期以来一直认为 CA16 可能是单纯的 HFMD 表现,不过近年来研究指出 CA16 感染可能与心肌炎、难治性休克

等致死性并发症的发生有关^[4,5],个别地区还有 CA16 引起成人致死性肺炎的报道^[6],目前尚无特效药物可以用于治疗,因而,研发针对 CA16 的诊断试剂和疫苗,对 CA16 引起的 HFMD 的流行进行预测和预警,对预防 CA16 引起的 HFMD 有重要的意义^[2]。在疫苗研制过程中,病毒的抗原含量是重要的质量控制指标,开发出准确、特异的抗原含量检测试剂是监测疫苗生产和研发过程最有效方法。

本文介绍一种灵敏、准确和特异的、针对 CA16 抗原中和表位的双抗体夹心检测方法以及该方法在 CA16 抗原检测中的相关应用,为 CA16 疫苗的研制提供监测手段。

^①厦门大学生命科学院国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,厦门 361005

^②通讯作者 E-mail: yxzh_hb@163.com

作者简介:贾继宗(1983 年-),女,大专,主要从事病毒和疫苗检测方法研究, E-mail: jiajizong@you.com.cn

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒 柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16) ; 甲型肝炎病毒(HAV) 灭活液、水痘-带状疱疹病毒(VZV) 液、柯萨奇病毒 B3(CVB3) 灭活液、脊髓灰质炎病毒(PV) 灭活液、轮状病毒(RV) 灭活液和人肠道病毒 71 型(EV71) 灭活液由北京万泰药业股份有限公司保存。

1.2 抗体、抗原 CA16 中和单克隆抗体由厦门大学提供。CA16 抗原内部参考品由北京万泰药业股份有限公司制备。

1.3 主要试剂 牛血清白蛋白(BSA) 和辣根过氧化物酶(HRP) 购自 Sigma 公司; BCA 试剂购自热电公司, HRP 标记的单克隆抗体由本公司制备。

1.4 中和单克隆抗体筛选 分别用灭活的 CA16 抗原和 EV71 抗原包被酶标板, 用间接法分析单抗效价和特异性; 将滴度高、特异性好的抗 CA16 的单抗作系列稀释, 系列稀释物与 1 000 TCID₅₀ 的 CA16 病毒液混合, 37℃ 孵育 120 分钟后, 感染 MRC-5 细胞, 100 μl/孔, 于 37℃ 培养 7 天后显微观察细胞病变, 分析单抗的中和效价; 选择中和滴度高和特异性好的抗体用于构建双抗体夹心系统。

1.5 双抗体夹心 ELISA 法的建立 将纯化后用于包被的单抗和 HRP 标记的单抗作系列稀释, 采用棋盘法确定两者最佳的工作浓度。采用正交试验和并行试验确定封闭液、样品稀释液和酶标抗体稀释液, 建立双抗体夹心检测方法^[7]。

1.6 性能分析 根据《中华人民共和国药典》二部(2000 版) 对检测方法验证的要求, 对本试剂的线性、准确性、精密度、特异性和稳定性等性能进行分析^[8]。

1.6.1 准确性试验 将 CA16 抗原内部参考品用样品稀释液稀释为高值(80 ng/ml) 、中值(40 ng/ml) 、低值(5 ng/ml) 共 3 个浓度的 CA16 抗原溶液, 用本方法进行测定, 每个浓度样品作 3 份重复检测, 计算稀释标准品的测定值和理论标示值的比值, 即回收率, 分析本方法的准确性。

1.6.2 精密性试验 对高值(80 ng/ml) 、中值(40 ng/ml) 、低值(5 ng/ml) 3 个浓度的 CA16 抗原稀释标准品, 在 3 人次独立试验中, 对每一稀释度作 3 份重复测定。比较测定值和真实值, 计算均值、标准偏差, 分析试剂精密性。

1.6.3 直线性和定量限度试验 用样品稀释液将 CA16 抗原参比品稀释到 128、64、32、16、8、4 和 0 ng/ml。用本方法进行测定, 以抗原浓度对 OD

值作直线回归分析, 分析最佳线性范围, 确定定量限度。

1.6.4 稳定性试验 通过 37℃ 加速试验预测试剂的稳定性。试剂于 37℃ 放置 3 天和 6 天后, 进行抗原吸光值检测, 以 4℃ 放置的试剂作对照, 计算 37℃ 与 4℃ 试剂检测样品的 OD 值之比, 分析试剂的稳定性。

1.6.5 特异性试验 用本方法分别检测灭活的 CA16 收获液、灭活的 HAV 收获液、灭活的 CVB3 培养液、灭活的 PV 收获液、灭活的 RV 收获液、VZV 收获液、小牛血清、小鼠血清、人血白蛋白、MRC-5 细胞、VERO 细胞和 MEM 培养基。分析本试剂的特异性。

1.7 应用

1.7.1 抗原量检测 用本方法检测 3 批 CA16 灭活疫苗在制备过程中的抗原浓度, 用 BCA 法检测蛋白浓度; 监控样品制备过程中有效抗原含量。

1.7.2 TCID₅₀ 分析 CA16 病毒液经终端稀释后感染长成单层的 MRC-5 细胞, 每个稀释度重复接种 6 孔, 于 37℃ 培养 7 天。然后, 用显微镜观察并记录每孔有无细胞病变, 再通过 Reed-Muench 方法计算 CA16 病毒滴度。同时, 取细胞培养上清原倍上样, 100 μl/孔, 按试剂说明操作、定性检测, 根据 OD 值(Cutoff 值为 0. 105) 判定每孔 CA16 抗原的阴阳性, 再通过 Reed-Muench 方法计算 CA16 病毒滴度, 并对两种方法检测的病毒滴度作相关性分析。

2 结果

2.1 单克隆抗体筛选 根据抗体效价、细胞中和水平和配对后检测 CA16 抗原灵敏度 3 项指标, 筛选到两株用于试剂构建的单抗, T26H12 单抗用于包被; NA14B9 单抗用于 HRP 标记的组合最优。两株单抗的特征见表 1。

2.2 双抗体夹心方法建立 通过优化 ELISA 试验条件, 确定 CA16 抗原的双抗体夹心 ELISA 定量检测系统: 单抗 T26H12 用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH9. 6) 稀释到 2. 0 μg/ml, 包被 96 孔板, 100 μl/

表 1 两株单抗的特性

Tab. 1 The characteristics of two CA16 monoclonal antibodies

McAb name	Purpose	Neutralizing antibody titer	Antibody titer	Epitope	McAb type
NA14B9	HRP sign	6 400	1: 100K	Linear	IgG ^{2a}
T26H12	Peridium	100	1: 1 000K	Linear	IgG ¹

孔 4℃ 过夜,弃液,封闭(封闭液:1% BSA 和 5% 蔗糖) 200 μl/孔,37℃ 温育 2 小时;加样,100 μl/孔,37℃ 温育 1 小时;洗板 5 次,加 NA14B9-HRP,100 μl/孔,37℃ 温育 45 分钟,洗板 5 次,加 TMB 显色液,100 μl/孔,37℃ 温育 15 分钟,加 2 mol/L H₂SO₄ 终止 A_{450/630} 双波长读 A 值。绘制标准曲线,拟定标准方程,代入样品的 A 值,计算待检品抗原活性值。

2.3 性能分析

2.3.1 准确性和精密性 待检品的回收率均值介于 87.0% ~ 113.8% 之间;同一试验重复检测和不同试验者检测的变异系数 < 15%。准确性和精密度分析结果如表 2 所示。

表 2 准确性及精密性验证结果

Tab.2 Verification of accuracy and precision of Q-ELISA

CA16 antigenic concentration (ng/ml)	Average (ng/ml)	Recovery ratio(%)	CV(%)
80	82.5 ± 4.2	94.4-105.1	3.1
40	41.4 ± 2.4	94.1-106.5	3.9
5	5.3 ± 0.6	87.0-113.8	8.8

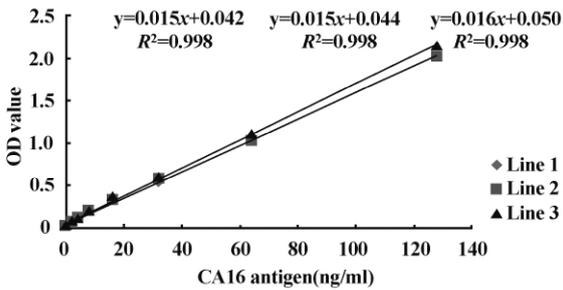


图 1 CA16 抗原内部参比品的标准曲线

Fig.1 Standard curve of internal reference of CA16 antigen

2.3.2 线性和定量限度 CA16 抗原内部参比品用样品稀释液稀释为 128、64、32、16、8、4、2、0 ng/ml 后,用本方法测定吸光值,以浓度和吸光值作回归分析得到,线性范围为 8 ~ 128 ng/ml、R² = 0.998,定量限度为 8 ng/ml,见图 1。

2.3.3 稳定性试验 通过 37℃ 加速破坏试验预测试剂的稳定性。在 37℃ 放置 3 天和 6 天的试剂,测定吸光值,试剂存放稳定性 > 80% 见表 3。

2.3.4 特异性试验 用本方法测定特异性试验样品,检品的 A_{450/630} 均小于 8 ng/ml,小于 Cutoff 值 (0.105),即无交叉反应。

2.4 应用

2.4.1 抗原量检测 检测结果显示,随纯化不断推进,疫苗病毒抗原的比活呈上升趋势,见表 4。

2.4.2 TCID₅₀ 分析 在用显微镜观察法和 ELISA 法检测的 50 批 TCID₅₀ 试验中,两法检测 46 次的 TCID₅₀ 完全一致,另外,1 次镜检的略高,3 次 ELISA 法的略高, R² 值为 0.983。结果见图 2。

表 3 试剂的热稳定性性能分析结果

Tab.3 Verification of thermostability of Q-ELISA

37℃ (d)	Recovery of different concentration(%)			
	(ng/ml) 128	80	40	5
3	88.0	83.0	86.8	89.3
6	85.5	86.9	87.5	90.5

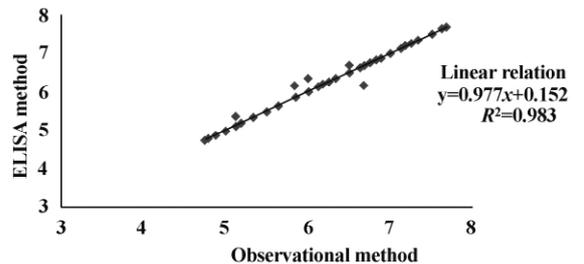


图 2 两种方法检测 CA16 病毒滴度的相关性分析

Fig.2 Correlation analysis of two methods for the detection of virus titer

表 4 CA16 抗原的 Q-ELISA 检测 3 批疫苗原液纯化过程样品结果

Tab.4 Determination results of CA16 antigen in 3 batches of vaccine bulk during purification

Purification step	CA-20110201 batch			CA-20110301 batch			CA-20110302 batch		
	Protein concentration (μg/ml)	Antigenic concentration (μg/ml)	Antigen/protein	Protein concentration (μg/ml)	Antigenic concentration (μg/ml)	Antigen/protein	Protein concentration (μg/ml)	Antigenic concentration (μg/ml)	Antigen/protein
1	3156	103	0.03	3068	97	0.03	3561	132	0.04
2	1520	411	0.27	1682	514	0.31	1436	498	0.35
3	870	1026	1.18	1034	1951	1.89	915	1347	1.47
4	115	315	2.74	138	402	2.91	102	364	3.57
Stoste	18	295	16.39	21	356	16.95	20	307	15.35

3 讨论

CA16 病毒属于小 RNA 病毒科,肠道病毒属,是人类多种疾病的病原体,可引起呼吸道感染、结膜炎、发热性皮疹、手足口病、疱疹性咽峡炎、心肌炎及无菌性脑膜炎、脑炎和急性迟缓性麻痹等疾病^[4,9,10]。因此对 CA16 病毒的诊断及预防是非常必要的。

CA16 灭活疫苗的研制需要建立抗原含量检测方法,用于生产工艺开发过程中病毒培养条件优化、病毒纯化方法建立、灭活条件的选择、吸附率及制品稳定性等对抗原含量的检测,从而确定生产工艺。目前多数研究者倾向 ELISA 法进行疫苗抗原含量检测,此方法快速灵敏、稳定性好、具有可重复性、较容易标准化,适合于疫苗生产过程及成品的检测。

本文介绍的 CA16 抗原定量检测方法,是以两株亲和力高、中和性好的、针对 CA16 抗原的特异单抗为原料构建的,试剂性能稳定,不随抗体批次不同而变化,这明显优于多抗系统;本试剂选用的单抗是针对两个不同表位的,二者之间不存在竞争关系,不干扰检测灵敏度;本试剂直线性好、灵敏度高,为吸附工艺研究和产品吸附完全性分析提供了保障。同时,本试剂可以用作 CA16 抗原的定量检测,有效地监测 CA16 型疫苗研发和生产过程的抗原含量。

CA16 滴度检测有原位杂交法、细胞病变的显微观察法等。原位杂交检测法要求病变细胞贴附良好,CA16 感染 MRC-5 细胞在细胞病变后很快出现脱落,故原位杂交检测时限较短;常规微孔细胞病变的显微观察法,不仅观察时间较长,而且判断不能排除主观性,会因细胞病变不明显或细胞状态欠佳等因素,导致错判;本法检测基于培养液中的病毒增殖产生的抗原,故在细胞病变达到峰值后较长时间都可以检测,检测时限长,同时,本法灵敏度高,检测到病毒抗原比显微观察到细胞病变至少提前 2 天,缩短了检测周期,也克服了检测结果判断的主观性。

两法检测同一株病毒或不同株病毒共 50 批样品的病毒滴度的相关系数为 0.983,表明两种检测方法之间没有显著差别。不完全符合的样品表现为 ELISA 法检测结果略高或显微镜观察法结果略高,可能源于个别孔细胞病变的人为观察误差,也可能是病毒感染引发的可见细胞病变时间滞后于本试剂可检测出抗原时间所致。

构建的 CA16 抗原定量检测试剂不仅可用于疫苗生产过程中抗原含量的检测,而且,有可能开发用于临床病毒感染检测。

4 参考文献

- 1 廖英,谢洪恩.手足口病病原学检测及临床特点相关性研究[J].吉林医学,2010;31(24):4075-4076.
- 2 许文波,杨朝辉,柯萨奇病毒 A 组 16 型[J].中国疫苗和免疫,2009;15(1):72-77.
- 3 王娟,罗珍.2007-2008 年北京地区 CA16VP1 区系统进行分析[J].第三军医大学学报,2009;31(23):2342-2346.
- 4 Chang L Y, Huang L M, Gau S S *et al.* Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection [J]. N Engl J Med, 2007; 356: 1226-1234.
- 5 Wang C Y, Li-Lu F, Wu M H *et al.* Comparison of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998 [J]. Pediatr Infect Dis J, 1999; 8(12): 1092-1096.
- 6 Legay F, Leveque N, Gacouin A *et al.* Fatal coxsackievirus A-16 pneumonitis in adult [J]. Emerg Infect Dis, 2007; 13(7): 1084-1086.
- 7 张立怀,张国中,霍蕾.检测禽流感病毒抗原的双抗体夹心 ELISA 方法的建立[J].中国医药生物技术,2009;4(1):62-64.
- 8 国家药典编辑委员会.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2000:172-173.
- 9 Steven O, Silvia P, Kaija M *et al.* Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A [J]. General Virology, 2004; 85(6): 1597-1607.
- 10 金奇.医学分子病毒学[M].北京:北京科学出版社,2001:579-602.

[收稿 2011-12-07]

(编辑 倪鹏)