

狂犬病病毒糖蛋白抗原含量双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立及验证

郭笑语¹, 潘东², 陈晓旭², 韩丹丹³, 高一峰², 沈艳杰², 韩尚成²,
赵天罡², 丁楠², 张洁琼⁴, 袁若森², 姜春来¹

1. 吉林大学生命科学学院, 吉林 长春 130012; 2. 长春百克生物科技股份公司, 吉林 长春 130012;
3. 长春汇力生物技术有限公司, 吉林 长春 130033; 4. 吉林迈丰生物药业有限公司, 吉林 长春 130031

摘要: **目的** 建立可快速检测狂犬病病毒(rabies virus, RabV)糖蛋白抗原含量的双抗体夹心 ELISA 方法, 并进行验证及初步应用。**方法** 用抗 RabV 糖蛋白基因工程抗体建立双抗体夹心 ELISA 法, 检测 RabV 糖蛋白抗原含量。对建立的方法进行特异性、线性、准确性、板内与板间精密性、灵敏度验证, 对不同厂家(毒株分别为 aG、PV、CTN、PM)生产的狂犬病疫苗与不同工艺阶段的狂犬病疫苗样品进行适用性检测。**结果** 捕获抗体与酶标抗体最佳稀释度分别为 1 : 2 000 和 1 : 4 000, 最佳封闭剂为 1. 5% BSA。该方法与其他人用疫苗和辅料成分无交叉反应; 线性范围在 0. 003 2 ~ 0. 103 1 IU/mL 之间, $R^2 > 0. 98$; 准确性验证的回收率在 97. 0% ~ 110. 1% 之间; 精密性验证的板内变异系数 < 8. 6%, 板间变异系数 < 13. 9%; 检测不同厂家的狂犬病疫苗和不同工艺阶段的疫苗样品呈良好的剂量依赖效应。**结论** 建立了适用于人用狂犬病疫苗糖蛋白抗原含量检测的双抗体夹心 ELISA 方法, 符合定量检测的需求, 可用于 aG、PV、CTN、PM 等不同毒株生产的狂犬病疫苗检测; 也可用于病毒收获液、浓缩液、灭活液及原液等不同工艺阶段样品检测。

关键词: 狂犬病病毒; 糖蛋白; 抗原; 定量检测; 酶联免疫吸附测定

中图分类号: R373. 9 R392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2020)04-0434-05

DOI: 10.13200/j.cnki.cjb.003038

Development and validation of double antibody sandwich ELISA for determination of rabies virus glycoprotein antigen content

GUO Xiao-yu^{*}, PAN Dong, CHEN Xiao-xu, HAN Dan-dan, GAO Yi-feng, SHEN Yan-jie, HAN Shang-cheng,
ZHAO Tian-gang, DING Nan, ZHANG Jie-qiong, YUAN Ruo-sen, JIANG Chun-lai

^{*}College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, Jilin Province, China

Corresponding author: YUAN Ruo-sen, E-mail: yuanruosen2005@163.com;

JIANG Chun-lai, E-mail: jiangcl@jlu.edu.cn

Abstract: **Objective** To develop, validate and preliminarily apply a double antibody sandwich ELISA for rapid determination of rabies virus (RabV) glycoprotein antigen content. **Methods** The double antibody sandwich ELISA was developed with recombinant antibodies against RabV glycoprotein and used for the determination of RabV glycoprotein content. The developed method was validated for specificity, linearity, accuracy, inplate and interplate precisions and sensitivity. The rabies vaccines produced by different manufacturers from different virus strains (aG, PV, CTN and PM) as well as the vaccine samples at different steps of production procedure were determined by the method to evaluate the suitability. **Results** The optimal dilutions of capture antibody was 1 : 2 000 while that of enzyme-labeled antibody was 1 : 4 000, and the optimal blocking agent was 1. 5% BSA. There were no cross reactions with other vaccines or subsidiary materials. The linear range of the developed method was 0. 003 2 ~ 0. 103 1 IU/mL, with a R^2 value of more than 0. 98. The recovery rate in validation for accuracy was 97. 0% ~ 110. 1%. The CVs in validation for inplate and interpolate precisions were less than 8. 6% and less than 13. 9% respectively. Dose-dependent effects were observed by the developed method in determination of rabies vaccines from different manufacturers and samples at different steps of production procedure. **Conclusion** A double antibody sandwich ELISA suitable for RabV glycoprotein antigen content was developed, which met the requirements for quantitative determination, and might be used for the rabies vaccines

prepared from different virus strains such as aG, PV, CTN and PM as well as the samples at different steps of production procedure, such as virus harvest, concentrate, inactivation liquid and bulk.

Key words: Rabies virus; Glycoprotein; Antigen; Quantitative determination; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

狂犬病是由狂犬病病毒 (rabies virus, RabV) 引发的人兽共患传染病,人和所有温血动物均对 RabV 易感,一旦发病几乎 100% 死亡。日前,疫苗是有效预防狂犬病的主要手段之一,人用狂犬病疫苗的有效成分是灭活 RabV。

人用狂犬病疫苗的有效抗原主要有核蛋白和糖蛋白,糖蛋白刺突是唯一位于表面的保护性抗原,也是唯一能诱导宿主产生中和抗体的蛋白。能否产生中和抗体,关键在于是否保持糖蛋白三聚体的三维空间构象。糖蛋白也可有效刺激淋巴细胞增生,是诱导细胞免疫和体液免疫的主要抗原,其也可引起抗感染免疫功能^[1-5]。

保证人用狂犬病疫苗的安全、质量至关重要,美国国立卫生研究院的 NIH 法是目前狂犬病疫苗效力检测的最权威方法^[6]。但该方法实验周期长(28 d),需要实验动物、操作复杂,不适合病毒收获、浓缩、灭活、纯化工艺步骤的监测。基于 3R 原则和实验动物伦理需求,疫苗效力的鉴定迫切需要改进并与国际接轨。因此,建立快速、准确、无实验动物的狂犬病疫苗效力检测替代方法势在必行。本文建立了可快速检测 RabV 糖蛋白抗原含量的双抗体夹心 ELISA 方法,并进行验证及初步应用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 疫苗、病毒及标准品 狂犬病疫苗效力国家标准品(6.6 IU/mL)由中国食品药品检定研究院提供;狂犬病疫苗(包括 aG、PV、CTN、PM 不同生产毒株)为国内不同生产企业疫苗产品;水痘减毒疫苗、人肠道病毒 71 类病毒颗粒(EV71 VLPs)、单价流感病毒灭活原液由长春百克药物研究院提供。

1.2 主要试剂 抗狂犬病病毒糖蛋白的基因工程抗体 Rabies-mAb-001 与 Rabies-mAb-002 为长春百克生物科技股份有限公司提供;人血白蛋白和牛血清白蛋白购自北京希凯创新科技有限公司;脱脂奶粉购自内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司;海藻糖、甘露糖、蔗糖、右旋糖酐-40、牛血清白蛋白(BSA)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.3 方法的建立

1.3.1 捕获抗体与酶标抗体工作浓度的选择 采用棋盘滴定法。按 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:

8 000 纵向稀释包被捕获抗体(Rabies-mAb-001),固定 50 倍稀释标准品,按 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000 横向稀释酶标抗体(HRP 标记的 Rabies-mAb-002)。以阳性值(P)/阴性值(N)最大值的稀释倍数作为捕获抗体与酶标抗体的最佳工作浓度。

1.3.2 封闭剂的选择 分别以 5% 脱脂奶粉、10% 胎牛血清、3% 和 1.5% BSA 作为封闭剂,以 P/N 值最大作为最佳封闭剂。

1.4 方法的验证

1.4.1 特异性 用建立的方法检测狂犬病疫苗、水痘减毒疫苗、EV71 VLPs、单价流感病毒灭活原液、海藻糖、甘露醇、牛血清、人血白蛋白、右旋糖酐-40、蔗糖,验证方法的特异性。

1.4.2 线性 将狂犬病疫苗效力国家标准品(6.6 IU/mL)进行 2 倍系列稀释,最高稀释至 2 048 倍,将抗原稀释倍数与 A_{450} 值分别取对数值,进行线性回归,建立回归方程,并计算相关系数 R^2 。

1.4.3 准确性 取 aG 株狂犬病疫苗各 100 μ L 置于 3 个 EP 管内,分别加入相同体积的 0.412 5、0.206 3、0.103 1 IU/mL 的狂犬病疫苗效力国家标准品,使标准品浓度分别为 0.206 3、0.103 1、0.051 6 IU/mL,用建立的方法重复检测 3 次,按下式计算加标回收率,验证方法的准确性。

加标回收率(%) = (加标样品的结果 - 未加标样品的结果) / 加入标准物质的理论值 \times 100%

1.4.4 板内、板间精密性 分别在 3 块板上用建立的方法检测狂犬病疫苗效力国家标准品高(512 倍稀释)、中(128 倍稀释)、低(32 倍稀释)稀释度,每块板重复检测 3 次,计算平均数(Mean)、标准差(SD)及板内、板间变异系数(CV),验证方法的精密性。

1.4.5 灵敏度 将狂犬病疫苗效力国家标准品进行 2 倍系列稀释至 4 096 倍,用建立的方法进行检测,以阴性对照孔(含 0.5% BSA 的 PBS) A_{450} 的平均值 \times 2.1 作为 Cut-off 值,阴性对照孔 A_{450} 平均值的 2.1 倍判为阳性。判为阳性的最大稀释度为检测下限。

1.5 方法的初步应用

1.5.1 不同生产毒株狂犬病的检测 取国内不同企业生产的狂犬病疫苗各 1 批(生产毒株分别为 aG、PV、CTN、PM),2 倍系列稀释后,分别各取 100 μ L,

用建立的方法检测糖蛋白抗原含量。

1.5.2 不同疫苗工艺阶段样品的检测 取狂犬病疫苗(PM 株)的单收液、浓缩液、灭活液、原液进行 2 倍系列稀释后,各取 100 μL,用建立的方法检测糖蛋白抗原含量。

2 结果

2.1 方法的优化

2.1.1 捕获抗体与酶标抗体的最佳工作浓度 经棋盘滴定法确定捕获抗体 1 : 2 000 与酶标抗体 1 : 4 000 稀释时 P/N 值最大,见表 1。确定捕获抗体 Rabies-mAb-001 的最佳工作浓度为 1 : 2 000;HRP 标记的 Rabies-mAb-002 抗体最佳工作浓度为 1 : 4 000。

表 1 抗体的最佳工作浓度的选择(A_{450})

Tab 1. Optimization of working concentration of antibody (A_{450})

酶标抗体	捕获抗体		
	1 : 1 000	1 : 2 000	1 : 4 000
1 : 2 000(P)	1.572	1.023	0.613
1 : 2 000(N)	0.197	0.175	0.117
1 : 4 000(P)	1.345	0.965	0.459
1 : 4 000(N)	0.186	0.116	0.104
1 : 8 000(P)	1.073	0.643	0.365
1 : 8 000(N)	0.185	0.112	0.106

2.1.2 最佳封闭剂 检测结果表明,以 1.5% BSA 作为封闭液时,P/N 值最大,见表 2。因此选择 1.5% BSA 为最佳封闭剂。

表 2 封闭剂的选择

Tab 2. Optimizatoin of blocking buffer

封闭液	P(A_{450})	N(A_{450})	P/N
5%脱脂奶粉	0.812	0.036	22.56
10%胎牛血清	0.723	0.051	14.18
3% BSA	0.686	0.035	19.60
1.5% BSA	0.751	0.018	41.72

2.2 方法的验证

2.2.1 特异性 该方法的检测结果与狂犬病疫苗稀释度呈剂量依赖性,对其他人用疫苗和辅料成分无交叉反应,见图 1。表明该方法特异性良好。

2.2.2 线性 回归方程为 $y = 1.2198x + 2.4605$, $R^2 = 0.9869$ 。抗原稀释倍数的对数与 A_{450} 值的对数呈良好的线性关系,线性范围在 0.001 6 ~ 0.206 3 IU/mL 之间,见图 2。

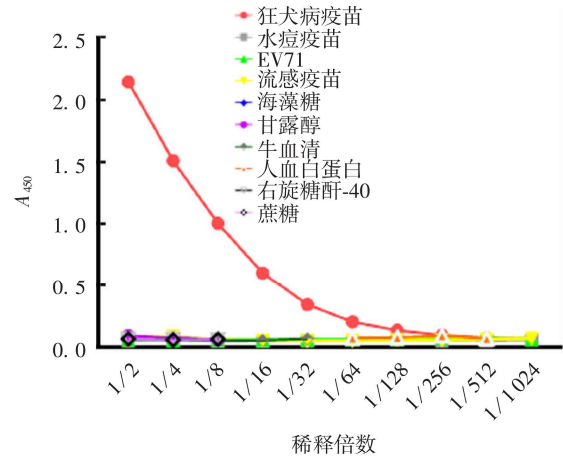


图 1 方法的特异性验证结果

Fig 1. Validation for specificity of developed method

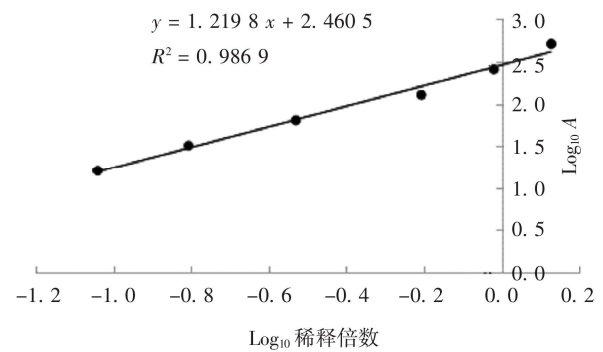


图 2 线性回归验证

Fig 2. Validation for linearity of developed method

2.2.3 准确性 检测结果显示,3 种不同稀释度的标准品与样品的加样回收率在 97.0% ~ 110.1% 之间,见表 3。

表 3 准确性验证结果

Tab 3. Validation for accuracy of developed method

标准品终浓度(IU/mL)	回收率(%)		
	1 次	2 次	3 次
0.206 3	110.1	118.1	98.1
0.103 1	109.9	107.2	97.0
0.051 6	101.0	107.8	101.2

2.2.4 板内与板间精密性 9 次检测结果的板内 CV 为 5.3% ~ 8.6%,板间 CV 为 11.4% ~ 13.9%,见表 4。

2.2.5 灵敏度 狂犬病疫苗效力国家标准品稀释 4 096 倍时,糖蛋白含量为 0.001 6 IU/mL, A_{450} 值为 0.047,大于 Cut-off 值,结果呈阳性,见表 5。该方法的灵敏度为 0.001 6 IU/mL,检测定量下限暂定为 0.003 2 IU/mL。

表 4 板内与板间精密性验证结果

Tab 4. Validation for inplate and interplate precisions

试验次数	标准品 稀释度	板次	检测结果(IU/mL)	
			板内	板间
1	高	1	6.96	7.00
2	中	1	6.18	7.25
3	低	1	6.29	7.63
4	高	2	6.71	7.72
5	中	2	6.08	7.32
6	低	2	7.22	8.02
7	高	3	5.65	5.87
8	中	3	5.99	5.76
9	低	3	6.58	6.58
Mean ± SD(n = 3)			6.51 ± 0.41	7.02 ± 0.79
CV(%)			5.3 ~ 8.6	11.4 ~ 13.9

表 5 灵敏度验证结果

Tab 5. Validation for sensitivity of developed method

稀释倍数	糖蛋白含量(IU/mL)	A ₄₅₀
16	0.412 5	2.660
32	0.206 3	2.080
64	0.103 1	1.452
128	0.051 6	0.915
256	0.025 8	0.495
512	0.012 9	0.288
1 024	0.006 4	0.137
2 048	0.003 2	0.075
4 096	0.001 6	0.047
阴性	0	0.022

2.3 方法的初步应用

2.3.1 不同生产毒株狂犬病疫苗的检测 建立的方法检测不同生产毒株狂犬病疫苗糖蛋白抗原含量的曲线趋势基本一致, A₄₅₀ 值与疫苗稀释度呈良好的剂量依赖效应, 见图 3。

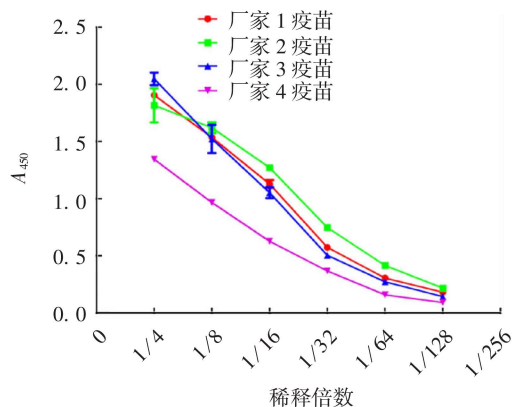


图 3 建立的方法检测不同厂家狂犬病疫苗的结果
Fig 3. Determination results of rabies vaccines from different manufacturers by developed method

2.3.2 不同疫苗工艺阶段样品的检测 建立的方法可对狂犬疫苗各工艺阶段样品进行检测, 见图 4。

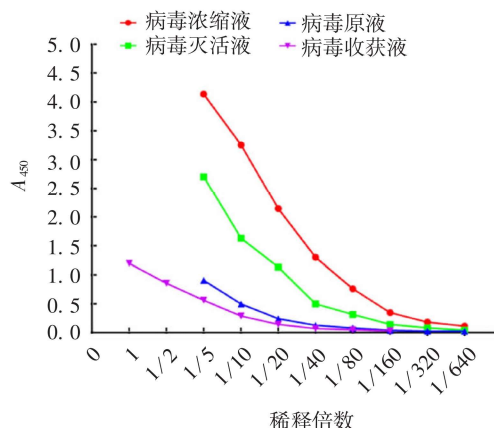


图 4 建立的方法检测狂犬病疫苗不同工艺阶段样品结果
Fig 4. Determination results of samples at different steps of production procedures of rabies vaccine by developed method

3 讨论

双抗体夹心 ELISA 是一种快速、准确、高效的定量检测方法, 很多研究者^[7-10]开发了体外检测 RabV 抗原含量替代 NIH 法。采用多克隆抗体易受可溶糖蛋白的干扰, 会过高估计疫苗的抗原性^[11]; 采用核蛋白单抗的方法无法与中和抗体的产生能力相关联, 从而失去与疫苗效力的相关性。

本研究建立的定量检测方法具有良好的特异性、线性、准确性、精密性和灵敏度, 与 RabV 糖蛋白抗原呈现良好的剂量依赖效应, 与水痘疫苗、EV71 VLPs、流感疫苗以及各种小分子糖类均无明显反应, 该方法不会对狂犬病疫苗成品与半成品的保护剂产生非特异性反应。狂犬病疫苗效力国家标准品经 2 倍系列稀释, 该方法在 0.003 2 ~ 0.103 1 IU/mL 范围内的线性 R² > 0.98, 呈良好的线性。该检测方法的灵敏度可达 0.001 6 IU/mL, 定量下限设在 0.0032 IU/mL, 与中国食品药品检定研究院的曹守春等^[12]建立的狂犬病疫苗中糖蛋白抗原检测方法结果基本一致。该方法检测不同厂家生产的狂犬病疫苗(aG、PV、CTN、PM 毒株)曲线趋势基本一致, 检测值与疫苗稀释度呈良好的剂量依赖效应, 表明该方法具有能检测不同毒株生产的狂犬病疫苗的适应性。该方法能检测 RabV 收获液、浓缩液、灭活液及原液, 检测值与稀释度呈良好的剂量依赖效应, 表明也适合于狂犬病疫苗不同工艺阶段样品的检测。

综上所述, 本研究建立的方法为人用狂犬病疫苗生产质控及替代效价测定方法提供了参考。

(下转第 444 页)

- [4] MASON P W, GRUBMAN J, BAXT B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV [J]. *Virus Res*, 2003, 91 (1): 9-32.
- [5] HAN S, GUO H, SUN S, *et al.* Three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus and its biological functions [J]. *Arch Virol*, 2015, 160 (1): 1-16.
- [6] SUN F, DONG Y, XUE Q, *et al.* Research progress on the molecular biology techniques in detection of foot-and-mouth disease virus [J]. *Chin Animal Husbandry & Veter Med*, 2013, 40 (6): 190-194. (in Chinese)
孙芳芳, 董英, 薛强, 等. 口蹄疫病毒分子生物学检测方法研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40 (6): 190-194.
- [7] JAMAL S M, BELSHAM G J. Foot-and-mouth disease: past, present and future [J]. *Vet Res*, 2013, 44: 116.
- [8] LIU M, XU N, LI Z, *et al.* Research progress of diagnosis on foot-and-mouth disease [J]. *Biotechnol Bull*, 2010, 2010 (5): 70-73. (in Chinese)
刘明, 徐娜, 李志勇, 等. 口蹄疫诊断技术的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2010, 2010 (5): 70-73.
- [9] CROWTHER J R, ABU-EL ZEIN E M E. Detection and quantification of foot and mouth disease virus by enzyme labelled immunosorbent assay techniques [J]. *J Gen Virol*, 1979, 42 (3): 597.
- [10] VAN MAANEN C. A complex-trapping-blocking (CTB) ELISA, using monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies directed against foot-and-mouth disease types A, O and C. I. Method and characteristics [J]. *Vet Microbiol*, 1990, 24 (2): 171-178.
- [11] YANG M, XU W, BITTNER H, *et al.* Generation of mAbs to foot-and-mouth disease virus serotype A and application in a competitive ELISA for serodiagnosis [J]. *Virology*, 2016, 13 (1): 195.
- [12] SHE D L, CHEN Q F, WU G L, *et al.* Application progress of ELISA in monitoring foot and mouth disease [J]. *Chin J Veter Drug*, 2014, 48 (1): 66-69. (in Chinese)
库大亮, 陈前锋, 武革利, 等. ELISA 在口蹄疫检测中的应用进展 [J]. *中国兽药杂志*, 2014, 48 (1): 66-69.
- [13] MAHAJAN S, MOHAPATRA J K, PANDEY L K, *et al.* Indirect ELISA using recombinant nonstructural protein 3D to detect foot and mouth disease virus infection associated antibodies [J]. *Biologicals*, 2015, 43 (1): 47-54.
- [14] MA L N, ZHANG J, CHEN H T, *et al.* An overview on ELISA techniques for FMD [J]. *Virology*, 2011, 8: 419.
- [15] DING Y, CHEN H, ZHANG J, *et al.* An overview of control strategy and diagnostic technology for foot-and-mouth disease in China [J]. *Virology*, 2013, 10 (1): 78.
- [16] GUO H, SUN S, JIN Y, *et al.* Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle [J]. *Veter Res*, 2013, 44 (1): 48.
- [17] DOMINGO E, BARANOWSKI E, ESCARMIS C, *et al.* Foot-and-mouth disease virus [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2002, 25 (5-6): 297-308.

收稿日期: 2019-04-09 编辑: 李靓

(上接第 437 页)

参考文献

- [1] RENATO M A, SORAIA A C, CARLOS A P, *et al.* Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein [J]. *Arch Virol*, 2017, 162: 323-332.
- [2] WANG S C, SUN C G, ZHANG S F, *et al.* Glycoprotein from street rabies virus BD06 induces early and robust immune responses when expressed from a nonreplicative adenovirus recombinant [J]. *Arch Virol*, 2015, 160: 2315-2323.
- [3] JOE K, MILOSE F, BERNHARD D, *et al.* Pathogenicity and immunogenicity of recombinant rabies viruses expressing the Lagos bat virus matrix and glycoprotein: perspectives for a panlyssavirus vaccine [J]. *Trop Med Infect Dis*, 2017, 2 (37): 1-15.
- [4] ZHANG Y C, ZHOU M, LI Y Y, *et al.* Recombinant rabies virus with the glycoprotein fused with a DC-binding peptide is an efficacious rabies vaccine [J]. *Oncotarget*, 2018, 9 (1): 831-841.
- [5] PICOTTO L D, SGUAZZA G H, TIZZANO M A, *et al.* An effective and simplified DO-stat control strategy for production of rabies glycoprotein in *Pichia pastoris* [J]. *Prot Expr Purif*, 2017, 132: 124-130.
- [6] World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies. First report [R]. WHO TRS, 2004, 931: 30-33.
- [7] FOURNIER C J, POIRIER B, HAOND J, *et al.* Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method [J]. *Biologicals*, 2003, 31 (1): 9-16.
- [8] NAGARAJAN T, REDDY G S, MOHANA S B, *et al.* A simple immuno-capture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture [J]. *Biologicals*, 2006, 34 (1): 21-27.
- [9] SYLVIE M, BERTRAND P, CIAN R, *et al.* Replacement of in vivo human rabies vaccine potency testing by in vitro glycoprotein quantification using ELISA-Results of an international collaborative study [J]. *Vaccine*, 2017 (35): 966-971.
- [10] RICHARD G, MONIQUE A, BERTRAND P, *et al.* A relevant in vitro ELISA test in alternative to the in vivo NIH test for human rabies vaccine batch release [J]. *Vaccine*, 2013 (31): 6022-6029.
- [11] PERRIN P, MORGEAUX S, SUREAU P. In vitro rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immuno-capture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody [J]. *Biologicals*, 1990, 18 (4): 321-330.
- [12] CAO S C, ZHANG Q F, WANG Y P, *et al.* Establishment and applicability validation of the glycoprotein antigens detection method on rabies vaccine by ELISA [J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 1990, 18 (4): 575-578. (in Chinese)
曹守春, 张全福, 王云鹏, 等. 人用狂犬病疫苗中糖蛋白抗原检测方法的建立及适用性研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2016, 30 (6): 575-578.

收稿日期: 2019-04-26 编辑: 何巍