

中图分类号: R917; R186 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)23-0084-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.23.018



新型冠状病毒疫苗受体结合域抗原含量检测方法建立*

何欢, 李文东, 李玉立, 邵天舒, 梅婕, 李潇[△]

(北京市药品检验研究院·北京市疫苗检验中心·国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室·中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:目的 建立通用的新型冠状病毒疫苗(简称新冠疫苗)受体结合域(RBD)抗原含量检测方法。方法 以新冠病毒刺突蛋白(S蛋白)RBD的重组抗体为标准品,先将疫苗中的蛋白解吸附,采用酶联免疫吸附试验检测疫苗中的RBD蛋白含量,并验证方法的线性、定量下限、准确度、精密度和稀释可靠性,同时对部分上市新冠疫苗进行检测。结果 3次试验标准曲线的决定系数(R^2)分别为0.996 6, 0.995 8, 0.997 5($n=6$);定量下限为7.81 pg/mL;批内和批间准确度均值为质控标示值的91.98%~110.16%(精密度试验)和93.68%~101.01%(稀释可靠性试验),X、Y、Z公司的加样回收率分别为86.81%, 82.97%, 105.41%,测定值的变异系数均小于10%。X、Y、Z公司新冠疫苗中RBD蛋白的平均含量分别为302.96 pg/mL、1 010.80 pg/mL、42.92 μ g/mL。结论 该方法的方法学验证指标均符合2020年版《中国药典(四部)》通则9012指导原则相关要求,可用于多种技术路线新冠疫苗的RBD抗原含量检测。

关键词:新型冠状病毒疫苗;受体结合域蛋白;抗原含量检测;酶联免疫吸附试验;棘突蛋白

Establishment of Detection Method for Receptor Binding Domain Antigen Content of Coronavirus Disease 2019 Vaccine

HE Huan, LI Wendong, LI Yuli, SHAO Tianshu, MEI Jie, LI Xiao

(Beijing Institute for Drug Control · Beijing Center for Vaccine Control · NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs · Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing, China 102206)

Abstract: Objective To establish a universal detection method for receptor binding domain (RBD) antigen content of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) vaccine. **Methods** With the recombinant antibody of COVID-19 spike protein (S protein) RBD as the standard, the protein in the vaccine was first resolved and attached, and the content of RBD protein in the vaccine was detected by the enzyme-linked immunosorbent assay, and the linearity, lower limit of quantification, accuracy, precision and dilution reliability of the method were verified. Meanwhile, some of the COVID-19 vaccines on the market were tested. **Results** The coefficient of determination (R^2) values of the standard curves for the three tests were 0.996 6, 0.995 8, and 0.997 5 ($n=6$), respectively. The lower limit of quantification was 7.81 pg/mL. The mean values of in-batch and inter-batch accuracy were in the range of 91.98% - 110.16% (precision test) and 93.68% - 101.01% (dilution reliability test) of the quality control value. The recovery rates of COVID-19 vaccines from companies X, Y, and Z were 86.81%, 82.97%, and 105.41%, respectively, and the coefficient of variation of the measured values was less than 10%. The RBD protein content in COVID-19 vaccine of companies X, Y and Z were 302.96 pg/mL, 1 010.80 pg/mL, and 42.92 μ g/mL, respectively. **Conclusion** The methodological validation indicators of this method can meet the relevant requirements of the guiding principle general rule 9012 of the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition, Volume IV), which can be used to detect the RBD antigen content of COVID-19 vaccine developed by various technical routes.

Key words: COVID-19 vaccines; receptor binding domain protein; antigen content detection; enzyme-linked immunosorbent assay; spinous protein

高致病性人类冠状病毒严重急性呼吸综合征(SARS)-CoV、中东呼吸综合征(MERS)-CoV、新型冠状病毒(SARS-CoV-2)严重威胁人类健康,分别引起SARS、MERS和新型冠状病毒肺炎(COVID-19)^[1-2]。SARS-CoV于2003年全球大流行,病死率约为9.56%(774/8 098)^[3]。MERS-CoV于2012年在沙特阿拉伯首次报道,而后在27个国家/地区流行,病死率约为

34.40%(858/2 494)^[4]。SARS-CoV-2于2019年暴发,并在全球迅速传播^[1]。与SARS-CoV和MERS-CoV相比,SARS-CoV-2造成的感染、死亡和经济破坏更大^[2]。新型冠状病毒疫苗(简称新冠疫苗)已上市及后续研发涉及品种多、用量大,给药品监管部门带来了挑战。因此,建立通用性更强的方法、提高新冠疫苗的检验效率迫在眉睫。新型冠状病毒(简称新冠病毒)和其

*基金项目:北京市科技新星计划项目[Z211100002121007]。

第一作者:何欢,女,大学本科,药师,研究方向为药品标准与生物制品质量控制,(电子信箱)hehuan_101311@163.com。

[△]通信作者:李潇,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为生化药物及生物制品质量控制,(电子信箱)jesscy@aliyun.com。

他新出现的致病性人类冠状病毒的基因组编码4个主要的结构蛋白[棘突(S)、包膜(E)、膜(M)和核衣壳(N)]、16种非结构蛋白(nsp 1-16)和5~8种辅助蛋白。其中,S蛋白可进一步分为N-末端结构域(NTD)和受体结合域(RBD),在病毒附着中起融合、进入和传播作用^[5]。冠状病毒S蛋白的RBD必须先与宿主细胞表面的受体血管紧张素转换酶2(ACE2)结合^[6-7]。国内的新冠疫苗主要为新冠灭活疫苗和新冠重组亚单位疫苗,其中国内上市的新冠重组亚单位疫苗基于RBD蛋白为免疫靶点^[8],新冠灭活疫苗携带整个新冠病毒蛋白,故RBD蛋白是目前新冠疫苗体外检测的理想通用靶点。目前,各个新冠疫苗生产企业均用不同来源的抗体进行体外效力检测,对目的抗原也无统一的检测方法。本研究中拟通过建立通用的新冠疫苗RBD抗原的体外检测方法,检测不同技术路线新冠疫苗的目的抗原含量,为后续其他技术路线的新冠疫苗接种提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Multiskan Sky型酶标仪(美国Thermo Scientific公司)。

1.2 试剂

新冠灭活疫苗(Vero细胞,X公司和Y公司各10批);新冠重组亚单位疫苗(CHO细胞,Z公司5批);SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike RBD 酶联免疫吸附试验(ELISA)Kit试剂盒(Sino Biological,Cat号为KIT40592,批号分别为CW150C2701,CW16MA1401,CW16JU1402),配有包被上嵌合抗SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike RBD的酶标板,辣根过氧化物酶(HRP)标记的SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike RBD探测抗体(质量浓度为0.2 mg/mL),SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike RBD重组蛋白标准品(质量浓度为30 ng/mL),20倍洗涤液(每瓶25 mL),20倍稀释液(每瓶8 mL),标准品稀释液(2 mL);显色液A(Cat号为5120-0048),显色液B(Cat号为5120-0037),均购自美国Sera Care公司。

2 方法

2.1 溶液制备

洗涤液:用纯化水将20倍洗涤液稀释20倍。

终止液:向适量纯化水中加入硫酸55 mL,用纯化水稀释至1 000 mL,摇匀,即得。

稀释液:用纯化水将20倍稀释液稀释20倍。

标准品溶液:取标准品稀释液1 mL,置标准品安瓿瓶中,溶解,即得质量浓度为30 000 pg/mL的标准品贮备液;用稀释液将其定量稀释至质量浓度分别为250,125,62.5,31.25,15.62,7.81 pg/mL的系列标准品溶液。

供试品溶液:取X公司样品,将样品和X解吸附剂

按1:1混匀,室温反应1 h,每20 min振荡混匀,用稀释液稀释1倍,即得供试品溶液X。取Y公司样品,将样品和Y解吸附剂按1:1混匀,室温解离(转速为180 r/min)1 h,用稀释液稀释1倍,即得供试品溶液Y。取Z公司样品,将样品和Z解吸附剂按1:1混匀,37℃水浴30 min,取10 μL,置990 μL稀释液中,混匀;取10 μL,置990 μL稀释液中,混匀;取100 μL,置1.9 mL稀释液中,混匀,即得供试品溶液Z。

2.2 方法

检测方法:实验前,将试剂盒内所有组分和待测样本温度恢复至室温,将标准品、待测样品和空白对照(稀释液)按每孔100 μL分别加入酶标板,3个复孔,室温孵育2 h,洗涤液洗涤3次,拍干;按每孔100 μL加入工作浓度检测抗体,室温孵育1 h,洗涤液洗涤3次,拍干;按每孔50 μL分别加入显色液A和B,室温避光孵育20 min,每孔加入50 μL终止液。5 min内读取450 nm波长处的吸光度值。

计算方法:将样品和标准品吸光度值减去空白对照吸光度值,得到吸光度校正值。以标准品质量浓度(X)为横坐标、标准品吸光度校正值(Y)为纵坐标绘制标准曲线 $Y = aX + b$,决定系数(R^2) ≥ 0.99 。根据曲线计算样品质量浓度,再乘以样品的稀释倍数,即得样品RBD抗原含量。

2.3 方法学考察

线性关系考察和定量下限:取2.1项下系列标准品溶液,按2.2项下方法测定,绘制标准曲线,计算 R^2 ,并测定校正标样后回算得出的质量浓度,重复3次。结果3次试验中标准曲线的 R^2 分别为0.996 6,0.995 8,0.997 5(表1);以6个质量浓度测定校正标样后回算得出的质量浓度均在 $\pm 15\%$ 内,符合2020年版《中国药典(四部)》通则9012相关要求^[9]。该方法的定量下限为7.81 pg/mL。

表1 标准曲线拟合方程及其相关系数($n = 6$)

Tab.1 Standard curve fitting equation and its correlation coefficient ($n = 6$)

试验次数	线性方程	R^2
1	$Y = 0.005\ 6X - 0.001\ 4$	0.996 6
2	$Y = 0.005\ 3X + 0.027$	0.995 8
3	$Y = 0.005\ 8X + 0.009\ 1$	0.997 5

精密度试验:取2.1项下标准品贮备液,用稀释液定量稀释至质量浓度分别为200,150,60,7.81 pg/mL,按2.2项下方法测定校正浓度,每个质量浓度在同一酶标板上重复测定6次;或取3批(批号分别为CW150C2701,CW16MA1401,CW16JU1402)标准品,按2.1项下方法制备标准品溶液,按2.2项下方法于3 d内测定,每天每

表 2 精密度试验结果($n = 6$)
Tab. 2 Results of the precision test ($n = 6$)

理论浓度	SD(%)		CV(%)		平均测定质量浓度(pg / mL)		平均准确度(%)	
	批内准确度	批间准确度	批内准确度	批间准确度	批内准确度	批间准确度	批内准确度	批间准确度
7. 81 pg / mL	0. 44	0. 30	5. 31	3. 46	8. 28	8. 55	106. 12	109. 43
60 pg / mL	0. 03	3. 01	5. 69	6. 17	66. 09	55. 19	110. 16	91. 98
150 pg / mL	9. 15	4. 73	5. 70	3. 01	160. 39	156. 93	106. 93	104. 62
200 pg / mL	7. 09	4. 51	3. 38	2. 15	209. 56	209. 97	104. 78	104. 98

表 3 稀释可靠性试验结果($n = 6$)
Tab. 3 Results of the diluted stability test ($n = 6$)

理论浓度	SD(%)		CV(%)		平均测定质量浓度(pg / mL)		平均准确度(%)	
	批内准确度	批间准确度	批内准确度	批间准确度	批内准确度	批间准确度	批内准确度	批间准确度
150 pg / mL	7. 70	3. 10	5. 08	2. 09	151. 52	148. 17	101. 01	98. 78
75 pg / mL	3. 04	1. 57	4. 17	2. 11	72. 93	74. 57	97. 24	99. 42
37. 5 pg / mL	2. 92	3. 35	8. 15	9. 54	35. 87	35. 13	95. 24	93. 68

个质量浓度重复测定 6 次。用校正浓度除以标示浓度, 计算批内和批间准确度, 准确度(%) = 测得值 / 真实值 $\times$ 100%, 并计算测量值的相对标准差(变异系数)。结果显示, 该方法的批内和批间准确度均值均在质控标示值的 $\pm 15\%$ 内, 变异系数均在 $\pm 10\%$ 内, 均符合 2020 年版《中国药典(四部)》通则 9012 相关要求^[9], 表明仪器精密度良好。详见表 2。

稀释可靠性试验: 取 2. 1 项下标准品贮备液, 用稀释液定量稀释至质量浓度分别为 150, 75, 37. 5 pg / mL, 按 2. 2 项下方法测定, 各浓度于同 1 d 内重复测定 6 次或 3 d 内重复测定 6 次。结果显示, 该方法的批内和批间准确度均值均在质控标示值的 $\pm 15\%$ 内, 变异系数均在 $\pm 10\%$ 内, 均符合 2020 年版《中国药典(四部)》通则 9012 相关要求^[9], 表明稀释可靠性良好。详见表 3。

加样回收试验: 取 X, Y, Z 公司样品, 按 2. 1 项下方法处理, 将 X 公司样品批次 2 处理后的样品 X 和标准品溶液(质量浓度为 100 pg / mL)等体积混匀, 将 Y 公

司样品批次 1 处理后的样品 Y 和标准品溶液(质量浓度为 200 pg / mL)等体积混匀, 将 Z 公司样品批次 3 处理后的样品 Z 和标准品溶液(质量浓度为 125 pg / mL)等体积混匀, 按 2. 2 项下方法测定, 重复 3 次。结果见表 4。

表 4 不同企业新冠疫苗加样回收试验结果(%)
Tab. 4 Results of the recovery test for COVID - 19 vaccines developed by different companies (%)

样品来源	回收率			$\bar{X}$	CV
	1	2	3		
X 公司	86. 75	91. 31	82. 36	86. 81	5. 16
Y 公司	81. 32	87. 20	80. 38	82. 97	4. 46
Z 公司	101. 43	104. 81	109. 99	105. 41	4. 09

2. 4 样品含量测定

取 X, Y, Z 公司的 10 批、10 批、5 批样品, 分别按 2. 1 项下方法处理, 按 2. 2 项下方法测定, 结果平均含量分别为 302. 96 pg / mL、1 010. 80 pg / mL、42. 92 μ g / mL。详见图 1。

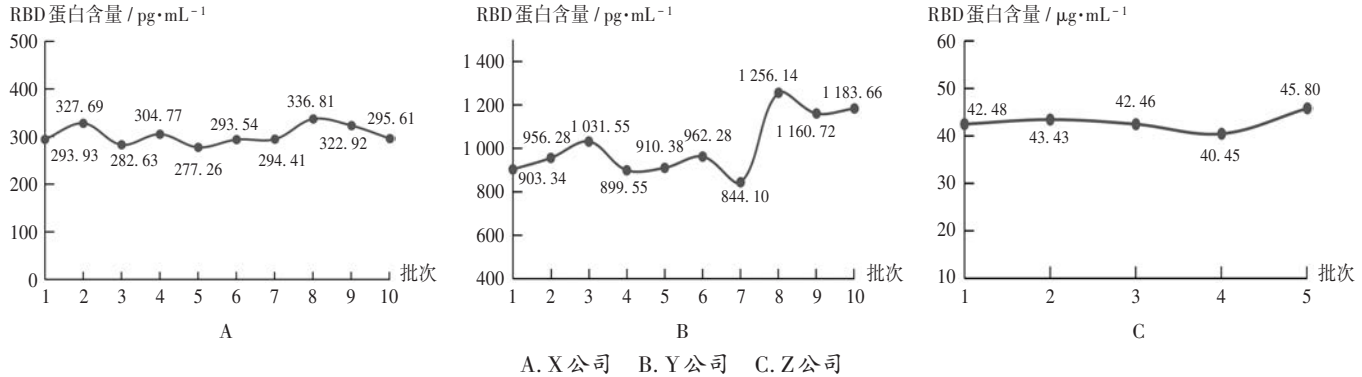


图 1 新冠重组疫苗 RBD 蛋白含量测定结果
A. Company X B. Company Y C. Company Z

Fig. 1 Determination results of RBD protein content of COVID - 19 recombinant vaccine

3 讨论

在SARS, MERS, COVID-19中, S蛋白在受体结合和膜融合方面起着至关重要的作用。S蛋白含有RBD, 可特异性识别ACE2作为其受体^[8,10-11]。S蛋白的RBD是进入病毒宿主细胞受体对接所必需的, 也就是“锁芯”部位^[4,6-7]。全长S蛋白及其抗原片段包括S₁亚基、NTD、RBD和S₂亚基, 可作为亚单位疫苗研制的重要靶点^[10]。目前, 基于RBD的亚单位疫苗已有很多报道^[4]。国内上市的重组新冠疫苗(5型腺病毒载体)也是基于新冠病毒S蛋白开发^[8]。

本研究建立了测定新冠疫苗RBD抗原含量的方法, 所用抗体为重组RBD单克隆抗体, 制备较简单, 且采用的抗体为HRP标记的SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike RBD, 可直接显色, 无需再加入酶标二抗。用HRP标记的一抗可简化实验步骤, 缩短实验时间, 从而提高检验效率。本方法可作为新冠疫苗体外效力评价的手段。

新冠灭活疫苗中有新冠病毒的全蛋白, 国内上市的新冠重组亚单位疫苗基于RBD蛋白为免疫靶点。故选择S蛋白的RBD作为新冠灭活疫苗目的抗原的检测对象。新冠重组亚单位疫苗采用体内效力检测法的体内实验操作周期长, 个体差异对结果影响较大, 且需遵循动物实验伦理准则。故采用简便、有效的目的抗原检验作为辅助, 有助于提高检验效率^[12-15], 全方位评价疫苗的免疫效果。该方法可用于重组亚单位疫苗目的抗原的检测。

疫苗目的抗原是效力的决定性指标之一, 且佐剂与疫苗同等重要, 故目的抗原的测定不能作为疫苗效力的唯一决定性因素。如Z公司目的抗原含量很高, 主要是因为Z公司为重组蛋白疫苗, 全病毒蛋白的免疫原性会强于部分蛋白亚基的免疫原性。本研究建立的方法得到的RBD抗原含量和Z公司的药品说明书基本一致。

该方法可实现用一致的靶点和方法检测新冠灭活疫苗和重组亚单位疫苗的目的抗原。通过查询国家药品监督管理局网站, 已上市新冠疫苗主要包括灭活疫苗、亚单位疫苗、腺病毒载体疫苗等。国内上市的新冠腺病毒载体疫苗是以新冠病毒S蛋白为免疫对象, 而S蛋白包括RBD蛋白。因此, 该方法理论上可用于新冠腺病毒载体疫苗目的抗原的体外检测。后期将采用新建的ELISA法进行新冠腺病毒载体疫苗目的抗原体外检测, 以实现更多新冠疫苗品种在检测项目、检测靶点上的统一, 进一步提高检验效率。

综上所述, 所建立的新冠病毒疫苗多种技术路线适用于目的抗原检测, 方法学验证结果符合相关要求,

能显著提高检测效率。

参考文献

- [1] LI Q, GUAN XH, WU P, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus - Infected Pneumonia[J]. N Engl J Med, 2020, 382(13): 1199 - 1207.
- [2] PEIRIS JS, LAI ST, POON LL, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome[J]. Lancet, 2003, 361(9366): 1319 - 1325.
- [3] LI F, LI WH, FARZAN M, et al. Structure of SARS coronavirus spike receptor - binding domain complexed with receptor[J]. Science, 2005, 309(5742): 1864 - 1868.
- [4] ZHOU P, YANG XL, WANG XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. Nature, 2020, 579(7798): 270 - 273.
- [5] DU LY, HE YX, ZHOU YS, et al. The spike protein of SARS - CoV - a target for vaccine and therapeutic development[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(3): 226 - 236.
- [6] LU GW, WANG QH, GAO GF. Bat - to - human: spike features determining 'host jump' of coronaviruses SARS - CoV, MERS - CoV, and beyond[J]. Trends Microbiol, 2015, 23(8): 468 - 478.
- [7] SHANG J, YE G, SHI K, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS - CoV - 2[J]. Nature, 2020, 581(7807): 221 - 224.
- [8] DAI LP, ZHENG TY, XU K, et al. A Universal Design of Beta-coronavirus Vaccines against COVID - 19, MERS, and SARS[J]. Cell, 2020, 182(3): 722 - 733. e11.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 446 - 472.
- [10] ZHOU YS, YANG Y, HUANG JW, et al. Advances in MERS - CoV Vaccines and Therapeutics Based on the Receptor - Binding Domain[J]. Viruses, 2019, 11(1): 60.
- [11] DU LY, YANG Y, ZHOU YS, et al. MERS - CoV spike protein: a key target for antivirals[J]. Expert Opin Ther Targets, 2017, 21(2): 131 - 143.
- [12] JIANG SB, BOTTAZZI ME, DU LY, et al. Roadmap to developing a recombinant coronavirus S protein receptor - binding domain vaccine for severe acute respiratory syndrome[J]. Expert Rev Vaccines, 2012, 11(12): 1405 - 1413.
- [13] WANG N, SHANG J, JIANG SB, et al. Subunit Vaccines Against Emerging Pathogenic Human Coronaviruses[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 298.
- [14] 周振歆, 易力, 张晗, 等. 肠道病毒71型灭活疫苗体外和体内相对效力试验的相关性[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(9): 1028 - 1032.
- [15] 吴星, 王晓娟, 梁争论. 我国预防性疫苗效价检测方法的现状和思考[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(10): 1158 - 1163.

(收稿日期: 2023-06-23; 修回日期: 2023-10-01)