·生物医药前沿·

新型冠状病毒灭活疫苗 N 蛋白含量双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立与应用

赵玉秀[1],英志芳[2],宋彦丽[1],李爱灵[1],郭彦岑[1],董　圆[1],李　艳[1],王　辉[1]
(1 北京生物制品研究所有限责任公司,北京 100176;2 中国食品药品检定研究院,北京 102600)

[摘要] **目的:**建立新型冠状病毒(SARS coronavirus 2,SARS-CoV-2)灭活疫苗 N 蛋白含量双抗体夹心 ELISA 检测方法,并对其进行验证及初步应用。**方法:**首先包被重组 N 蛋白,采用间接 ELISA 方法测定不同抗体对 N 蛋白的亲和能力。再选取高亲和力的抗体 rN003 作为包被抗体,rN002 作为检测抗体,建立双抗体夹心 ELISA 检测方法并确定病毒裂解方法。测定该方法的线性范围、准确度、精确度、中间精密度、特异性及灵敏度,并用该方法测定 6 批 SARS-CoV-2 灭活疫苗中 N 蛋白的含量。**结果:**N 蛋白含量在 0.018 ~ 0.75 μg·mL^{-1}范围内该方法呈现良好的线性关系(R^2 > 0.98),回收率在 80% ~ 120% 之间,CV < 10%。6 批样品 N 蛋白含量均占总蛋白的 10% ~ 20%,样品均一性较好。**结论:**本研究成功建立了 SARS-CoV-2 灭活疫苗 N 蛋白含量双抗体夹心 ELISA 检测方法,该方法具有良好的线性、准确度、精确度、中间精密度、特异性及灵敏度,能满足 SARS-CoV-2 灭活疫苗 N 蛋白含量的检测。

[关键词] 新型冠状病毒;N 蛋白;夹心 ELISA 方法
[中图分类号] R978.7　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2021)19 - 1787 - 07

Development and application of a sandwich ELISA method for detection of N protein in SARS-CoV-2 inactivated vaccine

ZHAO Yu-xiu[1], YING Zhi-fang[2], SONG Yan-li[1], LI Ai-ling[1], GUO Yan-cen[1], DONG Yuan[1], LI Yan[1], WANG Hui[1]
(1 *Beijing Institute of Biological Products Company Limited*, *Beijing* 100176, *China*;
2 *Nation Institute for Food and Drug Control*, *Beijing* 102600, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To develop a sandwich ELISA method for detection of N protein in SARS-CoV-2 inactivated vaccine, and to further validate and primarily apply it for N protein qutification. **Methods**: The indirect ELISA method was used to assess the affinity of different anti-N protein antibodies by coating the recombinant N protein. Then the sandwich ELISA system was set up by using antibodies rN003 and rN002 as the capture and detection antibody, respectively. Also, the method for fully lysing virus to release all the N protein was confirmed. Validation of linear range, accuracy, precision, intermediate precision, specificity and LLD were obtained, and N protein content in 6 batches of SARS-CoV-2 inactivated vaccine was determined using this method. **Results**: N protein content has good linearty within the concentration range of 0.018 ~ 0.75 μg·mL^{-1}(R^2 > 0.98), with the recovery of 80% ~ 120% and CV < 10%. N protein concentrations for 6 batches of samples accounted for 10% ~ 20% of

[基金项目] 国家科技部"重点研发计划"资助项目(2020YFC0842100)
[作者简介] 赵玉秀,女,副研究员,主要从事新冠疫苗研发。联系电话:(010)60963531,E-mail:zhao10306@126.com。共同第一作者:英志芳,女,助理研究员,主要从事新冠疫苗研发。联系电话:(010)60963530,E-mail:17736125211@126.com。
[通讯作者] 王辉,女,研究员,主要从事病毒类疫苗研究。联系电话:(010)60963530,E-mail:wh6247@126.com。

the total protein. All samples showed a good uniformity. **Conclusions**: The sandwich ELISA method for detection of N protein in SARS-CoV-2 inactivated vaccine was successfully developed with good linearty, accuracy, precision, intermediate precision, selectivity, and sensitivity, which can satisfy the N protein detection of SARS-CoV-2 inactivated vaccine.

[**Key words**] SARS-CoV-2; N protein; sandwich ELISA method

新型冠状病毒(SARS coronavirus 2,SARS-CoV-2)疫情暴发以来,迅速席卷全球216个国家和地区[1]。疫苗是防控传染病的重要有效手段,目前全球约200家实验室围绕5条技术路线开展研究,截至2021年9月7日,已有114个已进入临床试验阶段[2]。刺突蛋白(spike protein,S蛋白)上有大量中和表位,是疫苗研发关注的重点,各实验室已经建立了相应的ELISA检测方法以便对疫苗抗原成分进行精确定量[3-4]。但借鉴2003年暴发的新型冠状病毒(SARS coronavirus 1,SARS-CoV-1)和2012年暴发的中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus,MERS)疫苗的研究成果,多篇报道表明病毒核衣壳蛋白(nucleocapsid protein,N蛋白)上也含大量B细胞、Th1细胞和CTL细胞的特异性抗原表位,可刺激机体产生高水平体液免疫应答和细胞免疫应答,可能是疫苗研发需要关注的另一个重要蛋白[5-9]。此外,对在研灭活疫苗中N蛋白进行定量,探索N蛋白与S蛋白含量关系,是优化疫苗生产工艺、提高疫苗质量控制的必要手段,但关于SARS-CoV-2灭活疫苗N蛋白的定量方法尚未有报道。

N蛋白位于病毒基因组外侧,与基因组RNA相互缠绕构成核衣壳[10]。常规ELISA方法中抗体无法直接与病毒N蛋白结合,需要对病毒进行裂解使N蛋白充分释放,同时又不影响N蛋白结构,这给N蛋白ELISA方法的建立增加了困难。本实验在现有研究基础上,通过测试多种抗体对N蛋白的亲和能力、筛选病毒裂解方式等,建立了SARS-CoV-2灭活疫苗的N蛋白含量双抗体夹心ELISA检测方法,并对其进行验证及初步应用,旨在为优化疫苗评价提供参考方法。

材料与方法

1 抗体与蛋白

抗体信息:兔源单抗rN001(Cat:40143-R019),rN003(Cat:40143-R001),rN004(Cat:40143-R004),rN005(Cat:40143-R040)和鼠源单抗rN002(Cat:40143-MM05)购自北京义翘神州公司;人源化重组抗体rN006(上海近岸蛋白公司,Cat:DA028);鼠源单抗rN007(Cat:SC2N101),rN008(Cat:SC2N102),rN009(Cat:SC2N103)购自杭州博岳公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(Cat:NA931)和羊抗鼠二抗(Cat:NA934)购自GE公司。

重组蛋白信息:重组N蛋白(北京义翘神州公司,Cat:40588-V08B)。

2 试剂

样品裂解剂(cell lysis buffer,义翘神州公司,Cat:SN14AP1701);Triton X-100(Cat:9002-93-1),Tween 20(Cat:9005-64-5)购自Sigma公司;TMB(Cat:50-76-03)购自KPL公司;PBS(中杉金桥公司,Cat:ZLI-9061)。

3 仪器

96孔酶标板(Corning公司);405Ls洗板机及Exl808酶标仪购自BioTek公司。

4 参考品及疫苗样品

SARS-CoV-2灭活疫苗参考品(Lot:20200318)是由北京生物制品研究所有限责任公司制备的疫苗原液用0.01 mol·L^{-1}的PBS稀释后获得,进行标定。SARS-CoV-2灭活疫苗样品A~G(Lot:nCoV2020S12801,nCoV2020S13801,nCoV2020S14801,nCoV2020S15801,nCoV2020S16801,nCoV2020S17801,nCoV2020S18801)是由北京生物制品研究所有限责任公司制备的疫苗原液。

5 夹心ELISA方法的建立

5.1 测定不同抗体对N蛋白的亲和能力及抗体效价

用间接ELISA法测定抗体对蛋白的亲和能力及抗体效价[5,11-13]。重组N蛋白用PBS稀释至1 μg·mL^{-1},加入到96孔酶标板,100 μL·孔$^{-1}$,4 ℃过夜。弃掉包被液并加入200 μL封闭液[含2%脱脂奶粉(*w*/*v*)的PBS缓冲液]室温封闭3 h,弃掉封闭液,分别加入浓度为0.5,0.25,0.125,0.062 5,0.031 3,0.016和0.008 μg·mL^{-1}的SARS-CoV-2特

异性 N 蛋白抗体,室温孵育 1 h。洗板 5 次后,加入 1∶2 000 稀释的 HRP 标记的抗兔或抗鼠抗体,室温反应 1 h。洗板 5 次,每孔加入 100 μL TMB 显色底物,室温显色 15 min,加入 50 μL 浓度为 1 mol·L^{-1} 的硫酸终止液。根据吸光值 A_{450}/A_{630} 判断不同抗体与 N 蛋白的亲和能力及效价。抗体效价定义为抗体饱和情况下,稀释倍数最高 A_{450}/A_{630} 值降低 1/2 对应的抗体浓度。

5.2 比较不同抗体组合建立的夹心 ELISA 方法

根据抗体效价确定包被浓度,初步测试不同抗体组合建立的夹心 ELISA 对 N 蛋白的检测效果。用 50 mmol·L^{-1}的碳酸盐(pH = 9.6)稀释包被抗体 rN003 和 rN005 至 0.062 5 μg·mL^{-1},分别包被于 ELISA 板,100 μL·孔$^{-1}$,4 ℃过夜。弃掉包被液,洗板 5 次,加入封闭液 200 μL·孔$^{-1}$,室温封闭 3 h。弃掉封闭液,加入用 PBS 预先稀释至 8,4,2,1,0.5,0.25,0.125 μg·mL^{-1}的重组 N 蛋白样品,加入到 ELISA 板,100 μL·孔$^{-1}$,室温反应 2 h。洗板 5 次,分别加入浓度为 0.031 3 μg·mL^{-1}的抗体 rN001 和浓度为 0.062 5 μg·mL^{-1}的 rN002,100 μL·孔$^{-1}$,室温反应 1 h。弃掉抗体并洗板 5 次,加入用 PBS 稀释的 HRP 标记的抗鼠二抗(1∶4 000),室温反应 1 h。洗板 5 次,每孔加入 100 uL 的 TMB 显色液,室温反应 15 min,加入 50 μL 浓度为 1 mol·L^{-1}的硫酸终止液,读数 A_{450}/A_{630} 结果。绘制曲线并比较各组抗体对 N 蛋白的敏感性。

5.3 优化包被抗体、检测抗体浓度

根据抗体效价设置多个包被抗体浓度和检测抗体浓度。包被抗体 rN003 稀释至 0.125,0.083,0.062 5 和 0.05 μg·mL^{-1},检测抗体 rN002 稀释至 0.167,0.125 μg·mL^{-1}。其余操作同“**5.2**”项。根据四参数曲线拟合结果确定抗体浓度。

5.4 确定病毒裂解方式

测试煮沸、Triton X-100 和样品裂解剂等不同裂解方式对 N 蛋白含量的影响[14-15]:① 煮沸,灭活的 SARS-CoV-2 样品用沸水浴煮沸 10 min,加入到 ELISA 板上。② Triton X-100 处理,灭活的 SARS-CoV-2 样品加入等体积经 PBS 稀释后的 0.4% Triton X-100,室温振荡 10 s,加入到 ELISA 板上。③ 样品裂解剂处理,灭活的 SARS-CoV-2 样品与经 PBS 稀释 4 倍后的样品裂解剂混合,室温振荡 10 s,加入到 ELISA 板上。其余操作步骤同“**5.2**”项。其中包被抗体至 0.125 μg·mL^{-1},检测抗体稀释至 0.167 μg·mL^{-1}。根据测定的 A_{450}/A_{630} 值,判断最优的 N 蛋白裂解方式。

5.5 参考品及标准曲线的建立

5.5.1 建立参考品 将重组 N 蛋白作为参考品,取一批样品(Lot:20200318)用 PBS 进行适当稀释,并将其作为待测样品。按照“**5.2**”项进行操作。其中包被抗体和检测抗体浓度分别为 0.125 和 0.167 μg·mL^{-1},连续重复 6 次,反复标定样品的 N 蛋白含量,并将其作为标准品。

5.5.2 建立标准曲线 将标记好的待测品定义为标准品,批号定义为 STD-20200318-16。分装为 0.5 mL·支$^{-1}$,2 ℃ ~8 ℃保存。分装完成后,随机抽取 1 支,将其分别稀释至 1.176,0.588,0.294,0.147,0.074,0.037 和 0.019 μg·mL^{-1},测定检测值 A_{450}/A_{630} 并绘制标准曲线。

6 方法验证

6.1 线性及范围

按照“**5.5**”项测定系列稀释的参考品溶液,绘制其浓度与 A_{450}/A_{630} 的标准曲线,选取 $R^2 > 0.99$ 对应的范围,即为该方法的线性范围。

6.2 准确度、精密度、中间精密度测定

参照本公司《新型冠状病毒灭活疫苗(Vero 细胞)原液抗原含量方法验证方案(酶联免疫法)》标准作业程序对本研究建立的 ELISA 方法进行准确度、精密度和中间精密度检测,具体步骤为:将参考品稀释至 0.75,0.5,0.4,0.2 和 0.1 μg·mL^{-1}这 5 个浓度,第 1 位分实验员分别测试 0.75 和 0.1 μg·mL^{-1}各 3 个复孔,0.5,0.4 和 0.2 μg·mL^{-1}各 6 个复孔,根据计算实测值/理论值比较确定准确度和精密度;第 2 位实验员测 0.5,0.4 和 0.2 μg·mL^{-1}各 6 个复孔,计算实测值,并与第 1 位实验员的检测结果进行比较,确定中间精密度。测定样品稀释液、1/10 稀释后的 H3N2 病毒判断该方法的特异性。参考品稀释至 0.018 μg·mL^{-1},重复 3 个复孔,检测方法灵敏度,其变异系数≤20%,且样品回收率在 80% ~120%,表明方法验证通过。

7 方法初步应用

随机选取北京生物制品研究所制备的新型冠状病毒灭活疫苗样品,进行稀释后作为待测样品。根据“**5.2**”项建立的 ELISA 检测方法,测定样品的 N 蛋白含量,并根据总蛋白含量计算样品比活性,监测疫苗各批次之间的稳定性。样品比活/% = 抗原浓度/蛋白浓度 ×100%。

8 统计学分析

实验结果使用 GraphPad Prism 7.0 进行统计分析。标准曲线以蛋白浓度理论值为 X 轴、吸光值 A_{450}/A_{630} 为 Y 轴进行四参数拟合。

结　果

1 测定抗体对 N 蛋白亲和能力及抗体效价

9 种抗 N 蛋白抗体 rN001 ~ rN009 均能较好地与 N 蛋白结合，并且随着稀释倍数降低，吸光值 A_{450}/A_{630} 呈下降趋势，详见图 1。

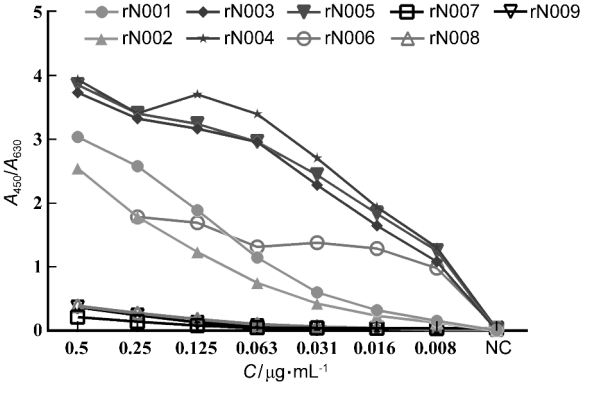


图 1　间接 ELISA 比较不同抗体与 N 蛋白的反应能力

对比 9 种抗体可知，rN007，rN008 和 rN009 与 N 蛋白亲和能力较弱，rN003，rN004 和 rN005 与 N 蛋白的亲和力高于其他抗体。rN003 和 rN005 背景值较低，且线性优于 rN004，因此，rN003 和 rN005 可作为包被抗体，抗体效价均为 1∶8 000，浓度为 0.062 5 μg·mL^{-1}。

rN001 和 rN002 抗体的线性趋势最明显，因此这 2 种抗体可作为检测抗体，抗体效价分别为 1∶8 000 和 1∶2 000，浓度分别为 0.062 5 和 0.25 μg·mL^{-1}。

2 比较不同抗体组合建立夹心 ELISA 方法结果

根据不同抗体配对建立的夹心 ELISA 方法结果，以重组 N 蛋白浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制四参数曲线，结果见图 2。rN003/rN001 和 rN005/rN001 这两组背景值较高，检测灵敏度较低，排除上述抗体组合；比较 rN003/rN002 和 rN005/rN002 发现，rN003/rN002 检测值 A_{450}/A_{630} 高于 rN005/rN002 组，且随着重组 N 蛋白浓度的降低，检测值 A_{450}/A_{630} 线性较好。因此选择 rN003/rN002 抗体组合建立 ELISA 方法。

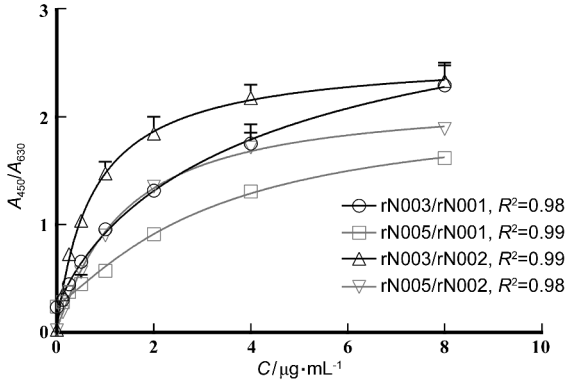


图 2　不同抗体组合建立夹心 ELISA 方法结果

3 优化包被抗体、检测抗体浓度

调整包被抗体、检测抗体浓度后，以重组 N 蛋白为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制四参数曲线，结果见图 3。对比两组检测抗体浓度，发现检测抗体浓度为 0.167 μg·mL^{-1} 对应的检测值 A_{450}/A_{630} 更高。对比该检测抗体浓度下，不同包被抗体浓度对曲线的影响，结果显示，除 0.05 μg·mL^{-1} 包被浓度曲线检测值 A_{450}/A_{630} 较低外，其余 3 条曲线较为一致。包被抗体在固定捕获抗原过程中至关重要，因此选用较高包被抗体浓度 0.125 μg·mL^{-1}。

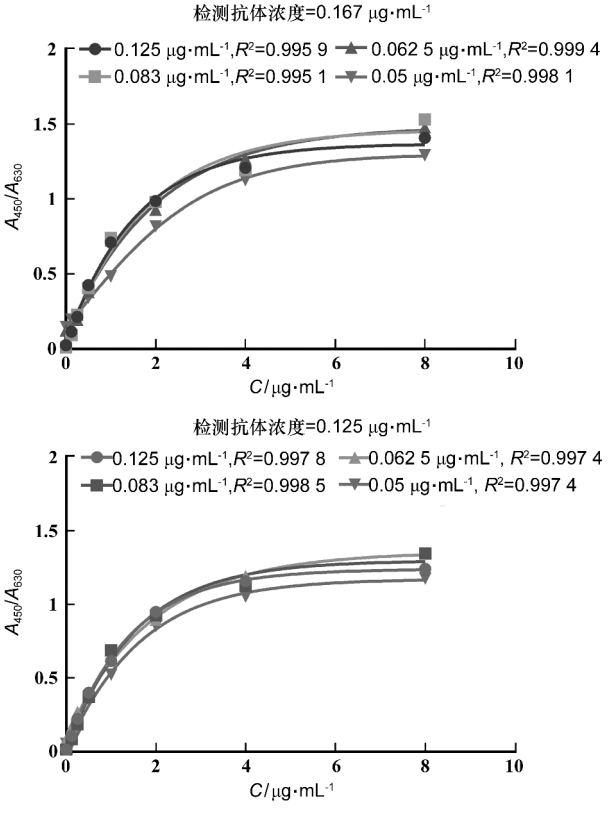


图 3　优化包被抗体和检测抗体浓度

4 病毒裂解方式的选择

将不同裂解方式的样品加入 ELISA 板上进行检测，煮沸样品从原倍起始，Triton X-100 和样品裂解剂处理的样品从 1/4 倍稀释起始。检测结果以稀释倍数为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制四参数曲线，见图 4。根据四参数曲线图可知，样品煮沸后检测值 A_{450}/A_{630} 接近背景值，即检测不到抗原；加入 Triton X-100 裂解病毒后，随着稀释倍数降低，吸光值 A_{450}/A_{630} 无明显变化；样品裂解剂组 A_{450}/A_{630} 在 1/16 倍稀释前检测值 A_{450}/A_{630} 呈现上升趋势，1/16 倍稀释以后，检测值 A_{450}/A_{630} 开始呈线性趋势降低。查阅文献，发现裂解剂可能对反应体系造成干扰，而增加稀释倍数可消除这种干扰[15]。根据多次测定结果，发现样品先用裂解剂进行 1/2 倍裂解后，再做 1/8 倍稀释可消除裂解剂对实验的影响。

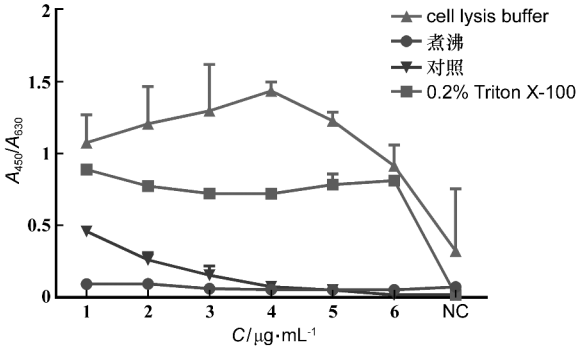


图 4 不同裂解方式对病毒 N 蛋白含量的影响

此外，本实验测试了裂解时间、温度对病毒裂解效果的影响。结果表明，加入样品裂解剂后充分混匀振荡，病毒已得到充分裂解。延长裂解时间、提高裂解反应温度，病毒 N 蛋白含量并无明显改变。

5 参考品与标准曲线建立

5.1 标定参考品

以 N 蛋白作为参考品，测定待测品的 N 蛋白含量。多次反复测定后，结果见表 1，待测品 N 蛋白浓度为 18.82 μg·mL^{-1}，CV = 13.00%。

表 1 参比品（Lot:20200318）重复测定结果

实验次数	参比品（Lot:20200318）N 蛋白含量/μg·mL^{-1}	R^2
1	27.00	0.992
2	18.00	0.992
3	5.17	0.997
4	19.36	0.995
5	21.87	0.995
6	16.04	0.997
均值	18.82	
去除极端值后 CV/%	13.00	

5.2 建立标准曲线

将标记好的待测品定义为标准品，批号定义为 STD-20200318-16。分装为 0.5 mL·支$^{-1}$，2 ℃ ~8 ℃保存。分装完成后，随机抽取 1 支进行 ELISA 方法检测，绘制标准曲线，结果见图 5，$R^2 > 0.98$，说明标定并分装后的样品吸光值与稀释倍数存在良好的线性关系，标准品标定及分装后可用于本实验。

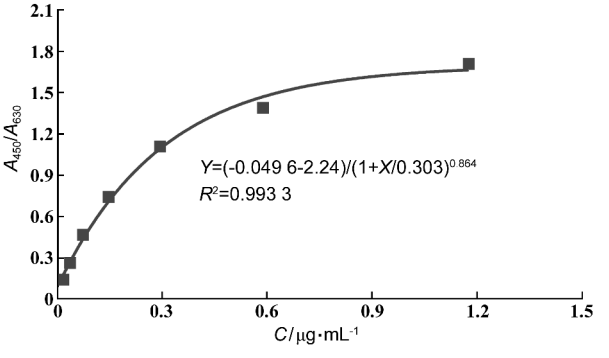


图 5 不同 N 蛋白浓度下的标准曲线

6 方法验证

6.1 线性及范围

采用四参数拟合，N 蛋白浓度在 0.15 ~ 1.18 μg·mL^{-1}时，曲线呈现良好的线性关系，$R^2 > 0.99$。

6.2 精确度、准确度、中间精密度测定

计算各组样品 N 蛋白含量及回收率，见表 2。

表 2 方法验证结果

项目	理论浓度 /μg·mL^{-1}	测定值 1 /μg·mL^{-1}	回收率 1 /%	CV1 /%	测定值 2 /μg·mL^{-1}	回收率 2 /%	CV2 /%
准确度、精确度（CV < 10%）	0.75	0.742	98.93	4.39	—	—	—
	0.75	0.742	98.93		—	—	
	0.75	0.675	90		—	—	

续表 2

项目	理论浓度 /μg·mL^{-1}	测定值 1 /μg·mL^{-1}	回收率 1 /%	CV1 /%	测定值 2 /μg·mL^{-1}	回收率 2 /%	CV2 /%
中间精密度(CV <10%)	0.5	0.56	112	8.1	0.514	102.74	3.92
	0.5	0.532	106.4		0.568	113.64	
	0.5	0.521	104.2		0.526	105.20	
	0.5	0.445	89		0.521	104.26	
	0.5	0.47	94		0.562	112.46	
	0.5	0.471	94.2		0.553	110.59	
	0.4	0.476	119	6.38	0.461	115.37	7.99
	0.4	0.425	106.25		0.364	90.93	
	0.4	0.418	104.5		0.399	99.77	
	0.4	0.396	99		0.450	112.38	
	0.4	0.395	98.75		0.400	99.99	
	0.4	0.425	106.25		0.431	107.64	
	0.2	0.225	112.5	4.28	0.221	110.37	7.71
	0.2	0.205	102.5		0.182	91.19	
	0.2	0.205	102.5		0.184	92.00	
	0.2	0.196	98		0.176	88.02	
	0.2	0.203	101.5		0.201	100.41	
	0.2	0.208	104		0.190	94.87	
准确度、精确度(CV <10%)	0.1	0.09	90	0.52	—	—	—
	0.1	0.091	91		—	—	
	0.1	0.091	91		—	—	
特异性(CV <10%)	≤0.018	0.005	—		—	—	—
	≤0.018	0.005	—		—	—	
检测限(CV <25%)	0.018	0.015	83.33	18	—	—	—
	0.018	0.02	111.11		—	—	
	0.018	0.019	105.56		—	—	

准确度、精确度及中间精密度回收率均在 80% ~120% 范围内,CV 均 <10%。灵敏度回收率在 80 ~125% 范围内,CV <25%,方法通过验证。

7 初步应用

连续取 6 批生产过程中的 SARS-CoV-2 灭活疫苗原液进行 N 蛋白含量测定,每批样品重复测定 3 次,结果见表 3。同一批次间样品间 N 蛋白含量较为稳定,不同批次间 N 蛋白占总蛋白含量百分比在 10% ~20% 之间,CV 值为 17.26%,表明该方法较为稳定。

表 3 测定多批次样品 N 蛋白含量

样品名称	蛋白含量 /μg·mL^{-1}	样品 N 蛋白含量/μg·mL^{-1}				比活/%
		实验 1	实验 2	检测 3	$\bar{x} \pm s$	
样品 A	231.40	31.07	42.66	32.27	35.33 ±6.37	15.27
样品 B	266.78	36.79	47.13	35.15	39.69 ±6.50	14.88
样品 C	274.64	26.00	40.51	38.89	35.13 ±7.95	12.79
样品 D	260.23	50.18	45.70	30.33	42.07 ±10.41	16.17
样品 E	206.19	28.44	42.98	45.05	38.82 ±9.05	18.83
样品 G	314.75	34.13	35.67	31.40	33.73 ±2.16	10.72

讨　论

本实验通过间接 ELISA、夹心 ELISA 等方法分别进行了抗体评价、裂解方式筛选、标准品建立等实验，建立了可用于 SARS-CoV-2 灭活疫苗 N 蛋白含量检测的 ELISA 方法。经验证，该方法具有良好的线性及准确度、精确度和中间精密度，特异性较高，能满足对疫苗样品中 N 蛋白含量的定量检测。

前期的免疫印迹实验显示，rN002 和 rN003 抗体可使得 SARS-CoV-2 病毒 N 蛋白在还原电泳条件下显色，即 2 种抗体针对 N 蛋白的线性表位。在 ELISA 实验中，这 2 种抗体组合检测样品 N 蛋白时呈现的线性关系优于其他抗体组合，推测这 2 种抗体在反应体系中与 N 蛋白的结合部位互不干扰，但具体针对的表位序列需进一步通过测序等技术对抗体进行鉴定。

由于 N 蛋白与病毒基因组 RNA 相互缠绕构成核衣壳，包裹于病毒内部，实验中需采用物理、化学方法使病毒充分破碎释放 N 蛋白，同时又不对 ELISA 反应体系造成影响。本实验采取多种裂解方式，最终确定样品裂解剂能对病毒进行有效裂解且在一定稀释条件下对反应体系无干扰。该试剂主要用于假病毒检测过程中对细胞的裂解，主要成分有：Tris-HCl、乙二胺四乙酸二钠（Na_2EDTA）、Triton、焦磷酸钠、β-甘油磷酸、正矾酸钠（Na_3VO_4）和亮抑酶肽等。实验中发现，仅使用 Triton 对病毒也具有一定的裂解作用，但在反应体系中呈现的效果劣于样品裂解剂，因此推测样品裂解剂中其他成分能够更好的保护 N 蛋白的生物学活性。

采用该方法对多批 SARS-CoV-2 灭活疫苗样品进行 N 蛋白含量检测，结果显示 N 蛋白占总蛋白含量的百分比（比活）较为一致，该疫苗的生产工艺较稳定。

[参 考 文 献]

[1] WHO. Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard[EB/OL]. [2020-07]. https://covid19.who.int/.

[2] WHO. Accelerating a safe and effective COVID-19 vaccine[EB/OL]. [2020-07]. https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines.

[3] WANG H, ZHANG Y, HUANG B, *et al*. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2[J]. *Cell*, 2020, 182(3): 713-721.e9.

[4] GAO Q, BAO L, MAO H, *et al*. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2[J]. *Science*, 2020, 369(6499): 77-81.

[5] LEE K, KO HL, LEE EY, *et al*. Development of a diagnostic system for detection of specific antibodies and antigens against Middle East respiratory syndrome coronavirus[J]. *Microbiol Immunol*, 2018, 62(9): 574-584.

[6] FUNG J, LAU SKP, WOO PCY. Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detecting middle east respiratory syndrome coronavirus in humans[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2099: 89-97.

[7] MCPHERSON C, CHUBET R, HOLTZ K, *et al*. Development of a SARS coronavirus vaccine from recombinant spike protein plus delta inulin adjuvant[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1403: 269-284.

[8] DU L, KOU Z, MA C, *et al*. A truncated receptor-binding domain of MERS-CoV spike protein potently inhibits MERS-CoV infection and induces strong neutralizing antibody responses: implication for developing therapeutics and vaccines[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81587.

[9] ROBERTS A, LAMIRANDE EW, VOGEL L, *et al*. Animal models and vaccines for SARS-CoV infection[J]. *Virus Res*, 2008, 133(1): 20-32.

[10] NOORIMOTLAGH Z, KARAMI C, MIRZAEE SA, *et al*. Immune and bioinformatics identification of T cell and B cell epitopes in the protein structure of SARS-CoV-2: a systematic review[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86: 106738.

[11] MENACHERY VD, GRALINSKI LE, MITCHELL HD, *et al*. Combination attenuation offers strategy for live-attenuated coronavirus vaccines[J]. *BioRxiv*, 2018, DOI:10.1101/309591.

[12] LUO F, LIAO FL, WANG H, *et al*. Evaluation of antibody-dependent enhancement of SARS-CoV infection in rhesus macaques immunized with an inactivated SARS-CoV vaccine[J]. *Virol Sin*, 2018, 33(2): 201-204.

[13] CHOI J, KIM MG, OH YK, *et al*. Progress of Middle East respiratory syndrome coronavirus vaccines: a patent review[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2017, 27(6): 721-731.

[14] 姚伟，蒋正东，李振辉，等. 流感病毒裂解疫苗裂解剂去除工艺改进及稳定性研究[C]//中国生物制品年会暨全国生物制品学术研讨会. 2013.

[15] KATZ JB, HANSON SK, PATTERSON PA, *et al*. *In vitro* assessment of viral antigen content in inactivated aluminum hydroxide adjuvanted vaccines[J]. *J Virol Methods*, 1989, 25(1): 101-108.

编辑：刘卓越/接受日期：2021-08-24