

• 动物及兽医生物技术 •

应用体积排阻色谱法测定口蹄疫灭活疫苗中的 146S 抗原含量

徐嫻¹, 邹兴启¹, 李翠¹, 朱元源¹, 何天慈¹, 杨延丽², 林旋², 宋艳民²,
郑金来³, 张松平², 赵启祖¹

1 中国兽医药品监察所, 北京 100081

2 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

3 北京标驰泽惠生物科技有限公司, 北京 102600

徐嫻, 邹兴启, 李翠, 等. 应用体积排阻色谱法测定口蹄疫灭活疫苗中的 146S 抗原含量. 生物工程学报, 2018, 34(5): 676–684.

Xu Y, Zou XQ, Li C, et al. Using size-exclusion chromatography to quantify the 146S antigen in inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Chin J Biotech, 2018, 34(5): 676–684.

摘要: 旨在应用体积排阻色谱法测定口蹄疫灭活疫苗中的 146S 抗原含量。使用 TSKgel G4000SW_{XL} (7.8 mm×30 cm) 色谱柱, 以 pH 7.2 的缓冲盐体系作为流动相, 流速为 0.6 mL/min, 进样量为 100 μL, 检测波长为 259 nm。以口蹄疫病毒 (O 型) 灭活 146S 抗原纯化样品建立标准曲线; 使用灭活抗原液配制 3 份口蹄疫灭活疫苗, 并进行精密度、重复性、特异性、耐受性验证; 应用该方法快速测定 16 批疫苗的 146S 含量。结果表明, 抗原浓度在 0.56–67.42 μg/mL 范围内, 其峰面积与浓度的线性关系良好 ($R^2=0.996$, $n=10$), 3 份疫苗 146S 抗原测定回收率分别为 93.6% ($RSD=2.7%$, $n=3$)、102.3% ($RSD=2.6%$, $n=3$)、95.5% ($RSD=5.1%$, $n=3$), 方法重复性好、准确性强 ($RSD=0.5%$, $n=6$), 且操作简便、高效, 对 16 批疫苗的测定结果较理想。应用该方法有望快速高效地检测口蹄疫灭活疫苗的 146S 抗原含量, 为疫苗的质量控制提供有力支持。

关键词: 体积排阻色谱, 口蹄疫, 灭活疫苗, 146S 抗原

Received: October 9, 2017; **Accepted:** March 26, 2018

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0501500), Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201303046).

Corresponding authors: Qizu Zhao. Tel: +86-10-62103670; Fax: +86-10-62103672; E-mail: zhaoqizu@163.com

Songping Zhang. Tel/Fax: +86-10-82544958; E-mail: spzhang@ipe.ac.cn

国家重点研发计划 (No. 2016YFD0501500), 公益性行业 (农业) 科研专项经费资助 (No. 201303046) 资助。

Using size-exclusion chromatography to quantify the 146S antigen in inactivated foot-and-mouth disease vaccine

Yuan Xu¹, Xingqi Zou¹, Cui Li¹, Yuanyuan Zhu¹, Tianci He¹, Yanli Yang², Xuan Lin², Yanmin Song², Jinlai Zheng³, Songping Zhang², and Qizu Zhao¹

1 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

2 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

3 Beijing Biaochezhuai Biological Technology Co. Ltd., Beijing 102600, China

Abstract: The aim of this study is to quantify the 146S antigen in foot-and-mouth disease virus (FMDV) inactivated vaccine by size-exclusion chromatography (SEC). The analysis was performed on a TSKgel G4000SW_{XL} column (7.8 mm×30 cm), with a pH 7.2 buffer salt system as the mobile phase. The flow rate was 0.6 mL/min, the injection volume was 100 μL and the detection wavelength was 259 nm. The calibration curve was established by using purified inactivated FMDV (serotype O) 146S antigen; 3 batches of vaccine formulated by inactivated antigen solution were tested to verify the accuracy, reproducibility, specificity and tolerability of the method. At last 16 batches of vaccine were determined by the SEC method. Results showed a good linearity between peak area and concentration of 146S antigen in the range between 0.56 and 67.42 μg/mL ($R^2=0.996$, $n=10$), and the average recovery rate of 146S antigen in the 3 batches of vaccine formulated in lab were 93.6% ($RSD=2.7\%$, $n=3$), 102.3% ($RSD=2.6\%$, $n=3$), and 95.5% ($RSD=5.1\%$, $n=3$). The method was proved accurate and reliable with good reproducibility ($RSD=0.5\%$, $n=6$), and applied to determine 16 batches of the commercial FMDV vaccine. According to the above results, the SEC method is high effective for 146S antigen quantify in the inactivated FMDV vaccine and would provide strong support for the vaccine quality control.

Keywords: size-exclusion chromatography, foot-and-mouth disease, inactivated vaccine, 146S antigen

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是传染性最强的家畜疫病之一。目前,我国对口蹄疫采取以灭活疫苗免疫为主的防控策略,使用的灭活疫苗以双相油乳剂疫苗为主,疫苗的质量对于口蹄疫的防控至关重要^[1-2]。疫苗对动物的保护效果主要取决于两个方面,一是疫苗毒株与流行毒株的相似程度,二是疫苗中抗原的含量^[3]。《中国兽药典》规定^[2],口蹄疫灭活疫苗质量的最终评估标准是本动物免疫攻毒试验,该项检验必须使用抗体阴性的本动物,不仅试验费用昂贵,还涉及动物实验伦理问题^[4]。而疫苗中有效抗原,即完整的病毒粒子 (146S) 的含量测定,是大型疫苗生产厂家和国际口蹄疫疫苗储备库控制疫苗中间生产过程的重要环节。国际上通用的测定 146S 抗原含量的方法是利用蔗糖或氯化铯密度梯度离心法,通过测定各个级份在 259 nm 的 OD 值,最终计算出抗原的浓度。该方法操作复杂,耗时较长,每次检测样品数量有限,且在操作过程中极

易导致 146S 抗原的损失,结果的稳定性和重复性受较多因素影响,因此尚未标准化^[5-7]。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 因其灵敏度高、特异性强等优点,在 146S 抗原的测定中被广泛关注,但因该方法不具有通用性而受到局限^[8-10]。因此,亟待应用更高效、经济的方法测定疫苗中 146S 的含量。体积排阻色谱技术是根据待测组分的分子大小进行分离的一种液相色谱技术,分离原理为凝胶色谱柱的分子筛机制。样品进入色谱柱后,不同组分按其分子大小进入相应孔内,大分子因不能进入颗粒内部,在色谱柱中滞留时间短,先于小分子被流动相洗脱至柱外,通过这种分子筛效应,各组分从大到小依次被洗脱。体积排阻色谱技术常用于生物大分子的分离和纯化。Spitteler 等^[6]和杨延丽等^[10]均使用体积排阻色谱法对灭活的口蹄疫病毒液中的 146S 抗原进行检测,认为该技术在疫苗生产工艺研究和质量控制中均具有应用前景。Vajda 等^[11]应用该技术分离了 3 株流感病

毒,并通过红细胞凝聚活性测定进行了验证。本研究首次将高效液相体积排阻色谱技术应用于口蹄疫灭活疫苗中 146S 抗原含量的测定,通过方法学考察,证明了该方法具有准确、高效等优势,初步建立了一种新的口蹄疫灭活疫苗中 146S 抗原含量的高效液相色谱检测方法,为口蹄疫灭活疫苗质量评价提供了一种更加快速、高效的新技术。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

L-2000 型高效液相色谱仪 (Hitachi 公司), L203 型电子天平 (梅特勒-托利多)。

1.2 主要试剂

50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0, 含 0.15 mol/L NaCl) (PBS), 聚乙二醇 (PEG) 6000 (国药集团优级纯) ISA206 油佐剂, DMEM 培养液, 胎牛血清 FBS, 口蹄疫 O 型抗原 Mya98 株测试卡、口蹄疫 A 型抗原测试卡 (北京标驰泽惠生物技术有限公司)。

1.3 测试样品

口蹄疫病毒 (O 型) 146S 抗原纯化样品 (67.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 由中农威特生物科技股份有限公司提供灭活抗原液 (O/Mya98), 经中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室制备。口蹄疫病毒灭活抗原液 (O/Mya98)、口蹄疫病毒灭活抗原液 (AF72), 分别由金宇保灵生物药品有限公司和中农威特生物科技股份有限公司提供。供试疫苗样品 16 批, 由国内 4 家口蹄疫灭活疫苗生产企业提供。未接毒 BHK-21 细胞, 由金宇保灵生物药品有限公司提供。猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (YZ 株), 猪繁殖与呼吸综合征灭活疫苗 (CH-1a 株), 为中国兽医药品监察所疫苗检品留样。

1.4 色谱条件

色谱柱: TSKgel G4000SW_{XL} (7.8 mm \times 30 cm) 色谱柱 (TOSOH)、TSKgel guard column SW_{XL} (6.0 mm \times 4 cm) 保护柱 (TOSOH); 流动相: pH 7.2

的 50 mmol/L 磷酸缓冲液, 含 0.1 mol/L Na₂SO₄; 紫外检测器检测波长: 259 nm; 流速: 0.6 mL/min。

1.5 标准曲线制备

用灭菌磷酸盐缓冲液对 146S 纯化样品进行系列稀释, 至最低浓度为 0.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。按上述色谱条件, 进样 100 μL 检测。以仪器积分得到峰面积为纵坐标, 以相应 146S 浓度为横坐标, 绘制标准曲线并进行线性回归。

1.6 抗原液 PEG 浓缩与疫苗配制

向灭活抗原液中加入 40% PEG 6000 磷酸盐溶液, 使 PEG 6000 终浓度为 8%, 充分混匀, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 8 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min, 弃去液体, 将沉淀重悬于适量 PBS 中, 吹打使充分溶解, 8 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 保留上清液, 为抗原浓缩液。用 PBS 对抗原浓缩液进行适当稀释后, 与 ISA206 油佐剂等体积混合, 剧烈振摇使之乳化, 即得口蹄疫灭活疫苗。

1.7 疫苗前处理

分别使用正丁醇、正戊醇、正己醇、正庚醇、正己烷、三氯甲烷作为破乳试剂对疫苗进行破乳。分别按疫苗体积与破乳试剂 9:1 (体积比) 充分振摇混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 分层后, 3 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 比较破乳分层情况。

1.8 抗原鉴别

应用口蹄疫 O 型抗原 Mya98 株测试卡和口蹄疫 A 型抗原测试卡检测 3 份自制疫苗, 参照操作说明, 向测试卡样品孔中缓慢滴加 70 μL 破乳水相, 水平放置 20 min 后观察结果。

2 结果

2.1 线性范围

将 146S 纯化样品色谱检测结果作图 (图 1), 经线性回归处理, 得到 146S 的回归方程为: $Y=45\ 216X-78\ 422$ ($R^2=0.996$, $n=10$), 结果表明, 146S 在

0.56–67.42 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系,当浓度为 0.56 $\mu\text{g/mL}$ 时, $S/N=14.62$, 满足定量限要求。146S 抗原保留时间在 13–14 min (图 2)。

2.2 口蹄疫灭活疫苗配制

抗原浓缩液经体积排阻色谱法测定,代入标准曲线计算 146S 浓度,得抗原浓缩液 (O/Mya98) 为 45.49 $\mu\text{g/mL}$, 抗原浓缩液 (AF72) 为 44.08 $\mu\text{g/mL}$ 。利用以上抗原浓缩液配制 3 份疫苗,分别为口蹄疫 O 型灭活疫苗,抗原含量 33.3 $\mu\text{g/mL}$, 口蹄疫 A 型灭活疫苗,抗原含量 22.7 $\mu\text{g/mL}$, 口蹄疫 O 型、A 型二价灭活疫苗,抗原总含量 29.1 $\mu\text{g/mL}$ 。另用 PBS 与 ISA206 油佐剂等体积混合,配制空白对照样。利用以上自制疫苗进行方法学验证。

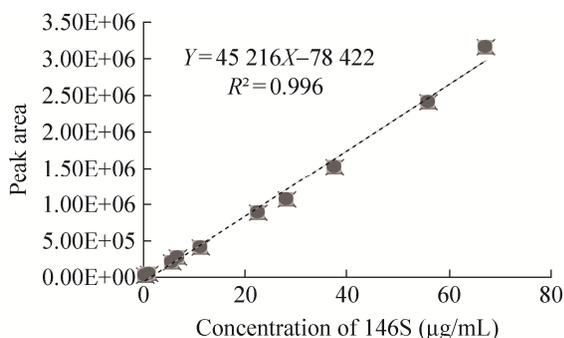


图 1 口蹄疫灭活病毒 (O 型) 146S 抗原定量分析标准曲线
Fig. 1 Calibration curve for qualification of inactivated FMDV 146S antigen (O/Mya98).

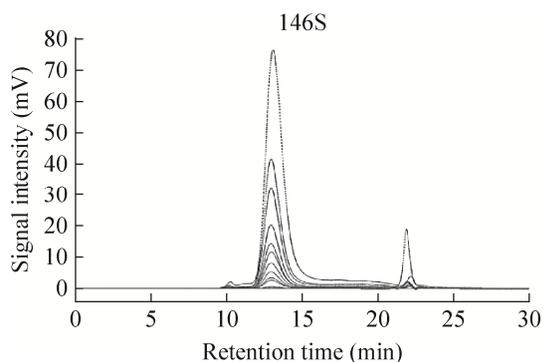


图 2 口蹄疫灭活病毒 (O 型) 146S 抗原纯化样品色谱图
Fig. 2 Chromatograms of pure inactivated FMDV 146S antigen (O/Mya98).

2.3 破乳试剂的确定

比较了 6 种试剂对疫苗的破乳效果 结果显示,使用正己烷、三氯甲烷,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 后不能有效分离油相和水相,其余 4 种破乳试剂静置离心后,以正丁醇、正戊醇破乳水相体积高且澄清,正己醇、正庚醇破乳得到水相体积偏低 (图 3)。色谱检测正丁醇、正戊醇破乳后水相中的 146S 抗原,结果基本一致。本实验选用正戊醇作为破乳试剂。

2.4 重复性和精密度

取口蹄疫 A 型灭活疫苗破乳水相,连续进样 6 次,将数据代入标准曲线计算,结果重复性良好 ($RSD=0.5\%$, $n=6$) (表 1)。取 3 份实验室配制的疫苗分别破乳测定 3 次,每次平行进样 2 针,每次测定间隔 1 周,将数据代入标准曲线计算含量和回收率。结果表明,3 份疫苗的回收率分别为 93.6% ($RSD=2.7\%$, $n=3$)、102.3% ($RSD=2.6\%$, $n=3$)、95.5% ($RSD=5.1\%$, $n=3$) (表 2), 该方法的重复性、精密度均良好,色谱结果见图 4。

2.5 特异性

对空白对照苗、24 h 培养的 BHK-21 细胞、猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (YZ 株) 和猪繁殖与呼吸综合征灭活疫苗 (CH-1a 株) 进行色谱检测 结果显示,在 146S 保留时间 13–14 min 均未见吸收峰 (图 5),因此不会对 146S 峰面积造成干扰,方法的特异性良好。

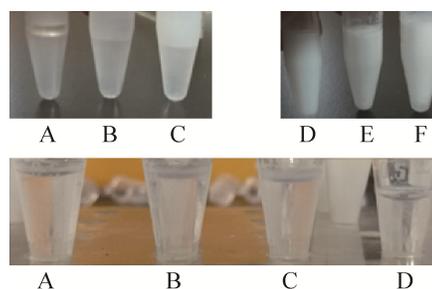


图 3 不同试剂对疫苗的破乳结果

Fig. 3 Results of demulsification of vaccines by different reagents. (A) *n*-butyl alcohol. (B) *n*-pentanol. (C) *n*-hexyl alcohol. (D) *n*-heptanol. (E) *n*-hexane. (F) Chloroform.

表 1 重复性测量结果

Table 1 Results of reproducibility measurement

No. of injection	Retention time (min)	Peak area (mV·min)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Average concentration ($\mu\text{g/mL}$)	RSD ($n=6$) (%)
1	13.61	1 063 447	25.3	25.2	0.5
2	13.61	1 063 149	25.2		
3	13.61	1 060 502	25.2		
4	13.61	1 062 882	25.2		
5	13.61	1 052 052	25.0		
6	13.61	1 052 090	25.0		

表 2 精密度测量结果

Table 2 Results of accuracy measurement

No. of samples	Time point (d)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	Average recovery (%)	RSD ($n=3$) (%)
1	7	32.2	96.7	93.6	2.7
		32.0	96.1		
	14	31.0	93.1		
		30.9	92.7		
	21	30.3	91.0		
		30.6	91.9		
2	7	23.3	102.6	102.3	2.6
		23.3	102.6		
	14	24.1	106.2		
		23.5	103.5		
	21	22.6	99.6		
		22.6	99.6		
3	7	29.4	101.0	95.5	5.1
		29.6	101.7		
	14	27.6	94.8		
		27.4	94.2		
	21	26.5	91.1		
		26.3	90.4		

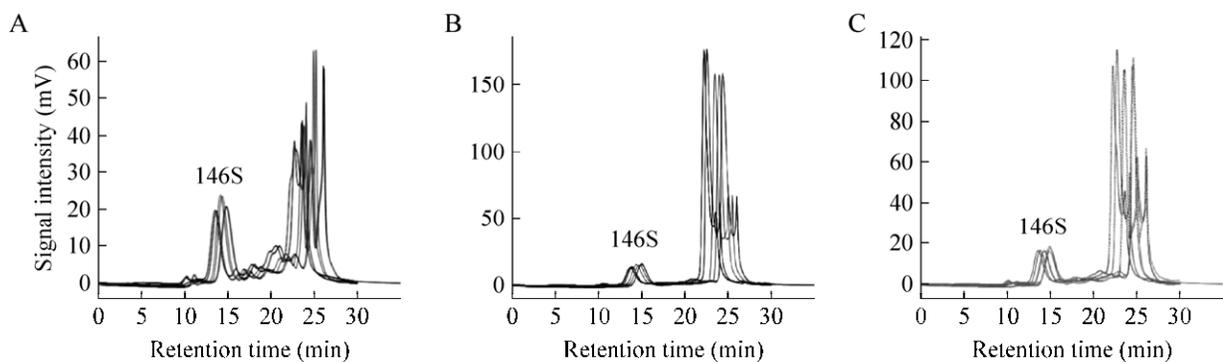


图 4 实验室自制疫苗色谱图

Fig. 4 Chromatograms of vaccines formulated in our lab. (A) Vaccine (Type O). (B) Vaccine (Type A). (C) Vaccine (Type O, Type A).

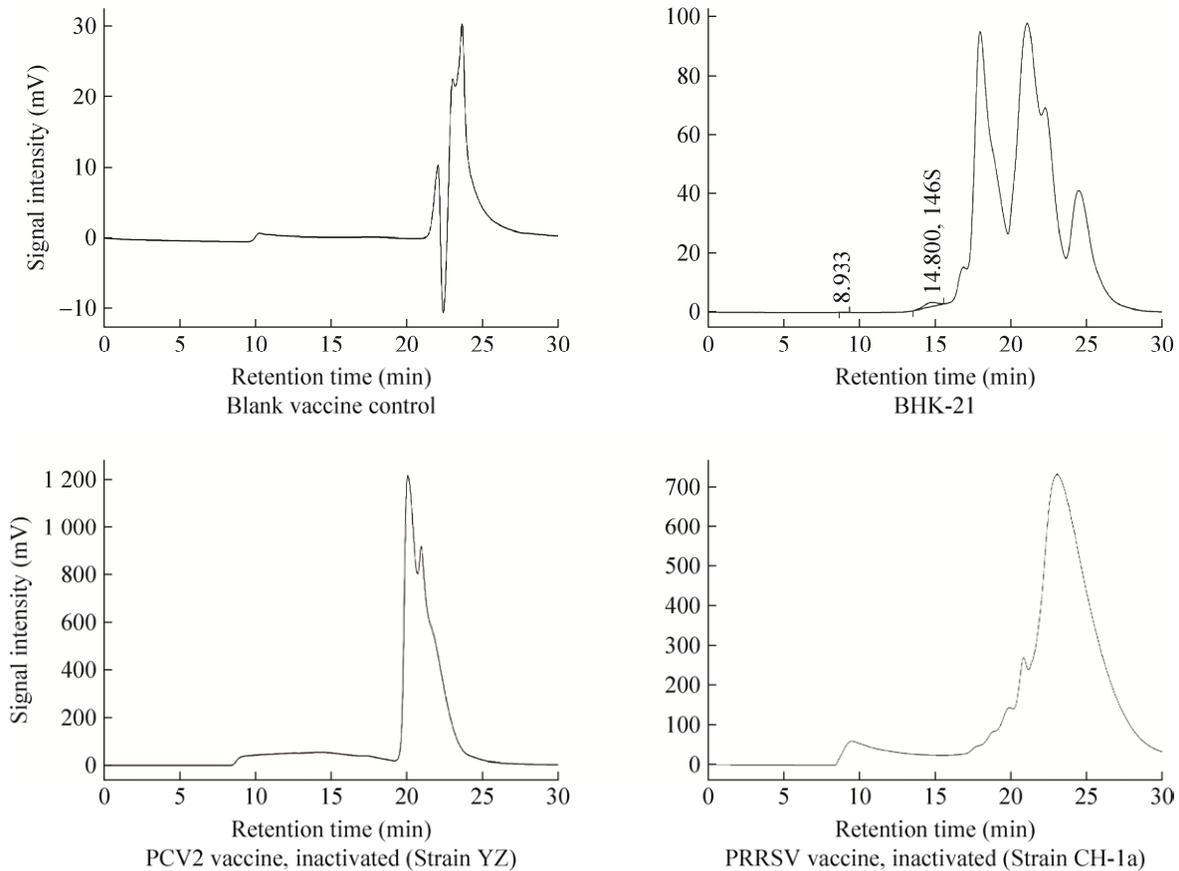


图 5 对照色谱图

Fig. 5 Chromatograms of control samples.

2.6 耐受性试验

通过改变流动相 pH 值和环境温度,考察方法耐受性。TSKgel G4000SW_{XL} 色谱柱 pH 适用范围在 2.5–7.5,且应置于 4–30 ℃。维持 146S 抗原稳定性的最适 pH 值为 7.8。调节流动相 pH 值范围在 6.9–7.5,146S 抗原色谱峰保留时间和峰形一致,考虑到色谱柱耐受性,选用该流动相未经调节的 pH 值 7.2–7.4。为防止 146S 降解,需注意实验室温度不应过高,且仪器样品盘应设定低温进样。

2.7 抗原鉴别

对 3 份疫苗破乳水相的检测结果显示,口蹄疫 O 型灭活疫苗在 O 型抗原 Mya98 株测试卡为阳性结果,口蹄疫 A 型灭活疫苗在 A 型抗原测试卡为阳性结果,口蹄疫 O 型、A 型二价灭活疫苗

在两种测试卡均为阳性结果(图 6)。该抗原测试卡可对口蹄疫灭活疫苗中的 O 型和 A 型抗原进行鉴定。

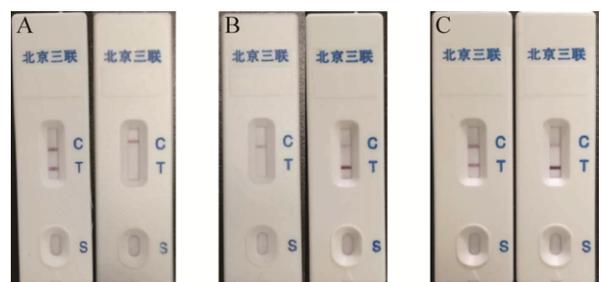


图 6 抗原测试卡检测实验室自制疫苗

Fig. 6 Antigen test results of vaccines formulated in lab. (A) Vaccine (Type O). (B) Vaccine (Type A). (C) Vaccine (Type O, Type A). Note: C means control lines; T means test lines; S means sample well.

2.8 疫苗样品的测定

测定了4家企业各4个批次共16批疫苗样品破乳水相中的抗原含量,结果显示,16批疫苗均能检出146S抗原(图7)。16批样品的色谱结果存在差异,原因与各企业生产工艺不同有关,不

同产品因生产工艺的差别,疫苗中146S的降解产物和杂蛋白含量不同,会对146S色谱峰产生不同程度的影响。将仪器自动积分得到的峰面积代入标准曲线计算,即得抗原含量,效力检验结果(PD₅₀)由企业提供,见表3。

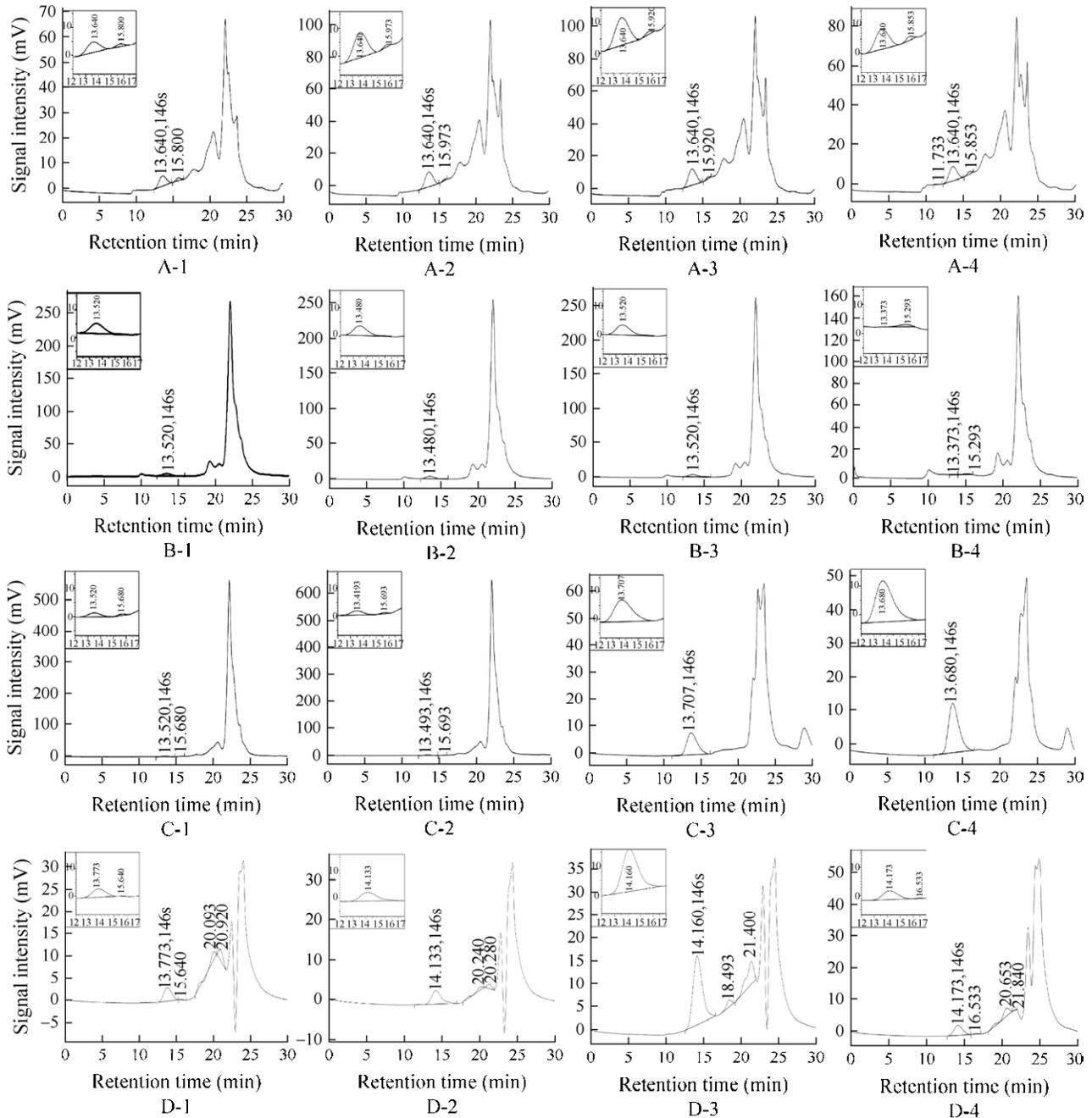


图7 疫苗样品色谱图

Fig. 7 Chromatograms of vaccine samples. (A-D) Manufacturer code. (1-4) Different batches of vaccine.

表 3 疫苗样品测定结果

Table 3 Detection results of vaccine samples

Manufacturer code	No. of vaccine	Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)	PD ₅₀ (The fifty percent of protective dose)
A	1	11.9	13.59
	2	13.6	13.59
	3	14.5	13.97
	4	10.8	13.97
B	1	8.1	15.59
	2	7.7	15.59
	3	7.9	13.59
	4	8.0	13.59
C	1	3.7	9.00
	2	3.9	10.81
	3	6.6	10.81
	4	14.7	13.59
D	1	6.5	15.59
	2	8.3	15.59
	3	18.4	15.59
	4	7.0	10.81

3 讨论

纯度高且稳定的口蹄疫抗原标准品是该方法得以应用的前提,口蹄疫病毒粒子的二十面体结构非常不稳定,在温度高于 56 °C 或 pH 低于 6 的条件下会裂解^[12-14],因此对 146S 抗原的纯化制备工艺要求很高。本实验使用的纯化样品由中国科学院过程工程研究所杨延丽等制备,制得后立即用于检测。色谱条件的确定不仅依赖病毒粒子的特性,还需要考虑色谱柱的耐用范围,本研究使用的 TOSOH TSK_{gel} 色谱柱是目前较为常用的凝胶色谱柱,在后续耐用性研究中,可对同类型其他色谱柱进行考察。在疫苗前处理中,通过比较不同试剂对疫苗的破乳效果,确定了正戊醇为破乳试剂。在部分口蹄疫灭活疫苗的检测中发现,杂质会对 146S 抗原色谱峰产生影响,该问题有望通过改进生产工艺,降低杂蛋白含量、提高抗原稳定性,以及进一步优化样品前处理过程来解决。

本研究初步建立了一种口蹄疫灭活疫苗中 146S 抗原含量检测的液相色谱分析方法。应用该方法能够快速、准确地测定疫苗中有效抗原的含量。通过结合抗原测试卡,可进一步对疫苗中抗原的血清型加以鉴别,以便全面地评价其质量。与传统的蔗糖或氯化铯密度梯度离心法相比,省去了过夜制备密度梯度离心管和长时间的高速离心等复杂的操作过程,能够显著降低时间和人力成本。并且,疫苗破乳后可立即对水相进行检测,有效避免了 146S 抗原的损失,保证了检测结果的准确性和重复性。以上优势使该方法对疫苗生产过程中的质量控制和工艺改进具有重要应用价值,并且对于口蹄疫灭活疫苗的质量评价具有重要意义。相信随着疫苗生产工艺的进步、146S 标准品的成功研制以及检测方法的优化和深入研究,该技术将有望替代本动物免疫攻毒保护试验,成为控制口蹄疫疫苗质量的有效技术手段,在降

低生物安全风险、提高动物福利、节约成本和提高环保效益等方面具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Cui C, Huang LG, Li J, et al. Establishment of chemiluminescent enzyme immunoassay for detecting antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O in swine. *Chin J Biotech*, 2016, 32(11): 1519–1530 (in Chinese).
崔辰, 黄立纲, 李晶, 等. 猪 O 型口蹄疫病毒抗体化学发光酶联免疫检测方法的建立. *生物工程学报*, 2016, 32(11): 1519–1530.
- [2] Commission of Chinese Veterinary Pharmacopeia. *Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. 2015 (3). Beijing: China Agriculture Press, 2016 (in Chinese).
中国兽药典委员会. *中华人民共和国兽药典*. 2015 年版(三部). 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [3] Rweyemamu MM, Umehara O, Giorgi W, et al. Effect of formaldehyde and binary ethyleneimine (BEI) on the integrity of foot and mouth disease virus capsid. *Rev Sci Technol*, 1989, 8(3): 747–764.
- [4] Zhao QZ, Xie QG. Introduction of foot-and-mouth disease vaccine. *Chin J Vet Technol*, 2000, 30(6): 43–44 (in Chinese).
赵启祖, 谢庆阁. 家畜口蹄疫疫苗简介. *中国兽医科技*, 2000, 30(6): 43–44.
- [5] Rodriguez LL, Grubman MJ. Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine*, 2009, 27(S4): D90–D94.
- [6] Spitteler MA, Fernández I, Schabes E, et al. Foot and mouth disease (FMD) virus: quantification of whole virus particles during the vaccine manufacturing process by size exclusion chromatography. *Vaccine*, 2011, 29(41): 7182–7187.
- [7] Shi LG, Zou XQ, Zhu YY, et al. Factors affecting the efficacy of foot-and-mouth disease vaccine. *Chin J Vet Med*, 2013, 49(11): 89–91 (in Chinese).
史兰广, 邹兴启, 朱元源, 等. 影响口蹄疫疫苗效力的因素. *中国兽医杂志*, 2013, 49(11): 89–91.
- [8] Le CT, Grambsch PM, Giebink GS. Quality control and the identification of vaccine responders using ELISA-derived antibody data. *Stat Med*, 2003, 22(18): 2935–2942.
- [9] Li L, Miao HS, Xin AG, et al. Rapid quantification of FMDV 146S antigen by ELISA method. *Chin J Pre Vet Med*, 2008, 30(4): 314–317 (in Chinese).
李乐, 苗海生, 信爱国, 等. ELISA 用于口蹄疫病毒 146S 抗原快速定量的研究. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(4): 314–317.
- [10] Yang YL, Li H, Li ZJ, et al. Size-exclusion HPLC provides a simple, rapid, and versatile alternative method for quality control of vaccines by characterizing the assembly of antigens. *Vaccine*, 2015, 33(9): 1143–1150.
- [11] Vajda J, Weber D, Brekel D, et al. Size distribution analysis of influenza virus particles using size exclusion chromatography. *J Chromatogr A*, 2016, 1465: 117–125.
- [12] Doel TR, Baccarini PJ. Thermal stability of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*, 1981, 70(1): 21–32.
- [13] Brown F, Cartwright B. Dissociation of foot-and-mouth disease virus into its nucleic acid and protein components. *Nature*, 1961, 192(4808): 1163–1164.
- [14] Doel TR, Chong WKT. Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol*, 1982, 73(2): 185–191.

(本文责编 郝丽芳)