

81-83

15960(14)

第11卷第1期
1996年3月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol 11 No. 1
Mar. 1996

采用柱层析法提纯狂犬病毒的研究

顾 鸣 邵益斌[✓] 顾 勤 曾蓉芳

(卫生部上海生物制品研究所, 上海 200051)

关键词 狂犬病毒, 柱层析法

疫苗

R373.9
R392.33

迄今, 分离提纯包膜病毒的方法多采用密度梯度离心法、亲和层析法和等电聚焦法等, 这些方法有一定的优点, 但用在处理量很大的病毒疫苗生产上, 成本费用较大; 另外, 对保持包膜病毒原结构的完整性来说, 也存在一定困难^[1]。自 Vero 传代细胞疫苗的问世之后, WHO 对这类疫苗提出了后处理的要求和有关质量指标^[2]。基于以上情况, 我们选择狂犬病毒为研究材料, 采用超滤浓缩法和柱层析分离法, 按照 WHO 对 Vero-狂犬疫苗的规定指标进行病毒分离纯化和检定的研究, 旨在为今后大规模 Vero 细胞狂犬病毒疫苗的后处理研究提供参考依据。

材料与方 法

1 病毒培养

采用美国 NBS 公司 5 L 细胞反应器和微载体 (Cytodex 1) 培养 Vero 细胞, 以本所自建狂犬固定毒 Vero 细胞适应株 (RFD 株) 为感染毒种^[3], 感染细胞第 5 天后收集病毒悬液。

2 主要指标与测定方法

病毒毒力测定与效力试验均参照《中国生物制品规程一九九〇年版》。残余牛血清含量测定用中国药品检定所试剂盒。微量蛋白质测定按 Lowry 法进行。Vero 细胞残余 DNA 含量测定采用“德国 Boehringer 公司产品”, 方法参照文献^[4]。

3 病毒悬液的分离纯化

从反应器中泵出约 2.5-3 L 病毒悬液, 经低速离心和滤纸过滤去渣后, 用截流分子量 30 万膜的超滤器浓缩 30-50 倍, 并用柱层析缓冲液 (0.01 mol/L pH7.4 PBS) 平衡浓缩样品; 样品经 6×60 cm 大小、内填 Sephacryls-500 层析柱和大小为 3×5 cm、内填 DEAE-Sephadex A50 凝胶层析柱分离, 分离流速 1ml/min; 均收集层析第一峰, 约有 120~170 ml 活病毒成分。留样后, 即用 1:4000β-丙内脂、4℃ 灭活 24 h, 再 37℃ 水解 2 h。

结果与讨论

经浓缩后的 Vero 细胞培养的病毒悬液, 经分子筛层析分离主要有二个峰形, 病毒成分集中在第一峰, 而第二峰主要是杂蛋白成分。离子交换层析主要去除细胞 DNA 与杂蛋白成分。从表 1 结果分析可见, 病毒悬液经一系列后处理分离纯化, 病毒滴度下降不多, 而杂质成分(残

本文于 1995 年 5 月 8 日收到, 9 月 6 日修回

指导老师

余牛血清、细胞 DNA、细胞碎片和培养基成分等)含量明显下降,达到分离纯化的目的,说明这类分离纯化方法对包膜病毒的处理是可行的,尤其是对表面糖基化蛋白损伤可能较小,保证病毒颗粒的完整性。同时,更有意义的是参照 WHO 有关 Vero 细胞狂犬病疫苗的要求,对三批 Vero 细胞微载体培养的活狂犬病毒悬液进行分离纯化和相关指标检定,结果见表 2。

表 1 活病毒分离纯化过程中各项指标情况

Tab 1 The results of active rabies virus purification procedure

样品 sample	病毒滴度 virus titration (logLD ₅₀ /ml)	蛋白质浓度 protein Conc. (mg/ml)	残余牛血清含量 residual calf serum content (IU/ml)	残余 DNA 含量 residual DNA content (pg/ml)	免疫效价 NIH potency (IU/ml)
病毒悬液 virus suspension	6.1	4.8	153.6	—	1.31
澄清后 after clarification	6.0	4.6	153.6	—	—
浓缩后 after concentration	8	240	1228.8	—	—
分子筛层析 gel filtration	7	0.24	2.4	100	3.04
离子交换层析 DEAE- Sephdex	6.84	0.157	0.6	50	2.76
柱介离后 after eluted	—	0.6	4.8	5000	0.94

表 2 三批 Vero 细胞狂犬病毒悬液纯化情况

Tab 2 The results of three lots rabies virus suspension treated by chromatography

批号 lot No	病毒滴度 virus titration (logLD ₅₀ /ml)	蛋白质浓度 protein conc. (mg/ml)	残余牛血清含量 residual calf serum content (IU/ml)	残余 DNA 含量 residual DNA content (pg/ml)	免疫效价 NIH potency (IU/ml)
A	6.75	0.103	0.3	80	2.36
B	7	0.173	0.6	100	3.12
C	6.84	0.19	0.15	80	2.7
均值 mean	6.86	0.154	0.35	86.7	2.72

可见几项指标的平均值均达到 WHO 对传代细胞疫苗的有关要求(残余牛血清含量 $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ 、残余细胞 DNA 含量 $\leq 100 \text{ pg/dose/ml}$ 、免疫效价 $\geq 2.5 \text{ IU/dose/ml}$), 这为今后大规模 Vero 细胞培养的狂犬疫苗的生产提供了有价值的参考资料,从规模制备纯病毒和保持病毒颗粒成分的完整性以及设备资金投入的角度来看,柱层析法分离纯化病毒可能是一种简易、低成本和有效的方法^[5]。

参 考 文 献

- 1 Alan J Crooks, John M Lee, John R Stephenson, *et al.* The purification of Alphavirus virion and subviral particles using ultrafiltration and gel exclusion chromatography. *Analy Biochem*, 1986;152:295-300
- 2 Turner G. S. Vero 细胞人用狂犬病疫苗生产和检定手册. WHO 生物制品秘书处
- 3 曾蓉芳,陈阿根,张英等. 狂犬病固定毒 Vero 细胞适应株的建立. *病毒学杂志*, 1990, 3, 285
- 4 陈宇光 AGMr (Hind III)-I 高度重复顺序的分子克隆及初步应用. 卫生部上海生物制品研究所 1992-1993 学术论文选编
- 5 A L Van Wezel, G Van Steenis, Ch A Hannik, *et al.* New approach to the production of concentrated and purified inactivated polio and rabies tissue culture vaccine. *Develop Biol Standard*, 1978;41:159-162

The Concentration and Purification of Rabies Virus Suspension Using Ultrafiltration and Column Chromatography

Gu Ming Zhao Yibin Gu Qin *et al.*

(Shanghai Institute of Biological Products, Shanghai 200051)

The active Rabies virus suspension was cultured in microcarrier culture of five litres bioreactor. After virus suspension was harvested from microcarrier culture, the process comprised clarification by centrifugation and filtration, concentration by ultrafiltration, purification by gel filtration. The virus was inactivated with 1:4000 β -propiolactone at 4°C for 24 hours.

The results indicated that infective titer of the rabies virus was not declined clearly, that residual calf serum protein, residual DNA content and antigenic values (NIH test) in all purified virus samples were conformed to the WHO standards.

The research described in this paper indicated that isolating, purifying method of active rabies virus was effective. It provided some basic information which could be useful in further for the large-scale production of inactivated rabies vaccines.

Key words Rabies Virus, Column chromatography