维普资讯 http://www.cqvip.com

第13卷第3期 中国病毒学 Vol.13 No.3
1998年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1998

大规模区带离心纯化 Vero 细胞乙脑疫苗*

石慧颖 丁志芬 赵 敏 庞成华 杨抗抗 李 荆

（卫生部北京生物制品研究所，北京 100024）

摘 要 本文报道一种适合疫苗生产的大规模纯化 Vero 细胞乙脑疫苗的方法。原疫苗经适当浓缩和去除 DNA 处理后，用不连续蔗糖梯度（36%和60%）。32 600 g，速率区带离心 4 h。纯化后疫苗的效力比中国参考疫苗高出 6 倍以上，补体结合抗原比中国参考疫苗高 4～8 倍。总蛋白含量低于 30 μg/mL，牛血清含量降至 0.5 μg/mL 以下，细胞残余 DNA 低于 100 pg/0.5 mL。用此法连续制备三批纯化疫苗，其纯度和效力均高于日本鼠脑纯化疫苗。此法对于制备其它纯化 Vero 细胞疫苗也具有一定的参考意义。

关键词 区带离心，Vero 细胞，纯化乙脑疫苗

目前我国使用的是未经纯化的地鼠肾细胞乙脑疫苗，国外普遍使用的是将感染了乙脑病毒的小鼠脑进行研磨纯化的乙脑疫苗。Vero 细胞是非洲绿猴肾细胞，法国已经用该细胞成功地生产了脊髓灰质炎疫苗和狂犬病疫苗，效果和安全性都很好[1]。而用 Vero 细胞制备纯化乙脑疫苗国内外尚无报道。本文报道用蔗糖速率区带离心大规模纯化 Vero 细胞乙脑疫苗的方法。

材料和方法

1 仪器

卷筒式滤器，Gelman Sciences；0.6 μm 滤膜，Millipore 公司。

中空纤维超滤器 Amicon DC－10LA，截留分子为 100 000 MW。

日立 20PR－52D 高速离心机及日立 55P－72D 超速离心机，RPZ－35T 区带转头。

2 试剂

硫酸鱼精蛋白为 Sigma 公司产品。

蔗糖为北京化工厂产品。

3 疫苗

按庞成华等 1995 年报道[2]的方法用 15 L 转瓶制备疫苗，超滤浓缩后再行硫酸鱼精蛋白沉淀处理备用。

4 区带离心

当转速稳定在 3000 r/min 时，先从边孔输入 36%（W/W）蔗糖至完全充满转头，再依次从中心孔输入 1 000 mL 浓缩疫苗和 200 mL PBS，最后从边缘孔再推进 60%（W/W）蔗糖 100 mL。于 4 ℃、32 600 g 离心 4 h。收样时从边孔推入 60%（W/W）蔗糖，控制流速在 30 mL/min，逐管收取区带组分，根据各组分抗原补体结合效价（简称 CF）和杂蛋白含量合并抗原活性组分，经超滤脱糖和除菌过滤，加保护剂冻干即为纯化疫苗。

收稿日期：1997－09－09，修回日期：1997－11－10

* 本课题为国家"八五"科技攻关项目

维普资讯 http://www.cqvip.com

5　补体结合抗原测定

采用总体积 0.6 mL 方法[3],以乙脑特异性抗原和常规地鼠肾细胞乙脑灭活疫苗为阳性对照。

6　疫苗效力检定

分别用小鼠攻击法[4]和蚀斑减少中和试验(简称 PRNT)[5]检定疫苗效力。

7　疫苗中总蛋白测定

采用 Lowry 法。

8　疫苗中残余牛血清检测

用反向间接血凝抑制试验方法,所用试剂为卫生部中国药品生物制品检定所提供。

9　疫苗中残余细胞 DNA 检测

按石慧颖等报道的方法[6]检测。浓缩疫苗及粗制疫苗点样前需经去杂蛋白处理,即经蛋白酶 K 消化后、再用酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提三次,水相在超净台内吹 0.5 h 即可和纯化疫苗一起点样。

10　蔗糖浓度测定

用蔗糖折射仪直接测定。

11　疫苗中主要成份分析

用 FPLC(Parmacia)分析。

结　果

1　蔗糖速率区带离心最佳条件的确立

在实验研究中,我们比较了影响病毒和杂蛋白分布的两种主要因素——离心时间和蔗糖梯度。首先在 36% 蔗糖浓度下以 32 600 g 分别离心 4 h 和 13 h,结果如图 1。离心 4 h 病毒集中分布而 13 h 病毒比较分散,因此超离 4 h 更有利于病毒的分离;同样以 32 600 g,分别在 36% 的蔗糖单一梯度中和在 36% ~ 60% 的蔗糖梯度中超离心 4 h,结果如图 2 和图 3。前者部分病毒峰与杂蛋白峰有重叠,而且病毒峰有拖尾;后者病毒峰位于 33% ~ 42% 蔗糖浓度的电泳带上,而杂蛋白在蔗糖 25% 的位置已降至最低点,病毒与杂蛋白完全分离开来,因此超离条件确立为在 36% ~ 60% 不连续蔗糖梯度中、32 600 g 离心 4 h。

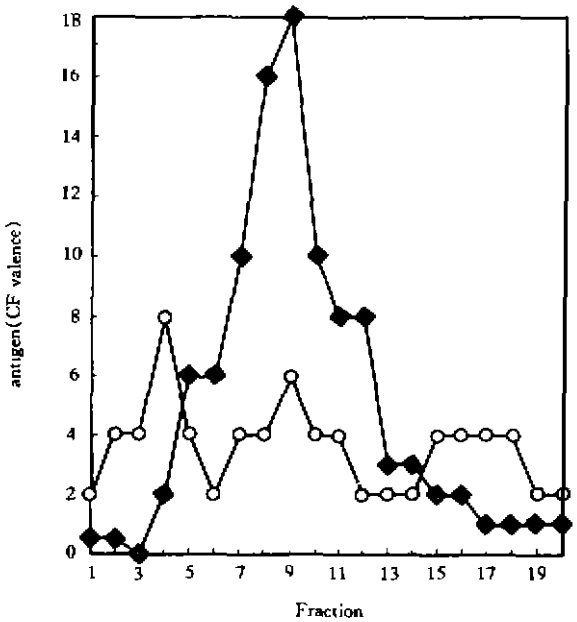

图 1　超离不同时间病毒分布图

Fig. 1　Profiles of virus in different runtime in ultracentrifugation

—◆—4 h　—○—13 h

维普资讯 http://www.cqvip.com

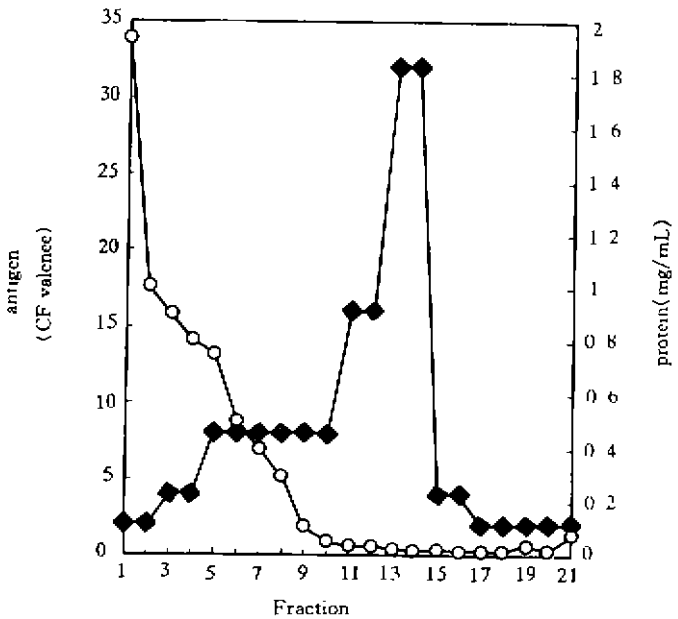

图2 乙脑疫苗在单一蔗糖梯度36%中超离组分图

Fig 2 Profiles of zonal centrifugation in only one sucrose gradient 36%

—◆—antigen —○—protein

2 纯化乙脑疫苗的效力

用此离心条件连续纯化三批 Vero 细胞乙脑疫苗，分别测定其补结效价，小鼠中和抗体水平以及疫苗效力，同时以中国疫苗参考品和日本疫苗参考品作对照，结果如表1。纯化疫苗的补结抗原效价分别为1:16，1:32，1:32，日本和中国参考疫苗分别为1:2和1:4；纯化疫苗的半数有效量(ID_{50})分别为0.00019 mL、0.00001 mL、0.0000083 mL，除一批效力稍低外，其余两批效力分别比中国参考疫苗高出6.2倍和7.5倍；中和抗体水平也均高于两种参考疫苗。

3 纯化疫苗中总蛋白、残余牛血清细胞及残余 DNA 测定

为检查蔗糖速率区带离心的纯化效果，上述三批冻干纯化乙脑疫苗，加保护剂前取样检测总蛋白含量；成品进行残余牛血清及残余细胞 DNA 检测，结果如表2。原疫苗中总蛋白含量为1.5 mg/mL，浓缩后增至10.6 mg/mL；而纯化后三批疫苗的总蛋白含量分别为25.0 μg/mL、25.8 μg/mL 和28.5 μg/mL；浓缩疫苗中残余牛血清含量大于4.7 μg/mL，纯化后降至低于0.5 μg/mL；而细胞残余 DNA 在纯化前后分别为 10^5～10^6 pg/0.5 mL 和低于100 pg/0.5 mL。

表1 纯化 Vero 细胞乙脑疫苗的效力

Table 1 The potency of purifed Vero cell JE vaccine

疫苗批号 Batches of vaccine	补体结合效价 CF valence	效力 Potency		回收率 Recovery of antigen (CF)
		ID50(mL)	PRNT	
94－23	1:16	0.00019	2.12	13.9%
94－24	1:32	0.00001	2.04	27.8%
94－25	1:32	0.0000083	2.14	27.8%
Crude vaccine	1:8	－	－	－
China control	1:4	0.000062	1.9	－
Japan control	1:2	0.014	1.37	－

4 FPLC 分析疫苗纯度

Vero 细胞浓缩乙脑疫苗中成份较复杂，不仅含有乙脑病毒抗原成份，而且含有较多的牛血清蛋白、人白蛋白和其他杂质蛋白。其 FPLC 图谱如图4a，共有7个峰，峰1分子量最大，而且有抗原活性，故为乙脑病毒峰，其他峰均无抗原活性。图4b是纯化疫苗的 FPLC 图谱，只有一个抗原活性峰，纯度达97%。

维普资讯 http://www.cqvip.com

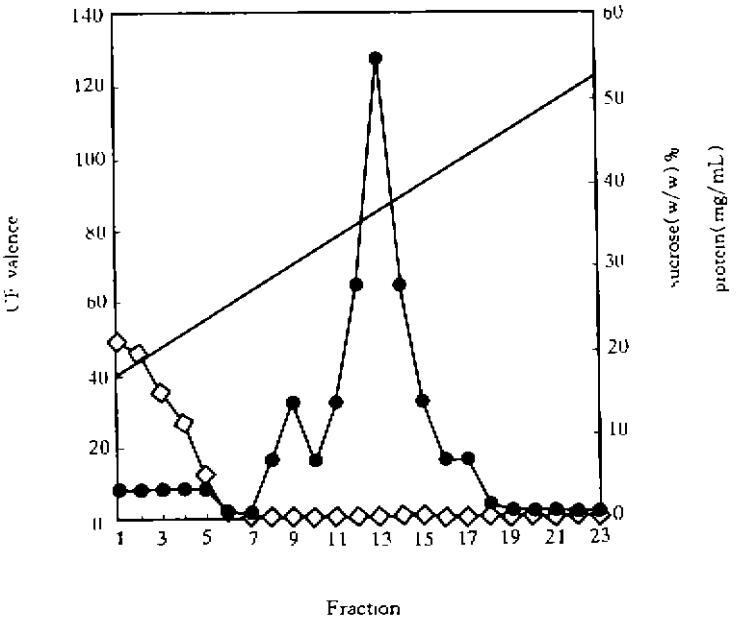

图 3　乙脑疫苗在蔗糖梯度 36% - 60% 超离组分图谱

Fig. 3　Profiles of zonal centrifugation of JE vaccine in sucrose gradients 36% - 60%

—●—antigen　—◆—protein　——线性(sucrose)

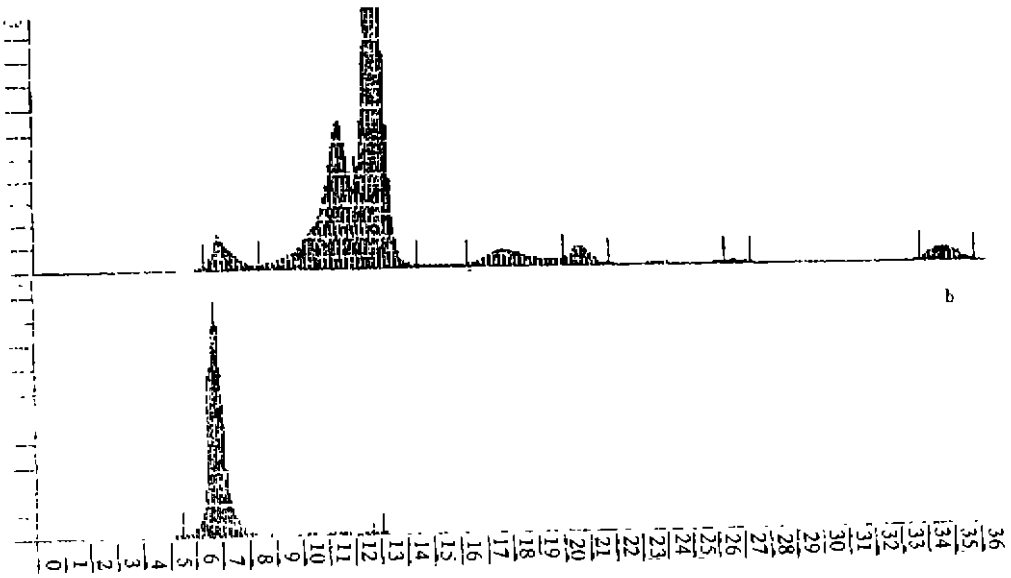

图 4　疫苗及人白蛋白 FPLC 分析图谱：图 a 为浓缩疫苗，图 b 为纯化疫苗

Fig. 4　Analysis of profiles of FPLC and JE Vaccines

a - concentrited JE vaccine; b - purified JE vaccine

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 纯化乙脑疫苗纯度检定

Table 2 Test of the purity of JE vaccine after ultracentrifugation

疫苗批号 Vaccine lot	总蛋白 Total protein (μg/mL)	残余牛血清 Residual calf serum (μg/mL)	细胞残余 DNA Residual cell DNA (pg/0.5mL)
94-23	25.0	<0.5	<100
94-24	25.8	<0.5	<100
94-25	28.5	<0.5	<100
Crude vaccine	1 500*	1.3	1000
Concentrated vaccine	10 600**	>4.7	100 000-1 000 000
Japan JE vaccine	80***	-	-

* 三批粗疫苗测定结果的平均值 * Average of 3 bathes of vaccine

** 三批浓缩疫苗测定结果的平均值 ** Average of 3 bathes of concentrated vaccine

*** 日本纯化乙脑疫苗规程要求 *** The requirement of procedure for purified Japan JE vaccine

讨 论

以Vero细胞为基质制备乙脑灭活疫苗，主要问题是去除疫苗中的杂蛋白和Vero细胞DNA。细胞DNA可以通过硫酸鱼精蛋白沉淀将其降至5 pg/100 μL。蔗糖速率区带离心的目的是去除杂蛋白。从FPLC分析可以看出，疫苗纯化前杂质蛋白含量很高，而通过超离心纯化有效去除了杂蛋白。

日本纯化乙脑疫苗纯度指标之一是总氮含量低于80 μg/mL[7]，本法纯化的Vero细胞乙脑疫苗中总蛋白含量低于30 μg/mL，残余牛血清含量低于0.5 μg/mL。

疫苗中的抗原含量是用补体结合实验、蚀斑减少中和试验和攻击法效力试验同时测定的。三种检定方法各有优缺点，但反映的规律基本一致。三批纯化疫苗除一批稍差外，其它两批效力均优于中国和日本参考疫苗。日本乙脑疫苗对于乙脑病毒P_3株攻击的保护力较差。

本法超离心一次可上样1 000 mL，全病毒回收可达27.8%。对于大规模生产以传代细胞为基质的疫苗，用一步蔗糖速率区带离心法纯化病毒液，既简便又快速，是十分可取的方法。

参 考 文 献

1 Montagnon B J. Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: A reality for Vero cell line. Dev Biol Stand, 1989, 70:27

2 庞成华，石慧颖，常振彦等. 应用微载体Vero细胞制备流行性乙型脑炎灭活疫苗最适条件的研究. 中国生物制品学杂志, 1993, 6(1):170

3 杜 平. 医用实验病毒学. 上海微生物学会, 1982 65

4 中华人民共和国卫生部. 中国生物制品规程 IV. 中国人口出版社, 1979.2~03

5 中华人民共和国卫生部. 生物制品规程, 1995. 109

6 石慧颖，刘晓琳，丁志芬. 应用光敏生物素探针检测Vero细胞乙脑疫苗中细胞残余DNA. 中国生物制品学杂志, 1993, 6(4):175

7 细菌制剤协会. 最新予防接種の知識. 平成2年7月18日発行.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Large-Scale Purification of Inactivated Japanese Encephalitis Vaccine from Vero Cells by Zonal Centrifugation

Shi Huiying Ding Zhifen Zhao Min *et al*.

(*National Vaccine and Serum Institute, Beijing* 100024)

Abstract Japanese Encephalitis (JE) Vaccine in Vero cell can be easily purified by zonal centrifugation at non-continuous sucrose gradients (36% and 60%), 32 600 g for 4 h. The calf serum protein and other nonviral proteins in the vaccine were almost separated from the JE virus. The residual calf serum protein was less than 0.5 μg/mL, and the total protein was less than 30 μg/mL. The residual Vero cell DNA in the vaccine was less than 100 pg/0.5 mL. The titer of purified Japanese Encephalitis vaccine is six times higher than China control vaccine. This method is recommended as an available method to purify JE vaccine from Vero cell in large-scale because it is simple, rapid and inexpensive.

Key words Zonal centrifugation, Vero cell, Purified Japanese Encephalities vaccine