维普资讯 http://www.cqvip.com

第15卷第3期 中国病毒学 Vol.15 No.3
2000年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 2000

226-231 (4) R512.4 03

脊髓灰质炎减毒活疫苗的高效纯化及特性研究

廖国阳[1]，姜述德[1]，郑从义[2*]，李卫东[1]，王明秀[1]，陈光武[1]，王燕[1]

[1](中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学所，昆明 650107)
[2](武汉大学中国典型培养物保藏中心，武汉 430072)

摘要：应用 Q-Sepharose Fast Flow 对 Vero 细胞基质制备的 I 型口服脊髓灰质炎减毒活疫苗悬液进行纯化。病毒液经滤过澄清和超滤浓缩，获得 85% 的病毒感染性滴度回收率，而经 Q-Sepharose F.F.纯化的病毒悬液，病毒感染性滴度回收率达 100%。纯化后的病毒液用 α-^{32}P dATP 标记 DNA 探针膜杂交法测定，宿主 Vero 细胞基质 DNA 残余含量远低于 100 pg/剂量的标准；rct/40 特征、病毒形态及病毒衣壳蛋白组份等生物学性状无显著变化。研究结果提示，Q-Sepharose F.F.是 Vero 细胞制备口服脊髓灰质炎减毒疫苗的理想纯化材料。

关键词：脊髓灰质炎减毒活疫苗；凝胶柱层析；高效纯化
中图分类号：Q939.4，R512.4 **文献标识码**：A **文章编号**：1003－5125(2000)03－0226－06

传代细胞系作为病毒宿主用于生产病毒疫苗开创了采用新技术制备疫苗的极佳途径，使病毒疫苗的工业化生产成为可能。大规模地培养传代细胞系对于增加病毒产量、提高病毒疫苗质量和节约实验性动物资源具有极其重要的现实意义。Vero 细胞是一株来源于非洲绿猴肾的传代细胞系，用于扩增脊髓灰质炎病毒具有病毒滴度高、无外源性因子污染的特点[1]，并可利用微载体培养大规模生产疫苗[2]。然而，Vero 细胞可能带有致肿瘤基因而具有潜在的致肿瘤性[3]，因而在生产纯化口服脊髓灰质炎减毒活疫苗时，除获得高的病毒感染性回收率外，还需要将其 Vero 细胞基质 DNA 残余含量消除到 100 pg/剂量以下[4]。WHO(1990)推荐使用凝胶过滤和 DEAE-Sephadex A_{50}纯化 Vero 细胞增殖的脊髓灰质炎病毒液，但感染性病毒回收率不高[5]。

近年来，随着材料科学技术的发展，已将离子交换基团交联到凝胶基架上制成了同时具有分子筛和离子交换双重功能的新型凝胶，如 Q-Sepharose F.F.等。本文采用 Q-Sepharose F.F.纯化 Vero 细胞制备的脊髓灰质炎病毒，并对纯化病毒的生物学特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及病毒增殖

Vero 细胞系由 ATCC 惠赠，采用含 10% 牛血清的 MEM 培养基培养传代。

I 型脊髓灰质炎病毒 Sabin 株来自 WHO。病毒以 0.01 MOI 接种于 Vero 细胞(154 代)单层，于 33 ℃培养

收稿日期：1999－04－21，修回日期：1999－10－21
作者简介：廖国阳(1960 年－)，男，博士生
* 联系作者：郑从义(1952 年－)，男，副教授，主要从事病毒与细胞关系的研究

维普资讯 http://www.cqvip.com

30－48 h,当 CPE 达＋＋＋～＋＋＋＋时收获病毒。

1.2 病毒悬液澄清、浓缩

将孔径 0.6 μm 的 Millipore 筒式滤器(U.S.A)与孔径 0.2 μm 的 Sartorius 筒式滤器(Germeny)串连在一起,高压灭菌。收获病毒液在 Millipore 蠕动泵驱使下,于筒式滤器正压过滤。然后病毒滤液经装有 10 万分子量孔径 PTHK 滤膜的 Pellicon Casette System (U.S.A)循环浓缩 100－200 倍。

1.3 病毒液纯化[6]

Q-sepharose F.F.(Pharmacia)凝胶用 40 mmol/L PBS(pH7.0)反复漂洗。取直径 1.5 cm,长 60 cm 层析柱(Bio Rad)装入滤胶,使柱床体积达 20 mL,接上 Econ 层析系统(Bio Rad)。待层析柱凝胶表面液体流尽后,将浓缩病毒液加到凝胶表面,启动层析系统,流速 0.4 mL/min,按每流份 2 mL 自动收集流出液,作其指标的分析测定。

1.4 病毒滴定

常规制备 Hep-2 细胞悬液,浓度为 1×10^5/mL,接种 96 孔微量板,0.1 mL/孔,培养 4－6 h 后,接种 10 倍稀释的病毒样品,每个稀释度接种 8 孔,留 2 孔作为细胞对照。测定板于 33 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养,于第 3、7 d 观察记录 Hep-2 细胞病变孔数,并按 Reed-Munch 法计算 $logTCID_{50}$/mL。

1.5 残留细胞基质 DNA 测定

残留 Vero 细胞基质 DNA 按 Janes 的方法测定[7]。即以 Vero 细胞标准 DNA(本室制备)为对照,用 α-^{32}P dATP 标记 DNA(北京亚辉生物工程公司)作为探针,膜斑点杂交,放射自显影测定斑点黑度值,或将杂交好的纤维膜沿斑点剪下,放入离心管,并加入非水溶性液体闪烁液,用 Beckman 液体闪烁仪测定 cpm 值。

1.6 纯化病毒的致肿瘤性试验

供试小鼠为 18－20 克昆明种小白鼠,每组 8 只,雌雄各半,试验前经抗小鼠胸腺血清(ATS)处理,于小鼠颈背部皮下接种 0.1 mL 纯化病毒悬液,并以接种 HeLa 细胞为阳性对照,KMB17 细胞生产的 I 型脊髓灰质炎病毒液体疫苗为阴性对照。接种量均为 100 免疫剂量。

1.7 rct/40 特征

供试材料为 Poliovirus I so＋2/WHO 疫苗对照株,Brunhold 野毒株,Q-Sepharose F.F.纯化 I 型 Sabin 株病毒悬液。其中纯化病毒液及疫苗对照株于 40 ℃ 培养条件接种 10^{-1}－10^{-4}稀释度、37 ℃ 培养条件用 10^{-5}－10^{-8}稀释度;野毒株两种温度均接种 10^{-5}－10^{-8}稀释度。于第 3、7 d 观察记录 Hep-2 细胞病变情况。

1.8 病毒衣壳蛋白电泳

纯化后的病毒悬液用 CsCl 密度梯度离心 2 次,收集实心颗粒病毒带,透析去除 CsCl,加入 SDS-PAGE 样品缓冲液,煮沸 3 min,用 15%SDS-PAGE 分离胶,4 ℃、100 V 电泳,考马斯亮兰染色,脱色液脱色。

1.9 纯化病毒的电镜观察

纯化病毒液滴加铜网,2%磷钨酸(pH6.3)负染 3 min,干燥后电镜观察照相。

2 结果

2.1 病毒纯化效果

I 型脊髓灰质炎病毒 Sabin I 株用 Vero 细胞大量增殖,经收获、澄清及浓缩处理后病毒液体积缩小,感染滴度增大,感染性回收率为 85.6%,结果见表 1。

当浓缩病毒液经 Q-Sepharose F.F.进一步纯化后,病毒感染性回收率可达 100%。

2.2 残留细胞基质 DNA 分布

I 型脊髓灰质炎病毒浓缩液经 Q-Sepharose F.F.层析,分别用 40 mmol/L PBS(pH7.0)和 1 mol/L NaCl 洗脱,用 DNA 斑点杂交试验测定层析 28 流份 (2 mL/份) 的 DNA 含量,结果如图 1 所示。图 1 的结果显示,B_1－D_3 流份为病毒洗脱峰(第一洗脱峰),均无残余细胞质

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 Poliovirus Sabin I收获、澄清及浓缩处理后病毒感染性回收率

Table 1 The recovery rate of poliovirus after harvest, clarification and concentration

Type	Fraction	Volume (mL)	Titre (log $TCID_{50}$/mL)	Recovery(%) Step	Total
Sabin I	A	120,000	8.250	–	100
	B	150,000	8.125	93.7	93.7
	C	770	10.375	91.3	85.6

A: harvest B: clarification C: concentration

DNA存在，而D_4-E_2的Vero细胞基质残留DNA洗脱峰(第二洗脱峰)的确存在残余DNA。因此，Q-Sepharose F.F.是纯化脊髓灰质炎病毒的极佳材料。

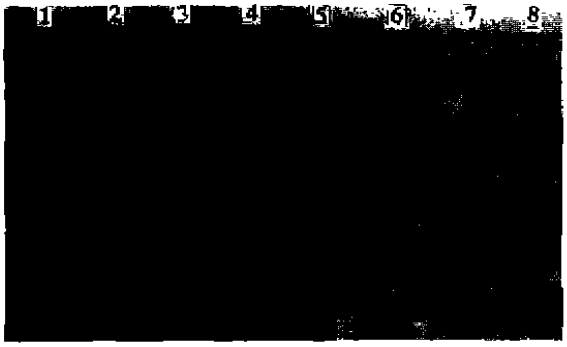

图1 Q-Sepharose F.F.纯化Poliovirus Sabin株连续层析流份DNA斑点杂交图

Fig. 1 DNA Dot blot hybridization pattern for continuous fractions of Poliovirus Sabin I on Sepharose F.F.

A1-8: DNA standard from vero cells (500 pg, 250 pg, 100 pg, 50 pg, 25 pg, 10 pg, 5 pg, 1 pg); B1-E4: DNA distribution of continuous elution fraction; E5: Negative control; E6-8: Positive control

2.3 纯化病毒的生物学性状

2.3.1 rct/40特征

测定结果显示，I型脊髓灰质炎病毒Sabin疫苗株对照组在37℃/40℃滴度值为6.75(T^-株)，Brunhold强毒株对照组在37℃/40℃滴度值仅0.66<1.0(T^+株)，试验成立。测得经Q-Sepharose F.F.纯化的I型脊髓灰质炎病毒Sabin株的37℃/40℃滴度值为6.5，与Sabin与疫苗株的滴度值(6.75)相近，故判定纯化Sabin株为T^-株(表2)。

表2 Q-Sepharose F.F.纯化Sabin I型病毒rct/40特征

Table 2 rct/40 results of purified type I poliovirus Sabin strain

Samples	$logTCID_{50}$/mL 37℃	$logTCID_{50}$/mL 40℃	37℃/40℃	Character
Sabin 1	8.25	1.5	6.75	T^-
Brunhold	8.33	7.67	0.66<1.0	T^+
Purified Sabin 1	8.0	1.5	6.5	T^-

2.3.2 病毒形态学

电镜观察表明：经Q-Sepharose F.F.层析纯化的脊髓灰质炎Sabin 1株病毒颗粒具有典型的Polio病毒形态特征，病毒颗粒清晰可见(图2.Q)，且同纯化前(图2.S)的病毒形态完全一样。说明Q-Sepharose F.F.纯化对病毒形态不会产生影响。

维普资讯 http://www.cqvip.com

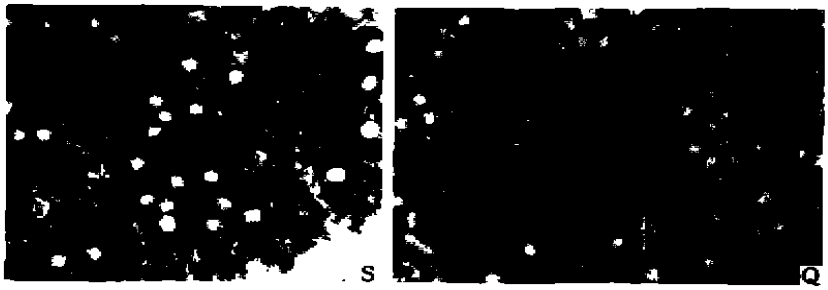

图2　Q-Sepharose F.F.纯化的Sabin 1株病毒电镜照片(×50 000)

Fig.2　The EM photo of poliovirus Sabin I purified by Q-Sepharose F.F.(×50 000)

S:Concetrated Poliovirus (×50 000), Q:Poliovirus purified on Q-Sepharose F.F.(×50 000)

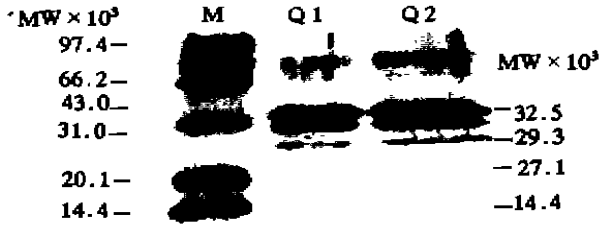

图3　I型Sabin株病毒衣壳蛋白电泳图

Fig.3　SDS-PAGE electrophoresis of capsid protein of Sabin I virus

M:marker MW (Da), Q1: Poliovirus Sabin I before purification, Q2: Poliovirus Sabin I purified by Q-Sepharose F.F.

2.3.3　病毒衣壳蛋白电泳图谱

将Q-Sepharose F.F.纯化前后的I型脊髓灰质炎病毒Sabin株制备样品,用SDS-PAGE电泳分析病毒衣壳的蛋白分布。电泳图谱呈现4条分子量大小不等的泳带(图3。Q1、Q2),其分子量正好与I型脊髓灰质炎病毒VP1、VP2、VP3、VP4蛋白组份的分子量相近。证明采用Q-Sepharose F.F.纯化I型脊髓灰质炎病毒不会对病毒颗粒的衣壳蛋白结构造成任何损伤。

2.3.4　纯化病毒的致肿瘤原性

试验结果表明(表3),Q-Sepharose F.F.纯化的I型脊髓灰质炎病毒液无任何致肿瘤原性,与用人二倍体细胞系(KMB17)生产的疫苗相比,其品质无本质上的区别。

3　讨论

Q-Sepharose F.F. 是一种改进的凝胶,葡聚糖纤维成束交联增强了机械强度、容许高流

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3 纯化I型Sabin株病毒的小鼠致肿瘤性试验结果

Table 3 Tumorigenicity of purified poliovirus suspension in mice

Samples	No. of Mouse	No. of Positive Mouse	Positive Rate (%)
HeLa cell	8	7	87.5
Sabin I from KMB17 cells	8	0	0
Purified Sabin I from Vero cells	8	0	0

速，且对离子强度和pH变化不敏感，无特异性吸附作用[8]。本文用同一根层析柱经1 mol/L NaCl和1 mol/L NaOH再生处理后，重复纯化Sabin I型病毒液5次，柱床体积无变化，病毒回收率稳定为100%。回收率稳定的一个重要因素是Q-Sepharose F.F.的高机械强度使得层析纯化过程中凝胶孔径无变化，保证了分子量达6.8×10^6 Da的poliovirus顺利通过。从Q-Sepharose F.F.纯化Sabin I型病毒的检测结果可看出，病毒主要存在于40 mmol/L PBS(pH 7.0)洗脱峰，残余DNA存在于1 mol/L NaCl洗脱峰中。此结果的解释可能与两种物质等电点不同有关，有感染活性的polivirus (A-form)pI为7.0，DNA的pI是2.0－2.5。在中性溶液中，病毒净电荷为零，不与离子交换柱吸附，而DNA带有极强负电荷易吸附到离子交换剂上，只有在高离子强度洗脱条件下，DNA才被洗脱下来[9]。

传代细胞因染色体异型和高代次会呈现致肿瘤性，使得人们对DNA潜在的致肿瘤性产生疑虑，障碍了利用Vero细胞作为病毒疫苗的细胞基质。近年来，由于分子生物学及遗传学研究不断深入。已经对DNA的致肿瘤性有了新的认识，大量试验证明，只有是完整细胞和从致肿瘤病毒中提取的核酸能导致肿瘤的产生[10,11]。而从高度致肿瘤细胞获得的DNA在体内不致肿瘤，仅可能引起DNA相关基因编码蛋白质的表达[12,13]。此外，体内存在抗自身肿瘤的防御系统，每天约可清除死亡细胞释放到体内10 pg的原癌基因。从最坏情况推测，假如人体每天死亡10^9细胞中，每个细胞含有1 kb原癌基因，那么1 ng细胞DNA含有100拷贝活性癌基因导致转化的可能性仅占10^{-9}。WHO规程中传代细胞制备的生物制品残余细胞基质DNA限量为100 pg/剂量，其中含有1拷贝基因组癌基因仅相当于0.5×10^{-10}致肿瘤剂量。因此，接受Vero细胞制备OPV是安全的。但由于肿瘤的发生机理尚没有阐明和某些未知因子可能有害，在利用Vero细胞制备OPV疫苗中，仍需要进行后处理纯化，以除去细胞基质DNA。本研究采用Q-Sepharose F.F.纯化的I型脊髓灰质炎Sabin株病毒悬液比活性增加，细胞基质DNA低于100 pg/剂量。试验中以100个免疫剂量的纯化病毒液注射免疫抑制小鼠，连续观察未见小鼠产生肿瘤，证明纯化疫苗是安全的。

病毒衣壳蛋白结构是维持其免疫原性的物质基础，衣壳蛋白结构的改变，将导致病毒空间构像变化，使病毒丧失感染性和中和抗原的特异性[14]。本试验对Q-Sepharose F.F.纯化前后病毒制备样品作SDS-PAGE电泳，结果表明其衣壳蛋白组成部分的电泳带稳定，分子量与VP1、VP2、VP3、VP4相近。

参 考 文 献

[1] Hayflick L. History of the cell substrates used for human biologicals [J]. Develop Biol Standard, 1989, 70: 11－26

[2] Horaud F. Absence of viral sequences in the WHO Vero cell bank: A collaborative study [J]. Develop Biol Standard, 1992, 76: 43－46

[3] Nontagnon B. 1000 liter scale microcarrier culture of Vero cells for killed poliovirus vaccine-promising results [J]. Develop

维普资讯 http://www.cqvip.com

Biol Standard. 1983, 55:37 - 42

[4] Florian H. Viral vaccines and residual cellular DNA [J]. Biologicals. 1995, 23:225 - 228

[5] WHO. Requirements for Poliomyelitis vaccine (ORAL) [S]. WHO TRS. 1990, 800:30 - 65

[6] Sepharose ion exchangers. Ion Exchange Chromatography: principles & methods [R]. Pharmacia. 1993, 10 - 12

[7] James S R. A collaborative study on DNA quantitation in biological products [J]. Biologicals. 1995, 23:199 - 205

[8] Floyd R. Sharp D G. Viral aggregation: Buffer effects in the aggregation of Poliovirus and reovirus at low and high pH [J]. Appl Environ Microbiol. 1979, 38(3):395 - 401

[9] John C. Horaud F N. DNA, dragons and sanity [J]. Biologicals. 1995, 23:233 - 238

[10] Chezzi C. Genetic stability of oral poliovaccine prepared on primary monkey cells or Vero cells-effects of passage in cell culture and the human gastrointestinal truct [J]. Vaccine. 1998, 16:2031 - 2038

[11] Fleckenstein B, Muthian D, Ronald D H. Tumor induction with DNA of oncogenic primate herpes virus [J]. Nature. 1978, 274:57 - 59

[12] Carcagne J. Evaluation of transforming activity of cellular DNAs from different origins by NIH 3T3 transfection test [J]. Biologicals. 1991, 19:317 - 325

[13] Wierenga D E, Cogan J, Pettricciani J C. Administration of tumor cell chromatin to immunosuppressed and nonimmunosuppressed nonhuman primates [J]. Biologicals. 1995, 23:221 - 224

[14] Moray F, David J, Philp D M. Antigenic structure of poliovirus or IPV [J]. J Gen Virol. 1993, 74:685 - 690

Studies on the Purification of OPV and its Characterization

LIAO Guo-yang[1], JIANG Shu-de[1], ZHENG Cong-Yi[2], LI Wei-dong[1]
WANG Ming-xiu[1], CHEN Guang-wu[1], WANG Yan[1]

[1](*Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union of Medical College, Kunming* 650107, *China*)

[2](*China Center for Type Culture Collection, Wuhan University, Wuhan* 430072, *China*)

Abstract: Q-Sepharose F.F. was adopted to purify the suspension of oral poliovaccine (OPV), which is prepared from Vero cells. After clarification and concentration by ultrafiltration, the recovery of virus infected titre may attain above 85%. Using column chromatography on Q-Sepharose F.F. to purify the concentrated virus suspension, the purified viruses attain 100% recovery of virus infectivity. Dot membrane hybridization was used to detect DNA with the probe of Vero cell genome DNA which was labed with α-^{32}P dATP, the contents of residual substrate DNA was less than 100 pg/dose. The process of downstream had no significant influence on some biologiccal characters of purified viruses, such as virus morphology, tumorigenicity, rct/40 character and capsid protein. The results indicate that Q-Sepharose F.F. is an ideal chromatography material for purifying OPV prepared from Vero cells.

Key words: Oral polio vaccine (OPV); Q-Sepharose F.F.; Purification