

用 Vero 细胞制备马抗狂犬病血清抗原

张捷^{1,2}, 叶林柏^{1**}, 曾莹春¹, 阳帆¹, 刘静¹

(1. 武汉大学生命科学院病毒研究所, 湖北武汉 430072; 2. 武汉生物制品研究所, 湖北武汉 430060)

For Preparing the Antigen of Rabies Immunoglobulin in Vero Cells

ZHANG Jie^{1,2}, YE Lin-bai^{1**}, ZENG Ying-chun¹, YANG Fan¹, LIU Jing¹

(1. Institute of virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Wuhan Institute of biological products, Wuhan 430060, China)

Abstract: To establish an effective, economical and simple technology for preparing rabies viral antigen that can be used to produce horse anti-rabies serum, rabies virus strain was inoculated in vero cells cultured with medium containing 10% horse serum and was propagated with 199 culture medium containing 1%~3% horse serum. Virus were harvested at the fifth and eighth days and used for preparing antigens by concentration, inactivation and centrifugation. The titers of rabies virus in the culture were reached above 7.0 logLD₅₀/mL. The potency of antigens were higher than 6.0 IU/mL. The antigen is suitable immunising horse for producing rabies immunoglobulin.

Key Words: Vero cells; Horse serum; Antigen

摘要: 以 Vero 细胞为基质制备马抗狂犬病血清用抗原, 以期建立有效、经济、简便的抗原制备方法。用含 10% 马血清营养液对 Vero 细胞作适应性培养, 接种狂犬病毒, 以含 1%~3% 马血清营养液作维持液培养病毒, 于第 5, 8 天收获病毒液, 经灭活、浓缩、离心等制成抗原。第 5, 8 天收获病毒滴度可稳定在 7.0logLD₅₀/mL 以上, 灭活抗原具有良好的抗原性, 用 NIH 法测定效价达 6.0IU/mL 以上, 可用作抗原生产抗狂犬病血清。

关键词: Vero 细胞; 马血清; 抗原

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)03-0242-03

狂犬病是一种由狂犬病毒引起的危害极为严重的人畜共患疾病, 人一旦发病, 死亡率为 100%。目前主要通过预防接种狂犬病疫苗及联合使用高免血清或免疫球蛋白来控制该病的发生和流行。由于人抗狂犬病特异性免疫球蛋白远远不能满足市场需求, 精制马抗狂犬病血清仍在广泛使用^[1]。

我国制备马抗狂犬病血清免疫马所使用的抗原是人用狂犬病疫苗, 包括羊脑固定毒抗原和地鼠肾细胞疫苗。羊脑固定毒抗原制备繁琐复杂, 受诸多动物条件限制; 而地鼠肾细胞疫苗在其制备过程中使用人白蛋白作为病毒抗原的保护剂, 因此使用这种抗原免疫的马血清含有抗人白蛋白抗体。我们曾采用人白蛋白吸附的方法去除血清中的抗人白蛋白抗体, 但这一步骤大幅度提高了抗狂犬病血清的成本。人用 Vero 细胞狂犬疫苗是近几年研制成功的新

型疫苗^[2], 是以传代细胞为基质, 摆脱了动物条件限制, 制备工艺稳定简化, 但该疫苗生产过程中同样使用人白蛋白, 不符合制备马抗狂犬病血清抗原生产要求^[3], 因此我们对制备用于生产马抗狂犬病血清的抗原的制作方法加以改进, 现将以 Vero 细胞为基质制备抗狂犬病马血清抗原的研究报告如下。

1 材料与方 法

1.1 细胞

Vero 细胞来源于武汉大学生命科学院病毒研究所。培养液为含 10% 马血清 199 液, 用常规细胞传代方法^[4, 5]作适应性传代培养。

1.2 毒种

狂犬病毒 aG 株 (豚鼠脑) 来源于武汉生物制品研究所。Vero 细胞适应马血清培养后, 将毒种在

收稿日期: 2003-11-05, 修回日期: 2003-12-16

作者简介: 张捷 (1968-), 女, 广东省籍, 在职研究生, 主要从事生物制品研究。

** 通讯作者: Corresponding Author. Tel: 027-87682372, E-mail: linbaiye@hotmail.com.

Vero 细胞上作适应性培育,连续传代;接种病毒后,以含 1%~3%马血清 199 液作维持培养。

1.3 病毒滴定

用小鼠脑内接种法进行^[3]。将病毒液做 10 倍系列稀释,用体重 11g~13g 小鼠脑腔注射,0.03mL/只,每个稀释度至少注射 4 只小鼠,观察 14d,计算 logLD₅₀/mL。

1.4 抗原试剂

将收获的病毒液进行 5~10 倍超滤浓缩,经 β-丙内酯灭活、离心等处理制成抗原^[6]。

1.5 效力测定

用 NIH 法进行^[3]。将抗原做 5 倍连续稀释,用 3 个稀释度对 12g~14g 小鼠进行腹腔免疫,0.5mL/只,每个稀释度 16 只,间隔一周再免疫一次,同时做参考品稀释免疫。小鼠于第一次免疫后 14d,用预先测定每 0.03mL 含 5~100 个 LD₅₀ 的病毒量脑内攻击 0.03mL/只,病毒滴定用 1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³,每个稀释度做 8 只,所有小鼠自攻击之日起观察 14d,统计计算效力。

2 结果

2.1 细胞在马血清培养液中适应性传代

采用常规细胞传代方法,将在已适应牛血清培养液的 Vero 细胞改用 10%马血清培养液进行传代培养。由小牛血清培养改为马血清培养,第一、二代细胞表现出生长减缓,经适应性传代 3 代以上后同牛血清培养效果基本一致,细胞生长状态良好。细胞增殖曲线见图 1。

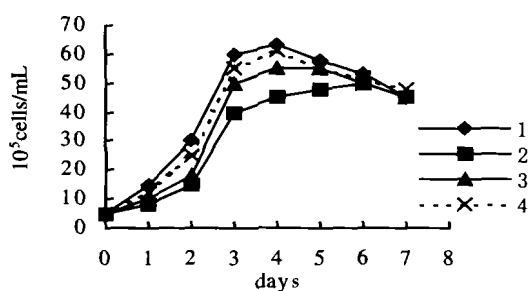


图 1 细胞增殖曲线

Fig.1 The multiplication of cells

1, Cultured in 199 medium contained calf serum; 2, The first cultured in 199 medium contained horse serum; 3, The second cultured in 199 medium contained horse serum; 4, The third cultured in 199 medium contained horse serum.

2.2 病毒株在 Vero 细胞上适应性培育

将用 10%马血清培养、已长成单层的细胞接种狂犬病毒 aG 株(豚鼠脑),接种后 5~11d 取样测

毒力并连续传代,结果显示连续传 10 代后基本适应。1~12 代毒力为 4.0~5.5 logLD₅₀/mL, 13~18 代毒力可达 5.83~7.5logLD₅₀/mL。

2.3 不同接种比例对病毒滴度的影响

对处于对数生长期的 100mL 小方瓶 Vero 细胞记数,一般数量为 5~6×10⁶,按 0.0001、0.001、0.01、0.1MOI 浓度接种,置 35℃培养,于不同天数收获培养液,测定病毒滴度(表 1)。表 1 显示,当细胞在生长对数期时,种毒比例在 0.001~0.1MOI 比较适宜。

表 1 感染浓度对病毒滴度的影响

Table 1 The effect of different infective dose of virus on the titer of virus

Rations of Virus (MOI)	Titer of virus (logLD ₅₀ /mL)		
	5d	8d	11d
0.0001	6.5	6.0	5.83
0.001	7.17	7.0	6.5
0.01	7.5	7.17	6.83
0.1	7.0	7.17	7.0

2.4 维持液中不同马血清含量的病毒滴度

将在对数生长期的 100mL 小方瓶 Vero 细胞接种病毒后,分别以含 1%、3%、5%的马血清 199 维持液 35℃培养,于不同天数收获培养液,测定病毒滴度(表 2)。由表 2 可见,维持液中 1%~3%的马血清浓度均可获得较高的病毒滴度,血清浓度高则不利于病毒增殖。

表 2 不同马血清含量对病毒滴度的影响

Table 2 The effect of different serum amount on the titer of virus

Ration of serum	Titer of virus (logLD ₅₀ /mL)		
	5d	8d	11d
1%	7.5	7.17	6.17
3%	7.5	7.5	6.5
5%	6.83	6.5	6.0

2.5 不同收获时间的病毒滴度

病毒感染 Vero 细胞后,于 72h 开始于不同时间取样收获病毒培养液,测定其病毒滴度,同时用含人白蛋白的维持液作对照(表 3)。由表 3 可见,用马血清组病毒接种 48h 后病毒滴度即可达到 5.5logLD₅₀/mL,第 5~8 天达高峰,以后滴度下降,但到第 20 天病毒仍可维持复制;用传统方法白蛋白组病毒情况类似,到第 20 天病毒亦可维持,但整体病毒滴度略低于马血清培养。

表 3 不同收获时间的病毒滴度

Table 3 Virus titers by different harvest days

Types of Culture medium	Titer of virus (logLD ₅₀ /mL)										
	2d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	11d	14d	17d	20d
Horse serum	5.5	6.83	7.5	7.17	7.0	6.83	6.5	6.5	5.5	5.17	5.0
Albumin	5.5	6.5	7.0	7.0	7.0	6.17	6.0	5.5	4.5	4.0	4.5

2.6 抗原制备

用 2L 克氏瓶培养 Vero 细胞, 接种病毒制备 3 批抗原。所用毒种毒力为 7.5logLD₅₀/mL, 接毒浓度为 0.01MOI, 于第 5 天、第 8 天收获两次病毒液, 测定收获液毒力均大于 6.5logLD₅₀/mL; 经浓缩、灭活、离心等处理制成成品抗原。用 NIH 法测定抗原效价, 3 批抗原效价均达 6.0IU/mL 以上 (表 4)。

表 4 抗原效力检定结果

Table 4 The potency of antibody

Lot No	Titer of virus (logLD ₅₀ /mL)		Potency of antigen (IU/mL)
	5d	8d	
	1	7.17	6.83
2	7.5	7.17	6.4
3	7.5	7.0	6.3

3 讨论

目前国内用于制备精制马抗狂犬病血清的抗原为人用狂犬病疫苗, 包括地鼠肾细胞疫苗和 Vero 细胞疫苗等。地鼠肾细胞疫苗的生产受动物来源、检疫、养殖等多方面条件限制, 疫苗质量和稳定性均难以得到保证, 因此不是理想的制备抗血清用的免疫抗原。Vero 细胞狂犬病疫苗是一种传代细胞疫苗, 细胞来源和生产工艺均稳定可控, 是目前国内比较理想的免疫抗原。

本文研究的是一种新型的马抗狂犬病血清的免疫抗原, 与传统的 Vero 细胞疫苗相比, 抗原成分中不含人白蛋白等人体成分, 免疫马匹后不会产生抗人白蛋白抗体。传统的 Vero 细胞疫苗在培养细胞中采用小牛血清, 接种病毒后换用人白蛋白维持, 这种营养液成分的变化对细胞和病毒培养均会产生一定的影响。我们将 Vero 细胞和狂犬病毒 aG 株均用含马血清的营养液进行驯化, 使之适宜在含马血清的营养液中培养和繁殖, 进一步提高了疫苗的质量和稳定性, 用马血清培养得到的新型抗原符合《中国生物制品规程》2000 年版要求, 不仅质量优

于目前普遍使用的人用 Vero 细胞疫苗, 而且制备成本大大降低。

本次试验表明, Vero 细胞能较快适应马血清, 仅连续传代 3 代次, 其生长状况同小牛血清培养就基本一致。

为了获得高滴度的病毒, 我们对毒种 aG 株预先作了适应性培育。将毒种用含马血清的 Vero 细胞连续传 18 代, 病毒滴度稳定在 7.0logLD₅₀/mL 左右。在细胞生长对数期以 0.001~0.1MOI 接种病毒, 用含 1%~3% 马血清维持液培养, 第 11 天时病毒滴度仍能达到 6.5logLD₅₀/mL; 试验表明病毒增殖高峰为 5~8d, 病毒复制可持续 20d 以上, 同牛血清培养类似^[7, 8]。我们试制了 3 批抗原, 于种毒的第 5 天、第 8 天 2 次收获病毒液进行浓缩、灭活、离心等处理, 经检测效力均在 6.0IU/mL 以上。

实验结果表明, 用改进后的技术制备用于免疫马生产马抗血清的狂犬病毒抗原, 不含人白蛋白, 在生产周期、产量和质量及成本等方面与采用牛血清培养技术基本相同, 但用这种技术生产的抗原制备马抗狂犬病免疫球蛋白可省略去除抗人白蛋白抗体步骤, 大大降低成本和提高收获率。因此本改进的技术具有实用意义和推广价值。

参考文献

- [1] 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001.
- [2] 俞永新. 我国狂犬病细胞疫苗的发展和存在问题[J]. 中国生物制品学杂志, 2002, 15 (6): 378-380.
- [3] 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程 2000 版[M]. 北京: 化工工业出版社, 2000.
- [4] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1994.
- [5] 卢锦汉, 章以浩, 赵铠. 医学生物制品学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995.
- [6] EL-Karamany RM. Production in Vero cell of an inactivated rabies vaccine from strain FRV/K for animal and human use[J]. Acta Virol, 1987, 31(4): 321-328.
- [7] 李宏玲, 李河民, 俞永新, 等. 狂犬病毒在 Vero 细胞上的传代适应[J]. 生物制品学杂志, 1989, 2 (2): 22.
- [8] 李淑兰, 张莹, 杨兵, 等. 狂犬病毒地鼠肾细胞适应株的选育[J]. 中国生物制品学杂志, 1997, 10 (4): 204.
- [9] 高鸿瑞, 魏至栋, 单秀琴, 等. 狂犬病病毒 Vero 细胞适应株的建立及其应用于疫苗生产的可行性探讨[J]. 微生物学免疫学进展, 1995, 23 (3): 129.