

氯仿抽提细胞培养物中纯化甲肝病毒

谢忠平, 宋霞, 李文忠, 熊秋霞, 李华, 崔萍芳, 全文琦, 丁雪凤

摘要: **目的** 探讨氯仿抽提纯化甲型肝炎病毒(HAV)过程中多种因素对其活性的影响。**方法** 利用正交分析方法, 对抽提纯化过程中超声波、氯仿、洗涤液等多种因素进行系统的比较。**结果** 病毒液的体积与超声波功率相匹配破碎效果较好; 用 PBS 及 NS 作洗涤液比 MEM 效果好; 氯仿的质量也是影响抽提效果的重要因素。**结论** 氯仿抽提纯化 HAV 过程中多种因素均会对其活性产生影响, 需探索一个合适条件, 最大限度地降低对其活性的影响。

关键词: 甲肝病毒; 感染性滴度; 氯仿; 纯化

Investigation on factors affecting purification of HAV with chloroform XIE Zhong-ping, SONG Xia, LI Weng-zhong, et al. Institute of Medical Biology Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College (Kunming 650118, China)

Abstract: **Objective** To investigate the factors relating to the purification of HAV. **Methods** It was performed by the orthogonal experiment method to analyze some factors relating to the purification of HAV with chloroform. **Results** The matches between the powers of sonication and the sample volumes of virus were important factors in the titration of virus. It was better to use PBS and NS as washing buffer than MEM. The quality of chloroform also influenced the purification of HAV. **Conclusion** The purification of HAV was influenced by several factors, and it was necessary to optimize these factors to reduce the influence on the activity of HAV.

Key words: HAV; infectious titer; chloroform; purification

由于甲肝病毒是细胞内感染病毒, 不产生细胞病变(CPE), 成熟子代病毒不释放到细胞外, 要获得活病毒或病毒抗原, 均须进行包括冻融、超声波破碎细胞、氯仿抽提纯化等一系列处理, 其过程复杂, 影响因素较多。为了寻找和制定合理且稳定的纯化方法, 我们利用正交分析方法, 对抽提过程中的有关因素进行比较分析, 并得到较理想的结果数据, 为甲肝病毒的提取及纯化提供资料。现将结果报告如下。

1 材料及方法

1.1 材料 (1)病毒: 甲型肝炎减毒疫苗株(H₂株)。(2)细胞: 二倍体细胞株(KMB₁₇)。(3)超声波破碎细胞: 用超声波组织粉碎机(JY88-II型), 在冰水浴条件下进行破碎。(4)氯仿抽提: 氯仿均为分析纯, 将氯仿与样品混合后, 充分振摇, 然后 3 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液, 残余部分再用洗涤液洗涤 3 次(条件同前), 将总共 4 次的上清液合并混匀。

1.2 方法 生产一批甲肝病毒带毒细胞, 利用 L₄(2³)及 L₉(3⁴)正交表, 对超声波破碎效果及氯仿抽提效果有关的因素进行设计, 按设计方案进行试验。每次试验所得病毒液作为一份样品, 用 24 孔板培养方法进行感染性滴度检测^[1], 以感染性滴度作为处理效果评价的指标。

2 结果与分析

2.1 超声波对甲肝病毒带毒细胞破碎效果 利用 L₄(2³)正交表进行设计, 对样品体积、超声时间、超声次数 3 个因素进行分析。第 1 组试验为: 15 ml 体积、超声波破碎 1 min、超声波破碎 1 次; 第 2 组试验为: 15 ml 体积、超声波破碎 2 min、超声波破碎 2 次; 第 3 组试验为: 30 ml 体积、超声波破碎 1 min、超声波破碎 2 次; 第 4 组试验为: 30 ml 体积、超声波破碎 2 min、超声波破碎 1 次。每组试验重复 2 次, 最终感染性滴度

(1g CCID₅₀/ml) 结果分别为: 7.67, 7.0; 7.67, 7.0; 7.33, 6.50; 7.23, 6.67。

从统计分析结果看, 当超声波输出功率固定时, 样品体积、超声破碎时间、超声破碎次数 3 个因素在一定的范围内, 对感染性滴度的影响无显著性差异($P > 0.05$); 但从直接观察看, 在样品体积小时(15 ml), 不论超声破碎 1 min 还是 2 min、超声破碎 1 次还是 2 次, 感染性滴度均比大体积时(30 ml)高, 这可能是破碎更充分的原因; 而样品体积在 30 ml 以内时, 超声破碎 1~2 min、超声破碎 1~2 次对感染性滴度均无明显的影响, 再增加超声次数和时间是否会对破碎效果产生影响, 还需要进一步验证。

2.2 氯仿不同抽提条件对 HAV 感染性滴度的影响 用 L₉(3⁴)正交表进行设计, 对样品与氯仿体积比例(20:20, 20:10, 10:20)、氯仿厂牌/批号、洗涤液、加入洗涤液后的混合方式(方式(1)加入洗涤液后在旋涡混合仪上充分混合 2 min; 方式(2)吸取上清液后的残余部分, 超声波破碎 1 min, 再加入洗涤液, 手摇混合 2 min; 方式(3)吸取上清液后加入洗涤液, 超声波破碎 1 min 混合)4 个因素进行分析, 重复 2 次试验。最终感染性滴度检测结果表明, 对于相同的样品, 所分析的上述 4 个因素对感染性滴度的影响都无显著性差异($P > 0.05$), 没有理由认为其中某一个为主要影响因素; 但从直接观察看, 样品与氯仿体积比例对滴度的影响最小用生理盐水(NS)及磷酸缓冲液(PBS)作为洗涤液, 比用基础培养液(MEM)效果要好些; 加入洗涤液后的混合方式, 手摇混合方式效果相对较差。

2.3 连续抽提过程中各次所获物的滴度 用一批病毒原液, 超声波破碎后加入等量的氯仿, 充分混合后离心, 吸取上清液, 加入等量的生理盐水洗涤 3 次(条件相同), 每次均取出样品进行感染性滴度检测, 第 1 次、第 2 次、第 3 次、第 4 次所取样品的滴度分别为 7.67 log, 7.67 log, 7.33 log, 7.0 log, 抽提前样品的滴度为 8.0~8.331 g。结果表明, 第 4 次的抽提液中仍然有较高的滴度, 提示残余部分可能还含有一定量病毒。

作者单位: 中国医学科学院中国协和医科大学医学生物学研究所, 昆明 650118

作者简介: 谢忠平(1965-)男, 云南昆明人, 副主任技师, 硕士生导师, 主要从事生物制品开发研究。

2.4 氯仿抽提前后滴度变化比较 将经氯仿抽提的病毒合并液进行感染性滴度检测,与抽提前的滴度进行比较,分析氯仿抽提对滴度的影响,并对其中 2 份样品再用氯仿进行 1 次抽提(2 次抽提)(表 1)。

表 1 氯仿抽提对 HAV 感染性滴度的影响

样品号	氯仿抽提前滴度	氯仿抽提后滴度		2 次氯仿抽上清
		实测滴度	调整后滴度	
1	8.0~8.33	7.67	8.27	7.0
2	7.23	6.67	7.27	6.0
3	7.33	6.0	6.60	\
4	7.50	6.67	7.27	\
5	7.0	5.91	6.51	\
6	7.0	6.33	6.93	\

注:在氯仿抽提时,最后样品实际被稀释 4 倍,所以在实测滴度上增加 0.60 lg 调整,便于与抽提前结果进行比较。

从表 1 可以看出,氯仿抽提后实测滴度比抽提前低,但调整后则与抽提前无显著性差异,说明氯仿抽提会对感染性滴度产生影响,但尚无充分理由认为有较大的影响;从 2 次氯仿抽提前后感染性滴度比较看,有明显降低,可能是未对残余部分进行洗涤的原因。

2.5 抽提后病毒液进行再次离心对感染性滴度的影响 将氯仿抽提后病毒液再进行 3 000 r/min,离心 20 min,其离心后上清中抗原滴度与离心前一致,沉淀(用 1/5 原液体积的 PBS 溶解)中未检出甲肝病毒抗原(HAAG);上清澄明度离心前后无明显差异。但若将氯仿抽提后病毒液放 -20℃ 冻存 7 d 后(此时病毒液中有肉眼可见的悬浮物)再用上述条件离心,则离心后上清中抗原滴度低于离心前,在沉淀中含有可检出的 HAAG,且病毒液病毒含量越高,沉淀中的含量也越高,并随离心力增加而增加;离心后上清中肉眼可见的悬浮物被沉淀,

澄明度离心前后有明显差异。

3 讨论

本研究结果表明,采用超声波破碎细胞释放病毒时,样品体积与超声波功率相匹配是一个重要的因素,而破碎时间在 2 min 内、破碎 1~2 次对感染性滴度均无明显的影响,提示利用超声波进行细胞破碎需要探索合适的条件。再增加超声次数和超声时间是否会对破碎效果产生影响,由于本研究中未作设计不能确定,还需要进一步探索。

在用氯仿抽提纯化时,氯仿的质量、振荡混合是否充分是影响效果的因素,但样品体积与氯仿体积的比例在一定范围则无明显的影响,所以对试验进行有效的组合,是非常重要的,氯仿应在保存有效期内使用,最好能进行小样试验后投入规模化生产,抽提及洗涤时振荡应充分。洗涤次数的多少,应视细胞浓度及原液病毒含量而定,一般而言,细胞浓度大、病毒含量高,应多洗涤几次,反之则可以少洗涤几次,就我们的经验而言,洗涤 5 次是很有必要。研究结果还表明,用 PBS 及 NS 作洗涤液比 MEM 效果好。

用氯仿进行二次抽提,虽然可以降低残余牛血清蛋白含量,但感染性滴度也同时降低,是否有病毒的损伤不能确定,而残余部分仍然含有一定量的病毒是肯定的。

综上所述,氯仿抽提纯化对甲肝病毒感染性滴度会有一些影响,但优良的组合及规范的操作将减少这种影响。所以严格整个过程的每一个步骤至关重要。

参考文献:

- [1] 谢忠平,宋霞,李华,等.应用 24 孔板培养方法检测甲肝疫苗感染性滴度[J].中国生物制品学杂志,2001,14(2):118.
- [2] 庄昉成,忻亚娟,钱汶,等.甲型肝炎减毒活疫苗(H₂株)不同加强免疫程序的免疫效果[J].中国计划免疫,2002,8(1):4.
- [3] 刘志思,王延俊.甲型肝炎减毒活疫苗加强免疫效果观察[J].中国计划免疫,2002,8(2):80.

收稿日期:2003-06-09

(蔡天德编辑 宋艳萍校对)

文章编号:1001-0580(2004)03-0299-01

中图分类号:R51

文献标识码:B

【基层公共卫生】

大连市 5 例 SARS 病例浅析

刘丹,孟军,贾秀岩

SARS 为 2003 年出现的新型传染病,随国内 SARS 疫情的上升,大连相继出现了同一传播链的 5 例患者。现分析如下。

大连市 5 例 SARS 病例为同一传播链,其中输入性病例 1 例,密切接触感染 1 例,院内感染 3 例。男性 2 例均为干部,女性 3 例均为大连 SARS 定点医院护士。5 例 SARS 患者,年龄最大 52 岁,最小 22 岁。输入病例是因 4 月 3~8 日在呼和浩特逗留期间被感染。第 2 例虽无外出史,但因与首例是同事,有过多次近距离密切接触且无任何防护,而被感染。3 名

护士因对该 2 位患者的直接医疗、护理而被感染。

5 例患者均以全身不适、乏力、酸痛起病,之后出现高热,咳嗽无痰,胸闷,无卡他症状,无咽痛,无咽红;血常规检查 WBC 均进行性下降,之后因继发感染 WBC 总数升高,同时伴淋巴细胞进行性下降;X 光检查肺部均出现片状阴影,前 2 例患者胸部阴影进展迅速,其中首例患者出现全肺阴影并行气管切开术。对于 5 例患者均进行抗炎、免疫调节、激素、营养支持、心理疏导等综合疗法,3 例痊愈,2 例治疗无效死亡。

对上述疫情均在最短的时间划定疫点,并及时做终末消毒,同时对 5 名 SARS 病人的接触者进行隔离观察,未有新病例发生。

收稿日期:2003-08-20

(任旭红编辑 宋艳萍校对)

作者单位:大连市疾病预防控制中心,116021

作者简介:刘丹(1952-),女,大连人,主任医师,大学,主要从事流行病学应用、科研和教学工作。