

• 基础实验研究论著 •

PEG-6000 纯化流感病毒鸡胚尿囊液的研究*

戴宗祥, 耿兴良, 周 健, 马 磊, 郭 晨, 周竞贤, 高清霞, 张新文, 姜述德, 廖国阳[△]

(中国医学科学院/北京协和医学院/医学生物学研究所/云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 云南昆明 650118)

摘 要:目的 探讨 PEG 沉淀法纯化鸡胚培养流感病毒尿囊液的工艺, 对 PEG-6000 的浓度、沉淀时间、离心力进行优化, 为流感病毒抗原和抗体制备提供了便捷的手段。方法 向流感病毒鸡胚尿囊液添加 PEG 后进行高速离心收集沉淀, 检测纯化病毒液效价、病毒形态, 以及卵清蛋白含量。结果 PEG 浓度为 4%, 沉淀时间 2 h, 离心力 8 000 g 条件下, 病毒能完全沉淀, 杂蛋白卵清蛋白含量低, 病毒颗粒完整, 浓缩液中病毒血凝效价为 1:10 240。以纯化病毒免疫山羊 3 次后, 血清抗体滴度为 1:1 024 且无交叉。结论 本研究初步证明优化后的 PEG 沉淀法对鸡胚培养流感病毒尿囊液中的病毒浓缩、纯化达到了很好的效果。

关键词: 流感病毒; 实验室技术和方法; 抗原抗体复合物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)01-0001-03

Study on purification of influenza virus in allantoic fluid of embryonic egg with PEG-6000*

Dai Zongxiang, Geng Xingliang, Zhou Jiang, Ma Lei, Guo Chen, Zhou Jingxian,

Gao Qingxia, Zhang Xinwen, Jiang Shude, Liao Guoyang[△]

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Yunnan

Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Kunming, Yunnan 650118, China)

Abstract: Objective In this paper, we focus on the procedure of purifying influenza virus and optimizing the concentration of PEG-6000, the concentrating time and centrifugal force. In order to provide a fast way to obtain the influenza virus antigen and antibody. **Methods** We centrifuged the influenza virus in allantoic fluid of embryonic egg after adding PEG-6000 to it, then collect the precipitant, and test the contented of ovalbumin, viral particle integrity, and the titers of virus. **Results** It showed that when the experimental conditions was settled as 4% for the PEG concentration, 2 hours for the settling time and 8 000 g for the centrifugal force, the virus could be completely precipitated. In this situation, the miscellaneous protein ovalbumin content was low, and the virus was integrate. Finally the hemagglutination titer was 1:10 240, the antiserum titer was 1:1 024, and there was no cross. **Conclusion** Optimized PEG precipitation method could be with fine effects for the concentration and purification of influenza virus from allantoic fluid of chick embryo.

Key words: influenza virus; laboratory techniques and procedures; antigen-antibody complex

流感病毒是一种常见的呼吸道传播病毒, 属于正黏病毒科, 是单股负链 RNA 病毒^[1]。其抗原性表位集中在 HA 和 NA 这 2 个蛋白上, 由于经常变异, 造成流感大流行, 严重危及人们的生命财产安全。目前治疗流感尚无特效药, 接种流感疫苗是预防和控制流感大流行的最经济且行之有效的办法。而流感病毒的培养、纯化与疫苗的研发直接相关。现阶段, 鸡胚培养和细胞培养是实验室研究常用的方法。由于鸡胚培养有产毒量高、操作简单等优点, 故成为研究人员最常用的方法。但从鸡胚尿囊液中获取的病毒液混有脂蛋白、卵清蛋白等杂蛋白, 纯度较低。因此, 鸡胚尿囊液中流感病毒的浓缩与纯化成为研究流感病毒生物学性状、免疫学特性以及制备流感疫苗的关键。目前纯化流感病毒的方法主要有超滤法、亲和层析法和超速离心法^[2-3]。其中超速离心法是被广大研究者所普遍采用的方法。此外, PEG 也有报道被用来纯化病毒^[4-5]。本文将 PEG 沉淀法浓缩、纯化流感病毒的条件进行优化, 并以浓缩、纯化的病毒液免疫山羊, 检测抗体的效价及交叉性, 通过电镜观察, 检测 PEG 是否影响病毒的完整性。

1 材料与方法

1.1 实验材料 毒种(BY/四川安岳/139/2011)由中国医学科学院医学生物学研究所提供; 健康鸡群鸡胚购于云南省云岭广大公司; 健康成年山羊购自云南山羊养殖场; 甲型 H1N1 流

感病毒标准抗原(BV/重庆渝中/138/2010, BY/四川安岳/139/2011, A3 福建同安/196/2009, A1 天津津南/15/2009, A1/四川/SWL1/2009)由国家流感中心提供。

1.2 仪器与试剂 试剂: PEG-6000、0.01 mol/L PBS、过碘酸钾、弗式不完全佐剂、弗式完全佐剂、无水葡萄糖、卵清蛋白试剂盒购自北京天坛生物制品有限公司。仪器: 湘仪 H-1850R 离心机、BeckmanG25 离心机、孵箱、500 mL 离心瓶、15 mL 离心管、U 型血凝板和日立 H-7650 透射式电子显微镜。

1.3 实验方法

1.3.1 流感病毒的鸡胚培养 取 B 型流感病毒工作种子株用 0.01 mol/L PBS 按 1:10 000 稀释后接种 10 日龄鸡胚, 每胚 0.2 mL, 每批接种 150 枚鸡胚, 置 34℃±1℃, 55%~60% 湿度下孵育。

1.3.2 流感病毒鸡胚尿囊液的澄清 接种流感病毒的鸡胚培养 72 h 后, 置 4℃过夜, 无菌条件下收获尿囊液, 4℃, 5 000 r/min 离心 20 min, 弃沉淀, 重复离心一次。

1.3.3 浓缩条件的摸索与选择 取部分澄清后的尿囊液分装至离心管中, 分别加入不同浓度的 PEG-6000(2%、4%、6%、8%)和 2% NaCl, 充分摇匀, 4℃放置不同的时间(0、2、4 h)后, 分别在 6 000 g、8 000 g、10 000 g 离心力条件下离心, 取上清液检测病毒是否沉淀完全, 并选择最优的浓缩条件。

* 基金项目: 国家国际合作项目基金(2011DFR30420); 云南省自然科学基金(2010CD134)。 作者简介: 戴宗祥, 男, 副研究员, 主要从事疫苗菌学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: liaogy@imbcams.com.cn。

1.3.4 流感病毒的回收率 按公式:病毒回收率=(浓缩前效价×浓缩前体积)/(浓缩后效价×浓缩后体积)来计算。

1.3.5 卵清蛋白含量检测 运用卵清蛋白试剂盒检测流感病毒鸡胚尿囊液与浓缩液中的卵清蛋白含量。

1.3.6 流感病毒颗粒的完整性检测 将浓缩后的病毒待检样品悬浮液滴在干燥的载玻片上,把带有支持膜的铜网放在悬浮液滴上漂浮以获取样品,用滤纸吸干铜网上的多余悬液;再将染色液滴在干燥的载玻片上,把铜网放在染色液滴上漂浮 1~2 min,最后用滤纸吸干铜网上的多余染液。1.0%磷酸铀负染法制备铜网后 25×1 000 倍放大镜检。

1.3.7 制备山羊抗血清

1.3.7.1 血清的制备 用检疫合格、无交叉反应的山羊制备抗血清。取免疫前血清用甲型 H1N1 流感病毒标准抗原检测交叉反应后,用本方法浓缩、纯化的 BY 病毒液皮下多点注射免疫山羊,初免使用弗氏完全佐剂,每只共注射 4 mL(0.3 mL/点);加强免疫使用弗氏不完全佐剂,每只共注射 2 mL(0.3 mL/点),共免疫 3 次,每次间隔 14 d。

1.3.7.2 采血及血清处理 颈内静脉采血,常规方法分离血清后,加入等体积的 25 mmol/L 过碘酸钾和 1/2 体积的 20% 葡萄糖生理盐水处理后^[6],4 ℃、10 000 g 离心 1 h,取上清液,用 0.2 μm 膜过滤上清液,加入适量无菌生理盐水,按终浓度 0.05%加入 ProClin 300。取处理好的抗 BY 血清,做血凝抑制试验。

2 结 果

2.1 浓缩条件的摸索与选择

2.1.1 PEG-6000 浓度的选择 在病毒液中加入 2%NaCl 后加入 PEG-6000,使终浓度分别为 2%、4%、6%和 8%,4 ℃作用 4 h 后 10 000 g 离心 1 h,取上清液检测血凝效价,结果显示 PEG-6000 浓度在 4%以上时能将病毒完全沉淀。

2.1.2 离心力的选择 向病毒液中加入不同浓度的 PEG-6000,4 ℃作用 4 h 后分别按 6 000 g、8 000 g 和 10 000 g 离心 1 h,测上清液效价,结果显示在 8 000 g 离心力下,病毒能完全沉淀。

2.1.3 沉淀时间对流感病毒沉淀效果的影响 在病毒液中加入 4%的 PEG-6000,分别沉淀 0、2、4 h,8 000 g 离心 1 h,检测上清液病毒含量,结果显示沉淀 2 h 离心后病毒就能完全沉淀。通过以上实验,最终确定 PEG 浓度为 4%、沉淀时间并为 2 h、离心力 8 000 g。以优化的条件浓缩流感病毒鸡胚尿囊液后进行各项检测。

2.2 病毒纯化后回收率 加入有机物质 PEG 后病毒能更好地沉淀,回收率能达到 80%,与传统超速离心法比较,病毒回收率得以提高。

2.3 病毒纯化后纯度和形态

2.3.1 卵清蛋白残余量检测 病毒浓缩液中卵清蛋白含量仅为 60.07 ng/mL,明显少于尿囊液中 34 912.11 ng/mL 的含量流感病毒鸡胚尿囊液中加入氯化钠和有机物质 PEG 后,改变了病毒液中盐离子浓度,使得杂蛋白沉降减少,实现了病毒沉降的最大化^[7-9]。

2.3.2 电镜(EM) 病毒形态 B 型流感病毒(BY)电镜下样品背景清晰,病毒包膜结构清楚,呈现出完整、典型的流感病毒颗粒,说明有机物质 PEG 在最大化沉淀病毒的同时,对流感病毒的包膜蛋白没有太大的破坏,病毒纯化效果较好,见图 1。

2.3.3 抗体滴度及交叉 取免疫前血清用甲型 H1N1 流感病毒标准抗原检测无交叉反应后(结果见表 1),运用 PEG 浓缩的流感病毒 BY 免疫山羊,得到抗血清,进行血凝抑制试验

后得到其效价为 1 024,与其他病毒无交叉,结果见表 2。

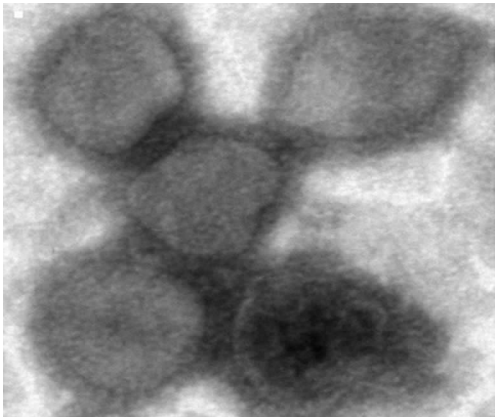


图 1 流感病毒全病毒 BY 电镜照片

表 1 免疫前血清检测

标准抗原	BV/重庆渝中	BY/四川安岳	A3/福建同安	A1/天津津南	A1/四川
	/138/2010	/139/2011	/196/2009	/15/2009	/SWL1/2009
免疫前血清	<5	<5	<5	<5	<5

表 2 山羊抗体效价与交叉

标准抗原	BV/重庆渝中	BY/四川安岳	A3/福建同安	A1/天津津南	A1/四川
	/138/2010	/139/2011	/196/2009	/15/2009	/SWL1/2009
血清					
PEG 浓缩	<5	1:1 024	<5	<5	<5

3 讨 论

自 1933 年鸡胚培养流感疫苗获得成功以来鸡胚培养法成为大量获得流感疫苗的主要手段。现已上市的流感疫苗大都使用鸡胚培养法制备^[10]。但从鸡胚尿囊液中获取的病毒液混有脂蛋白、卵清蛋白等杂蛋白,纯度较低。因此,流感病毒鸡胚尿囊液的浓缩纯化成为制备流感疫苗的关键。目前密度梯度离心是病毒纯化最常使用的方法^[11-12],但是此方法操作繁琐,需要超速离心机。

本实验通过摸索不同浓度 PEG、沉淀时间和离心力对鸡胚尿囊液中病毒的浓缩纯化效果的影响,对其浓缩条件进行了优化。选择的最终优化条件为 4%PEG,沉淀时间 2 h,离心力为 8 000 g。以此条件浓缩的病毒尿囊液上清液中基本检测不到流感病毒,病毒回收率能达到 80%,而且病毒浓缩液中卵清蛋白含量仅为 60.07 ng/mL,明显少于尿囊液中 34 912.11 ng/mL 的含量,流感病毒鸡胚尿囊液中加入氯化钠和有机物质 PEG 后,改变了病毒液中盐离子浓度,使得杂蛋白沉降减少,实现了病毒沉降的最大化,达到了较好的纯化效果。电镜下观察病毒完整,说明有机物质 PEG 在最大化沉淀病毒的同时,对流感病毒的包膜蛋白没有太大的破坏,不仅病毒纯化效果较好,而且浓缩倍数较大,1 000 mL 浓缩至 5 mL,相当于 200 倍浓缩,后续免疫山羊,抗血清滴度较高且无交叉。因此,本研究能初步证明优化后的 PEG 沉淀法对鸡胚培养流感病毒尿囊液中的病毒浓缩、纯化达到了很好的效果。

在疫苗的实际生产过程中,应从质量要求、产物特性、纯化方法的特点、成本等多方面考虑,选择合适的方法。与传统的离心方法比,高速-PEG-高速离心每次能处理 2 400 mL 病毒液,仅需要离心 1 h,处理的量大,省时省力。同时由于加入了 PEG,病毒回收率更高,操作简单且对离心机的要求不高,适合大批量制备纯度相对较高的流感病毒。(下转第 5 页)

与 WLL 株、BJ 株和 HK 株都高度同源,没有发生氨基酸序列的改变。同样的方法可以比对 3 株广东地区人类博卡病毒的全基因序列的 NP 和 NS 蛋白部分。因此,在后续的人类博卡病毒蛋白的表达工作中,优先选择 HBov-GD-594 和 HBov-GD-621 为模板株进行表达。

3 讨 论

呼吸道感染病原学十分复杂,目前报道在儿童急性呼吸道感染性疾病中,病毒感染主要病原为呼吸道合胞病毒、流感及副流感病毒、人鼻病毒、腺病毒、人偏肺病毒和冠状病毒等。还有一部分儿童的急性呼吸道感染,虽然认为是由病毒感染引起,但是其病原并未被阐明^[7-8]。人类博卡病毒是 2005 年瑞典学者 Allander 等^[1]采用随机半巢式 PCR 扩增,测序并结合生物信息学方法对儿童急性呼吸道感染样本进行大规模筛查而发现的一种新的细小病毒。

HBov 感染多见于婴幼儿,一年四季均可发生,以冬春季节为主,但不同国家报道的季节特征有所不同。HBov 的感染主要引起儿童肺炎、支气管炎等,同时部分伴随上呼吸道感染^[9-10]。值得注意的是,美国关于 HBov 感染的报道中约有 7.1% 的患者伴随有腹泻症状。最新的研究报道在腹泻患者的粪便中可以检测到人类博卡病毒,粪便中检测出的高浓度人类博卡病毒和星形病毒表明 HBov 是一种引起肠道疾病的病原菌,正如人类博卡病毒是一种引起呼吸道疾病的病原体一样^[11-12]。

为了对人类博卡病毒全面的认识,了解广东地区流行的人类博卡病毒株的生物学特点。笔者首先从临床呼吸道感染的标本中筛选出人类博卡病毒感染的阳性株,然后设计特异性引物 6 条配成 5 对,采用半巢式方法通过 3 轮半巢式 PCR 扩增出人类博卡病毒的全基因序列,向 GenBank 提交克隆的全基因序列获得基因登录号分别为 GQ926981、GQ926982 和 GQ926983,均属于人类博卡病毒 HBov1 型。最后对全基因序列及相应的蛋白序列的在线比对分析:不同国家检出的 HBov 核苷酸序列都表现出高度的一致性,表明人类博卡病毒是一种高度保守的病毒,而 HBov-GD-571 发生了部分氨基酸序列的改变,在后续的人类博卡病毒相关蛋白的表达工作中,我们优先选择 HBov-GD-594 和 HBov-GD-621 为模板株进行表达。随着测序工作的顺利完成,对人类博卡病毒的研究很快由病毒的筛选和基因组测序转向病毒蛋白组学等后基因组学

的研究。

参考文献

- [1] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 12891-12896.
- [2] Ma X, Endo R, Ishiguro N, et al. Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(10): 1132-1134.
- [3] Nawaz S, Allen DJ, Alandin F, et al. Human bocaviruses are not significantly associated with gastroenteritis: results of retesting archive DNA from a case control study in the UK [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): 413-426.
- [4] Guo L, Wang Y, Zhou H, et al. Differential seroprevalence of human bocavirus species 1-4 in Beijing, China [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): 396-404.
- [5] Khamrin P, Thongprachum A, Shimizu H, et al. Detection of human bocavirus 1 and 2 from children with acute gastroenteritis in Japan [J]. *J Med Virol*, 2012, 84(6): 901-905.
- [6] 陆学东, 林广裕, 周仁彬, 等. 广东地区首例人类博卡病毒的检出及鉴定 [J]. *中华传染病杂志*, 2008, 26(5): 614-616.
- [7] Schildgen O, Qiu J, Soderlund-Venermo M. Genomic features of the human bocaviruses [J]. *Future Virol*, 2012, 7(1): 31-39.
- [8] Li J, Sun B, Ouyang J, et al. Genome cloning of human bocavirus and analysis of viral promoter activity [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2011, 27(6): 909-916.
- [9] Kim JS, Lim CS, Kim YK, et al. Human bocavirus in patients with respiratory tract infection [J]. *Korean J Lab Med*, 2011, 31(3): 178-184.
- [10] Zeng S, Wang D, Fang L, et al. Complete coding sequences and phylogenetic analysis of porcine bocavirus [J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(4): 784-788.
- [11] Chieochansin T, Simmonds P, Poovoraman Y. Determination and analysis of complete coding sequence regions of new discovered human bocavirus types 2 and 3 [J]. *Arch Virol*, 2010, 155(12): 2023-2028.
- [12] Lin F, Teng LF, Zheng MY, et al. Isolation and cell culture of human bocavirus by human bronchial epithelial cell lines [J]. *Zhonghua Lin Chuang Bing Xue Za Zhi*, 2009, 23(6): 427-429.

(收稿日期: 2013-10-25)

(上接第 2 页)

参考文献

- [1] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术 [M]. 北京: 三峡出版社, 1997: 143-144.
- [2] 杜丽娟, 王世光, 张立, 等. 两种方法纯化流感病毒的比较 [J]. *生物制品学杂志*, 2007, 20(3): 216-215
- [3] OPits L, Hohlweg J, Reichl U, et al. Purification of cell culture-derived Influenza virus, A/ Puerto Rico / 8 / 34 by membrane-based immobilized. Metal affinity chromatography [J]. *J Virolog Meth*, 2009, 161(2): 312-316
- [4] 杨立清, 张晋, 卢立新, 等. 蔗糖梯度离心法纯化 Vero 细胞乙脑疫苗的纯度分析及层析法的比较 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2004, 32(4): 11-13.
- [5] Chikara Aizawa, Shigeo Hasegawa, Cheng Chih-yuan, et al. Large-scale purification of Japanese encephalitis virus from infected mouse brain for preparation of vaccine [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1980, 39(1): 54-57.
- [6] 何锡忠, 王英, 蒋凤英, 等. PEG-6000 浓缩圆环病毒 2 型的研究 [J]. *上海农业学报*, 2008, 2(1): 42-44.
- [7] Hanquet G, VanDamme P, Brasseur D, et al. Lessons learnt

- from pandemic A(H1N1) 2009 influenza vaccination. Highlights of a European workshop in Brussels (22 March 2010) [J]. *Vaccine*, 2011, 29(3): 370-377.
- [8] 曾祥兴, 李康生. 流感百年: 20 世纪流感大流行的回顾与启示 [J]. *医学与社会*, 2010, 23(1): 4-6.
- [9] Mendelman PM, Cordova J, Cho I. Safety, efficacy and effectiveness of the influenza virus vaccine, trivalent, types A and B, live cold adapted (CAIV-T) in healthy children and healthy adults [J]. *Vaccine*, 2001, 19(17/19): 2221-2226.
- [10] World Health Organization. Use of cell lines for the production of influenza virus vaccines: An appraisal of technical, manufacturing, and regulatory considerations [J]. *Initiative Vaccine Res*, 2007, 12(1): 1-12.
- [11] 陈丽君, 王英, 胡建华, 等. 应用等密度梯度离心法提纯传染性支气管炎病毒 [J]. *上海农业学报*, 1998, 14(3): 93-95.
- [12] Pyke AT, Phillips DA, Chuan TF, et al. Sucrose density gradient centrifugation and cross-flow filtration methods for the production of arbovirus antigens inactivated by binary ethylenimine [J]. *BMC Microbiol*, 2004, 144(1): 3.

(收稿日期: 2013-08-09)