SARS-CoV 灭活疫苗制备及小鼠免疫研究

唐琳^① 汪建^{①*} 秦鄂德^② 祝庆余^② 于曼^② 石慧颖^③ 丁志芬^③ 程晓洁^①
王彩平^① 李双利^① 常国辉^① 张旭敏^① 陈希曙^① 于军^① 陈则^{④⑤*}

(①中国科学院北京基因组研究所, 北京 101300; ②军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071; ③卫生部北京生物制品研究所, 北京 100024; ④中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071; ⑤湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081. * 联系人, E-mail: chenze@mail.hunnu.edu.cn)

摘要 用 Vero 细胞大量增殖 SARS-CoV 病毒, 使用 β -丙内酯作为灭活剂灭活病毒后, 用 Sepharose 4 FF 层析柱纯化病毒颗粒得到灭活疫苗, 并经 Western-blot, 质谱, ELISA 和电子显微镜检测证实. 用纯化的灭活疫苗加入或不加入氢氧化铝佐剂, 以不同的剂量免疫小鼠, 能够诱导小鼠产生抗体, 加入氢氧化铝佐剂组所产生的抗体高于不加入佐剂组.

关键词 SARS 冠状病毒 灭活疫苗 疫苗制备 佐剂

严重急性呼吸系统综合征(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)是近几十年来所遇到的最严重的病毒性疾病之一, 它是由一种新型冠状病毒引起的急性呼吸道传染病, 具有人群普遍易感、症状严重、病死率高达 6%~7% 的特点. 目前研究显示其传播途径主要是呼吸道飞沫以及黏膜接触感染^[1-5]. 依据人类控制传染病的经验, 疫苗接种应该是预防 SARS 流行的最有效措施^[6-9]. 我们首先选择灭活疫苗作为我们研制有效抗 SARS 疫苗的第一步. 本文介绍了用 Vero 细胞培养 SARS 冠状病毒, 以及纯化、制备灭活疫苗的工艺. 并用制备的灭活疫苗免疫动物观察其诱导产生抗体的能力.

1 材料和方法

(i) 毒种和细胞. 军事医学科学院微生物流行病学研究所提供 SARS-CoV BJ01 株^[10], 此毒株从北京 SARS 患者中分离, 经全基因组测序鉴定为 SARS 病原体, 其序列已提交 GenBank; Vero 细胞由北京生物制品研究所提供, 为疫苗生产专用细胞株, 符合 WHO 规定的疫苗生产细胞要求和我国 2000 版《中国生物制品规程》的要求.

(ii) 疫苗制备. SARS-CoV BJ01 病毒株接种于 Vero 细胞, 37℃ 无血清培养基培养 36 h, 5 mL/瓶, 达 10^7 TCID₅₀ 时, 整瓶细胞 -20℃ 冻融 1 次, 6000 r/min(Beckman, 25R)离心 20 min, 取上清作病毒灭活. 在病毒悬液中加入 1:2000 稀释的 β -丙内酯(购自 Sigma 公司), 摇匀后置 4℃ 孵育 24~72 h, 然后置于 37℃ 2 h 以水解 β -丙内酯. 灭活后的病毒悬液于 4℃ 6000 r/min(Beckman, 25R)离心 30 min, 取上清, 以

PEG20000(购自 Sigma 公司)浓缩至 1/20 体积, 用 Centriplus YM-100(购自 Millipore 公司)进行离心浓缩(30000 × g, 20 min), 过 Sepharose 4FF 层析柱(2.6 cm × 95 cm)进行凝胶过滤(PBS 0.8 mL/min)并对各组分进行 SDS-PAGE 电泳分析. 将病毒颗粒收集管合并, 继续行 Centriplus-20 滤管离心浓缩病毒颗粒. 上柱前后的样品以 Lowry 法测定总蛋白含量, 然后立即加入 1% 人白蛋白作稳定剂, 并加入 0.01% 硫柳汞防腐. 取适量纯化后样品进行电子显微镜、Western blot、ELISA 和质谱检定. 用 PBS 调整免疫的抗原剂量; 含氢氧化铝佐剂纯抗原的制备是在 4℃ 条件下完成, 氢氧化铝佐剂(北京生物制品研究所提供, 终浓度 0.6 mg/mL)加至抗原溶液, 振荡 1 h 使抗原和佐剂均匀吸附.

(iii) 实验动物和动物免疫实验. 6 周龄雌性 BAL B/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 然后将小鼠分组, 各组按不同的剂量免疫灭活疫苗、灭活疫苗加氢氧化铝佐剂. 用腹腔注射的方式免疫小鼠, 共免疫 2 次, 间隔 3 周, 第 1 次免疫后 3 周, 加强免疫前, 用眼眶取血法取血, 第 2 次免疫后 1 周, 用 1 mL 一次性注射器从心脏取血, 收集血清检测 IgG 抗体. 其抗体效价用 ELISA 方法测定, 反应在聚苯乙烯酶标板上进行, 按顺序依次加入包被液、封闭液(PBS 中含 1% 的 BSA 和 0.01% 的叠氮钠)、按 2 倍稀释的血清、生物素标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(γ -chain specific)(Southern Biotechnology Associates, Inc. USA)、250 倍稀释的链菌蛋白碱性磷酸酶、0.01 g/mL 的 PNPP 溶液, 最后通过酶标仪(Labsystems Muliskan Ascent, Thermo Bioanalysis Company, Finland)读取波长 414~405 nm 下的读数.

2 结果

2.1 SARS-CoV 灭活疫苗制备

将 SARS-CoV BJ01 株接种 Vero 细胞, 收集病毒液后进行灭活、浓缩和凝胶过滤处理. 从图 1 可看出, 凝胶过滤时出现两个峰, 第 1 峰电子显微镜检查(图 2)为 100 nm 左右, 表面有典型冠状突起的病毒颗粒, 表明为 SARS-CoV 颗粒峰, 第 2 峰为大分子杂蛋白, 电子显微镜下未见 SARS-CoV 颗粒. 最后将病毒颗粒收集管合并, 继续进行离心浓缩, 获得 SARS-CoV 灭活疫苗.

图 1 Sepharose 4FF 分子筛层析柱纯化病毒的层析图谱在 PBS 缓冲体系中, 浓缩后的灭活病毒上清液经 Sepharose 4FF 分子筛层析柱进行分离. 用 AKTA purifier 层析工作站控制流速在 0.8 mL/min, 监测 260 nm 下光吸收值的变化. 以 5 mL/管为一个组分进行收集

图 2 电子显微镜下的灭活疫苗(病毒颗粒)

2.2 灭活疫苗残余活病毒检测

采用 β -丙内酯 1:2000 和 1:4000, 4℃灭活 SARS-CoV; 分别在 20, 24, 28, 42, 48, 66, 72 h 取样, 并于 37℃水解 β -丙内酯 2 h, 取 3 mL 进行 Vero 细胞盲传 3 代实验, 测定其残毒活性; 结果显示 1:2000, 24 h 能达到灭活效果; 1:4000, 28 h 可达到灭活效果.

2.3 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定

纯化后的病毒颗粒进行 SDS-PAGE(图 3(a))并转膜, 以北京地区 SARS 患者阳性血清为一抗, AP 标记的羊抗人 IgG 为二抗进行 Western blot 检测(图 3(b)). 对照蛋白分子量标记可见, 阳性血清反应条带主要集中在 50 和 140 kD 左右, 分别为 N 蛋白和 S 蛋白.

图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(a)和免疫印迹法(Western blot)(b)显示灭活疫苗中 S 和 N 蛋白

纯化后的病毒在 12% SDS-PAGE(a)上电泳分离后, 电转移到 PVDF(聚偏二氟乙烯)膜上, 以含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 溶液(Tris 100 mmol/L, NaCl 120 mmol/L, pH 7.9, 0.1% Tween-20) 37℃封闭 30 min; SARS 患者血清用 TTBS 溶液 1:1000 稀释作为一抗 4℃孵育过夜, 用 TTBS 溶液漂洗 3 次后, 加入碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgG(TTBS, 1:1000 稀释), 用 NBT/BCIP 进行显色(b)

2.4 质谱鉴定

截取上述 SDS-PAGE 所示 N 蛋白和 S 蛋白条带进行 MALDI-TOF 检测, 质谱数据经 NCBI 冠状病毒数据库检索确定为 BJ01 株的 N 蛋白和 S 蛋白(图 4 和 5). 质谱显示 N 蛋白和 S 蛋白分子量分别为 46 和 141 kD.

2.5 ELISA 检测

纯化后的灭活疫苗(病毒颗粒)进行高浓度尿素(7 mol/L)超声溶解后包被 ELISA 96 孔板, 用 SARS 冠状病毒 IgG 抗体检测试剂盒进行检测(北京华大吉比爱生物技术有限公司提供), 以已知的北京地区 SARS 患者阳性血清作抗体, 证实呈强阳性反应. 正常人对照血清呈阴性结果.

图 4 S 蛋白肽指纹图谱(a)及其 Mascot 搜寻结果(b)
(a) 带 * 标记的峰来源于 S 蛋白经胰蛋白酶消化的肽段. (b) Mascot 数据库检索结果(蛋白分值大于 52 为显著性差异, $P < 0.05$); 序列号为 gil30173397; 分子量 141260; 分值 174; 属 E2 糖蛋白前体(包膜突起蛋白)

2.6 免疫方案

共用 140 只 BAL B/c 小鼠分 7 组每组 20 只, 分别为灭活疫苗组(各取 0.1, 1 和 3 μg 灭活疫苗)、灭活疫苗加佐剂组(剂量也分别为 0.1, 1 和 3 μg , 氢氧化铝终浓度为 0.6 mg/mL)和对照组, 以上各组疫苗分别免疫 BAL B/c 小鼠 2 次, 第 1 次和第 2 次相隔 3 周, 第 1 次免疫后 3 周和第 2 次免疫 1 周后取血清测抗体.

2.7 免疫应答

如表 1 和 2 所示: (1)第 2 次免疫后抗体水平高于第 1 次免疫后的抗体水平; (2)免疫剂量越大, 所诱导的免疫应答越强, 抗体滴度越高; (3)加入氢氧化铝佐剂组抗体略高于不加佐剂组.

3 讨论

本文介绍了一种 SARS-CoV 病毒的灭活纯化方法, 实验证明 SARS-CoV 在 Vero 细胞中大量扩增后, 用 β -丙内酯灭活、纯化后得到的灭活疫苗能够诱导小鼠产生抗体, 为最终研制有效的疫苗跨出了扎实的一步.

3.1 免疫方案

SARS-CoV 为新生病毒疾病, 没有现成的方案可

图 5 N 蛋白肽指纹图谱(a)及其 Mascot 搜寻结果(b)
(a) 带 * 标记的峰来源于 N 蛋白经胰蛋白酶消化的肽段. (b) Mascot 数据库检索结果(蛋白分值大于 52 为显著性差异, $P < 0.05$); 序列号为 gil30173007; 分子量 45997; 分值 212; 属核衣壳蛋白

表 1 小鼠第 1 次免疫后 3 周取血的 ELISA 结果

灭活疫苗剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$	抗 SARS-CoV 病毒抗体滴度(2^n)	
	无佐剂组	加佐剂组
0.1	6 ± 0	5.7 ± 0.6
1	9.7 ± 0.6	11.3 ± 0.6
3	9 ± 0	12.75 ± 1.5

表 2 小鼠第 2 次免疫后 1 周取血的 ELISA 结果

灭活疫苗剂量/ $\mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$		抗 SARS-CoV 病毒抗体滴度(2^n)	
第 1 次	第 2 次	无佐剂组	加佐剂组
0.1	0.1	9.5 ± 1.0	10.25 ± 1.3
1	1	12.25 ± 1.7	13.4 ± 1.8
3	3	13 ± 0	16 ± 0

供参考. 我们参照以往流感病毒疫苗研究经验, 提出了免疫 2 次, 相隔 3 周的免疫方案^[11,12]. 在第 1 次免疫后 3 周和第 2 次免疫后 1 周采血测抗体, 免疫结果表明两次免疫均能产生较佳免疫应答. 目前临床上流感病毒灭活疫苗采用 2 次免疫的方案. 实践证明 2 次免疫对于预防流感效果很好, 但近期有报道认为免疫 1 次流感疫苗也能提供保护, 至少能提供部分保护. 依据我们对其他呼吸道疾病疫苗的研究经验, 认为 2 次免疫效果较佳, 在流行期或紧急情况下 1 次

免疫 SARS-CoV 灭活疫苗能否提供保护或部分保护则需看临床试用的结果确定,而这个结果往往需要经过两个流行期才能确定。

3.2 制备工艺和免疫佐剂

我们初步探索了灭活疫苗的生产工艺。选用 β -丙内酯灭活 SARS-CoV, 主要考虑到 β -丙内酯是一种烷化试剂, 能通过与核酸的嘌呤碱(主要是鸟嘌呤)的反应破坏核酸的结构。 β -丙内酯广泛应用于 DNA 和 RNA 病毒的灭活^[13~16]。灭活病毒后选用 Sepharose 4FF 层析柱纯化病毒颗粒。我们曾将未经 Sepharose 纯化的粗抗原免疫小鼠, 未能测到明显的抗体(结果未显示), 认为可能是杂蛋白起了免疫干扰作用, 影响了动物的正常免疫应答反应。实验结果显示, 纯化制作工艺能够满足动物实验要求。我们选择氢氧化铝 $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ 作为佐剂, 因为它是 WHO 推荐的一种已广泛应用于各种菌疫苗(白喉、破伤风类毒素和百日咳疫苗)的佐剂, 是一种安全的佐剂^[17~19]。实验结果显示加入佐剂组抗体略高于不加佐剂组。但未来的 SARS-CoV 疫苗是否用 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 作佐剂, 以及大规模生产时采用的工艺可能有所不同, 有待于生产厂家进一步探索。

3.3 展望

我们的实验显示, 研制有效的疫苗预防 SARS-CoV 是可能成功的, 尽管还有许多工作要做。可能还有一些科学工作者会对我们的灭活疫苗纯化方法甚至灭活疫苗本身存在异议, 担心灭活疫苗不安全, 以及 RNA 链在 β -丙内酯的作用下是否完全断裂, 万一有个别病毒颗粒内存在没有完全断裂的 RNA 是否会造成安全问题。针对这些问题, 部分科学工作者可能建议研制亚单位疫苗, 亚单位疫苗在技术上应该是可行的, 同时生产费用也不是非常昂贵, 但是, 亚单位疫苗的一些抗原表位永远不能达到灭活疫苗自然状态下抗原表位所具有的诱导免疫反应的作用。同时, 选择一个基因或者多个基因制备亚单位疫苗尚有待于实验证实。我们面临的另一个问题是目前使用的 BJ01 株是否具有个体的代表性。假如 SARS-CoV 重新流行, 它是否产生广泛的变异尚不得而知。大规模生产 SARS-CoV 灭活疫苗可能还考虑到生产场地的问题, 只有在 P3 实验室才能进行病毒的大规模扩增, 如果能找到代替目前 SARS-CoV 株的弱毒株用于病毒生产可能有助于这些问题的解决。

这些工作目前正在进行。

参 考 文 献

- 1 Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 2003, 300(5624): 1394~1399
- 2 Ruef C. SARS—a fast moving infectious disease. *Infection*, 2003, 31(3): 135
- 3 Dye C, Gay N. Epidemiology. Modeling the SARS epidemic. *Science*, 2003, 300 (5627): 1884~1885
- 4 Enserink M. SARS in China. The big question now: will it be back? *Science*, 2003, 301 (5631): 299
- 5 Pearson H, Clarke T, Abbott A, et al. SARS: what have we learned? *Nature*, 2003, 424 (6945): 121~126
- 6 Steinhoff M C. Viral vaccines for the prevention of childhood pneumonia in developing nations: priorities and prospects, *Rev Infect Dis*, 1991, 13(Suppl 6): 562~570
- 7 Lieu T A, Thompson K M, Prosser L A, et al. Emerging issues in vaccine economics: perspectives from the USA. *Expert Rev Vaccines*, 2002, 1(4): 433~442
- 8 Rappuoli R, Miller H I, Falkow S. Medicine. The intangible value of vaccination. *Science*, 2002, 297(5583): 937~939
- 9 Batson A. Sustainable introduction of affordable new vaccines: the targeting strategy. *Vaccine*, 1998, 16(Suppl): 93~98
- 10 秦鄂德, 祝庆余, 于曼, 等. SARS 相关病毒(BJ01 株)的全序列及其比较分析. *科学通报*, 2003, 48(11): 1127~1134
- 11 Chen Z, Sahashi Y, Matsuo K, et al. Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine*, 1998, 16(16): 1544~1549
- 12 Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, et al. Protection against influenza B virus infection by immunization with DNA vaccines. *Vaccine*, 2001, 19(11-12): 1446~1455
- 13 Budowsky E I, Friedman E A, Zheleznova N V. Principles of selective inactivation of viral genome. VII. Some peculiarities in determination of viral suspension infectivity during inactivation by chemical agents. *Vaccine*, 1991, 9(7): 473~476
- 14 Budowsky E I, Smirnov YuA, Shenderovich S F. Principles of selective inactivation of viral genome. VIII. The influence of beta-propiolactone on immunogenic and protective activities of influenza virus. *Vaccine*, 1993, 11(3): 343~348
- 15 Smith AL, de Souza MS, Finzi D, et al. Responses of mice to murine coronavirus immunization. *Arch Virol*, 1992, 125(1-4): 39~52
- 16 Stephan W, Dichtelmuller H, Prince A M, et al. Inactivation of the Hutchinson strain of hepatitis non-A, non-B virus in intravenous immunoglobulin by beta-propiolactone. *J Med Virol*, 1988, 26(3): 227~232
- 17 Gupta R K, Relyveld E H, Lindblad E B, et al. Adjuvants—a balance between toxicity and adjuvanticity, *Vaccine*, 1993, 11(3): 293~300
- 18 Clements C J, Griffiths E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine*, 2002, 20(Suppl3): 24~33
- 19 Theodore C E, Martin M. Workshop summary: Aluminum in vaccines. *Vaccine*, 2002, 20 (Suppl3): 1~4

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2003-48-22-2350> (2003-09-15 收稿, 2003-11-05 收修改稿)