

人轮状病毒 ZTR-5 株灭活疫苗的制备及小鼠血清免疫学评价*

贾琴妹¹ 吴晋元¹ 易 山¹ 张光明¹ 郜 岩² 杨 星¹ 赵晓南¹ 孙茂盛¹ 李鸿钧^{1**}

(1 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 昆明 650118)

(2 昆明医学院 昆明 650031)

摘要 目的: 研究人轮状病毒 ZTR-5 株灭活疫苗的制备及在实验小鼠中的免疫原性评价。方法: 轮状病毒 ZTR-5 株在 MA104 细胞上经蚀斑筛选纯化后, 获得单一克隆接种至 Vero 细胞上适应性培养, 免疫荧光定量检测病毒的感染性滴度, 对收获的病毒液进行离心、超滤、分子筛纯化, 甲醛灭活, 抗原定量检测 Al(OH)₃ 吸附制备的实验性疫苗。使用不同剂量(8EU、32EU、128EU、256EU)经肌肉注射免疫小鼠, 共免疫三次, 免疫间隔 2 周。采用间接 ELISA 法检测血清特异性抗体效价。结果: 通过蚀斑纯化, 筛选得到一株纯化的病毒株 ZTR-5 纯-1, 在 Vero 细胞上适应性后感染性滴度达 7.35logCCID₅₀/ml; 大量培养收获的病毒原液滴度为 7.57logCCID₅₀/ml, 制备获得轮状病毒样品抗原含量为 2560EU/ml; 经肌肉注射, 初次免疫后, 所有剂量组动物均获得抗体阳转, 阳转率为 100%; 第一次加强免疫后, 各组血清特异性抗体水平均明显增高, 免疫剂量为 128EU 和 256EU 的两组小鼠血清抗体效价均达 1:10240; 第二次加强免疫后, 各剂量组(8EU、32EU、128EU、256EU)血清抗体效价依次达 1:5120, 1:7456, 1:14481.54, 1:14481.54。结论: 人轮状病毒 ZTR-5 株可在 Vero 细胞上稳定增殖, 所制备的疫苗具良好免疫原性, 用 128EU/2 次免疫即可获得良好的免疫效果。

关键词 人轮状病毒 Vero 细胞 灭活疫苗 免疫试验

中图分类号 Q939.4

人轮状病毒(human rotavirus, HRV)是引起 5 岁以内婴幼儿严重腹泻最主要的病原体。轮状病毒感染导致的婴幼儿急性腹泻每年在世界范围内可造成近百万儿童死亡^[1]。用疫苗预防轮状病毒感染、降低重症死亡率是有效手段。而目前国内外市场上的轮状病毒疫苗都为减毒活疫苗, 虽能在人群中产生一定的保护作用, 但存在毒力返祖的危险和潜在的副反应。因此, 研究安全有效的灭活疫苗是预防轮状病毒感染的一项重要策略。本研究通过蚀斑筛选纯化获得毒力较强的克隆病毒 ZTR-5 纯-1 株, 并对该毒株在 Vero 细胞上适应

性培养、大量制备, 将收获的病毒原液进行离心、超滤、分子筛纯化, 甲醛灭活、病毒抗原量测定, 而后将制备得到的实验性疫苗免疫小鼠及对免疫效果进行评价。

1 材料与方法

1.1 病毒株及细胞

人轮状病毒 ZTR-5 株(血清型为 P[2]G3)由云南省昭通市医院儿科腹泻病患幼儿腹泻排泄物标本中分离获得, 轮状病毒实验室标准株 Wa 株(P[8]G1)、SA11 株(P[2]G3)和猴肾细胞 MA104(第 27 代)及 Vero 细胞(第 148 代)由中国医学科学院医学生物学研究所分子生物室保存。

1.2 主要试剂和仪器

MEM 培养基、双抗、碳酸氢钠和谷氨酰胺由该所

收稿日期: 2011-06-22 修回日期: 2011-08-16

* 云南省社会发展科技计划(2008CA028)、云南省应用基础研究计划(2009CD142)资助项目

** 通讯作者, 电子信箱: lihj6912@hotmail.com

生物制品四室提供;新生牛血清购自兰州民海生物工程有限公司;豚鼠抗轮状病毒 ZTR-5 纯-1 株全病毒颗粒多克隆抗体由中国医学科学院医学生物学研究所分子生物室制备;FITC 标记的兔抗豚鼠 IgG 购自德国 Sigma 公司;小量病毒 RNA/DNA 抽提试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司;HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 购自美国 Thermo 公司;轮状病毒酶标试剂盒购自兰州生物制品研究所。

Forma Series II CO₂ 培养箱为美国 Thermo 公司产品;ECLIPSE E600 荧光显微镜为日本 Nikon 公司产品;200/2.0 Power Supply 垂直电泳仪为美国 BIO-RAD 公司产品。

1.3 实验动物

18~20 g 雌性 Balb/c 小鼠,购自昆明医学院实验动物中心。

1.4 病毒的蚀斑筛选纯化实验

轮状病毒 ZTR-5 株在 MA104 细胞蚀斑筛选纯化方法参见文献报道^[2]。按以上方法进行 3 次蚀斑纯化。

1.5 轮状病毒在 Vero 细胞上的适应性培养

用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基培养 Vero 细胞,待细胞长成单层后,按 0.05 MOI 接种经蚀斑筛选获得的 ZTR-5 纯-1 株病毒^[3],观察细胞病变(CPE)情况,待 CPE 达+++~++++时,收获病毒液,按上述方法连续传 10 代。其具体操作见参考文献^[4]。

1.6 病毒滴度的测定

取病毒 10 倍系列稀释,接种 MA104 单层细胞进行 CCID₅₀ 检测^[5]。将 MA104 细胞按 1.5×10^4 个/孔接种在 96 孔板上,于 37℃,5% CO₂ 孵箱中培养至长成致密单层,加入 10 倍系列稀释的病毒,稀释度从 10^{-1} ~ 10^{-8} ,每个稀释度设 10 个孔,37℃ 吸附 1h 后加入不含小牛血清的 DMEM 细胞维持液,37℃ 培养 16h 后,采用等体积甲醛溶液 4℃ 固定 30 min,洗净甲醛,随后依次加入用 5% BSA-PBS pH7.2 溶液稀释的豚鼠抗轮状病毒 ZTR-5 纯-1 株全病毒颗粒多克隆抗体(1:500 稀释)和 FITC 标记的兔抗豚鼠 IgG(1:2 000 稀释),且每次加完抗体后在 37℃,5% CO₂ 条件下孵育 60min 并洗板,最后一步洗板后在荧光显微镜下观察结果。

1.7 病毒基因组检测

采用小量病毒 RNA/DNA 抽提试剂盒提取病毒基因组 RNA,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、银染,检测病毒的核酸带型^[6]。

1.8 病毒原液的大量制备

在容积为 2L 的转瓶中用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基培养 Vero 细胞,待细胞长成单层后,将经 20 μg/ml 的胰酶 37℃ 水浴下激活的病毒接种到转瓶中,并在含终浓度为 0.5 μg/ml 乙酰化胰酶的 MEM 维持液中培养。按以上方法接种 10 个转瓶,每个装瓶含病毒液与维持液总共 200ml。设等体积、等胰酶浓度的 Vero 细胞作为对照,于 37℃,5% CO₂ 孵箱内培养。

1.9 实验性灭活轮状病毒疫苗的制备

将病毒液离心、超滤、分子筛纯化后,在纯化病毒液中加入终浓度 0.009 25% 甲醛灭活,而后加入 Al(OH)₃ 吸附及采用 ELISA 法进行抗原定量检测。

1.10 血清免疫学评价

18~20g 雌性 Balb/c 小鼠,经 ELISA 检测血清轮状病毒抗体,抗体阴性且无其他病原体感染的小鼠用于实验。用于免疫的轮状病毒样品与 Al(OH)₃ 吸附制备的实验性疫苗经抗原定量后,设立四个实验组:依次为 8EU、32EU、128EU、256EU 的灭活轮状病毒抗原(ZTR-5 纯-1 株)免疫剂量组和一个阴性对照组。每组 6 只小鼠,免疫途径为肌肉注射,共免疫 3 次,免疫间隔为两周,加强免疫两次。每次免疫两周后尾静脉采血,分离血清。采用间接 ELISA 法检测血清抗体效价^[7]。其具体检测过程见参考文献^[4]。

2 结果

2.1 病毒的蚀斑筛选纯化

病毒接种 MA104 细胞后约 2~3 天出现蚀斑,蚀斑较小,平均直径约 1.5mm。随着病毒稀释度的增加,蚀斑数目呈现递减。在病毒稀释度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 下,蚀斑数目、形态大小比较适合用于挑斑。用巴氏管吸取出周边较规则,直径约 1.5mm 的蚀斑即 ZTR-5 纯-1。3 次蚀斑后,蚀斑大小形态一致,表明病毒株已获纯化,扩培后作为毒种,用于接种 Vero 细胞(图 1)。

2.2 轮状病毒 ZTR-5 纯-1 株在 Vero 细胞上的适应性生长

选择在 MA104 细胞上培养的第 4 代病毒收获液接种至 Vero 细胞,进行适应性生长,37℃ 培养观察细胞病变情况。首代在培养 7 天后出现少量细胞病变情况,待传代至第 5 代后,病毒已适应 Vero 细胞,接种 4~5 天后即可出现典型 CPE(图 2)。

2.3 病毒的感染性滴度

检测结果如图 3 所示,随传代代次增加,病毒的感

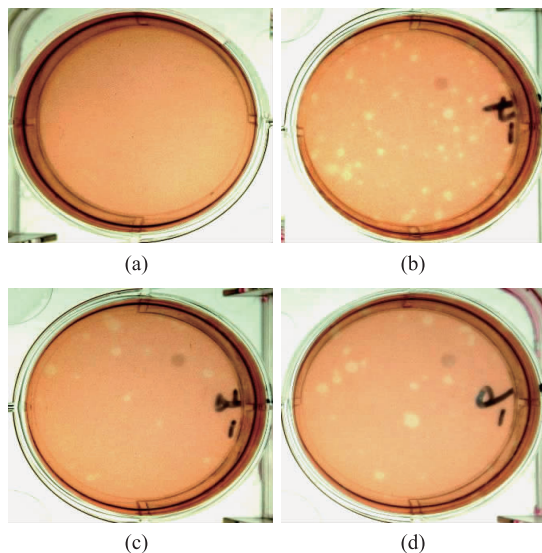


图1 轮状病毒 ZTR-5 株蚀斑筛选纯化
Fig.1 Purification of rotavirus ZTR-5 strain
by plaque screening

(a) Negative control (b) Dilution of 10^{-4} (c) Dilution of 10^{-5} (d) Dilution of 10^{-6}

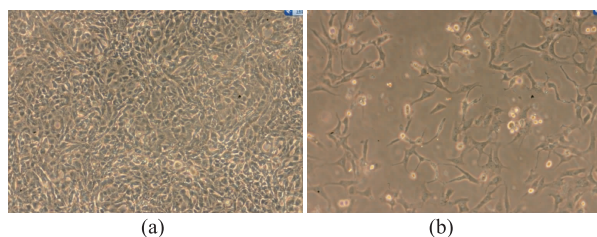


图2 轮状病毒 ZTR-5 纯-1 株感染
Vero 细胞后 CPE(×40)

Fig.2 CPE of Vero cells infected with rotavirus
ZTR-5 pure-1 strain(×40)

(a) Uninfected Vero cells (b) CPE of Vero cells after infection
with ZTR-5 pure-1 strain

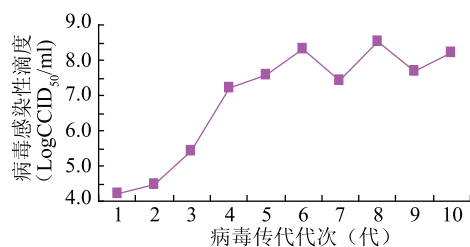


图3 病毒 1 ~ 10 的感染性滴度

Fig.3 Infectious titers of rotavirus ZTR-5
pure-1 strain of passages 1 ~ 10

染性呈上升趋势,并于第五代次达到最高感染性滴度。随时间增加,病毒的感染性呈上升趋势,病毒在培养 12h 后感染性颗粒出现明显增殖,病毒感染性滴度达到

4.75 logCCID₅₀/ml,并于 4 天达到最高感染性滴度 7.35logCCID₅₀/ml,但继续培养至 8 天,病毒感染性滴度呈下降趋势。确定该毒株在 Vero 细胞上培养 4 天为最适培养时间(图 4)。

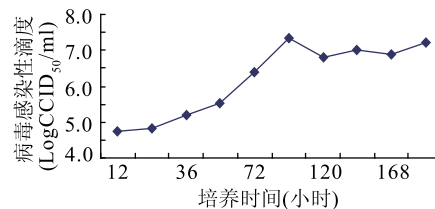


图4 病毒在 Vero 细胞上增殖动力学曲线

Fig.4 Proliferation kinetics of rotavirus
ZTR-5 pure-1 strain in Vero cell

2.4 病毒的遗传稳定性

PAGE 结果显示,在 Vero 细胞中继续传代 10 代过程中,轮状病毒 ZTR-5 纯-1 株基因组的核酸带型保持一致,呈典型的 4:2:3:2 型,表明轮状病毒 ZTR-5 纯-1 株在适应性培养过程中保持良好的遗传稳定性(图 5)。

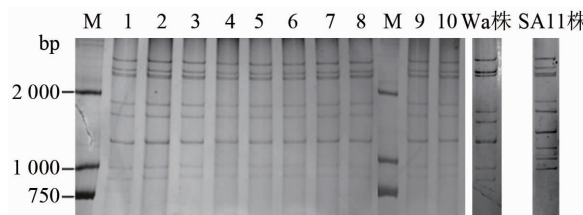


图5 轮状病毒 ZTR-5 纯-1 株 1 ~ 10 代及实验室标准株
(Wa 株、SA11 株)的基因组核酸带型

Fig.5 Nucleic acid band pattern of genome of rotavirus
ZTR-5 pure-1 strain of passages 1 ~ 10 and laboratory
standard strain (Wa strain, SA11 strain)

M: DNA Marker DL 2000; 1 ~ 10: Rotavirus ZTR-5 pure-1 strain
of passages 1 ~ 10

2.5 实验性轮状病毒灭活疫苗

待转瓶中细胞病变(CPE)达+++~++++时,收获病毒液,50 个转瓶共收获 10L 病毒原液,其滴度为 7.57logCCID₅₀/ml。其后将病毒原液离心、超滤、分子筛纯化,收获 100ml 病毒液,甲醛灭活且与 Al(OH)₃ 吸附后轮状病毒样品抗原定量测定结果为 2560EU/ml 的轮状病毒抗原量。

2.6 病毒血清免疫学评价

实验结果显示,实验性灭活轮状病毒疫苗初次免疫后所有剂量组获得特异性抗体阳转,阳转率为 100%;随免疫剂量和次数增加,血清特异性抗体水平

增高,且免疫接种 128EU 剂量 2 次达到较好的免疫效果(表 1,图 6)。

表 1 灭活轮状病毒样品免疫小鼠后血清特异性抗体效价
Table 1 Serum specific antibody titers after immunization with inactivated rotavirus samples in mic

实验组	免疫程序	免疫剂量	血清 IgG 效价 (Titers, GMT)
第一组	肌注, 3 次免疫	8EU	5 120.00 ± 256
第二组	肌注, 3 次免疫	32EU	7 240.77 ± 316.45
第三组	肌注, 3 次免疫	128EU	14 481.55 ± 1 024
第四组	肌注, 3 次免疫	256EU	14 481.55 ± 1 024

Serum rotavirus specific IgG antibodies were detected starting at a dilution 1:10; The data are expressed as the reciprocal of serum antibody titers (GMT ± S. E. M.); Serum rotavirus specific IgG antibody titers by t test, (P < 0.005)

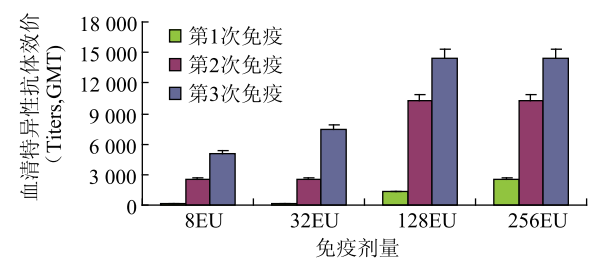


图 6 不同免疫剂量的血清特异性抗体水平变化趋势情况
Fig. 6 Trend of specific antibody levels of different doses of immune

3 讨论

轮状病毒感染引起的婴幼儿轮状病毒性腹泻多发生在秋冬季,且 A 群轮状病毒引起的腹泻占病例总数的 50% 以上,其发病率和严重程度属秋冬季腹泻之首^[8]。实验中的 ZTR-5 来自于 2009 年秋季云南省昭通地区发生的小儿(小于 5 周岁)腹泻住院及门诊病例粪便样本中的病毒毒株,通过特异性轮状病毒抗原筛查、轮状病毒 dsRNA-PAGE 电泳及 VP4, VP7, NSP4 基因 RT-PCR 扩增及测序,筛选得到 1 株病毒复制能力强且遗传稳定性好的轮状病毒毒株,命名为 ZTR-5,属于 P[2]G3 型轮状病毒。通过对 ZTR-5 毒株 11 个 RNA 片段进行 RT-PCR 并构建基因文库及测序,获取了 ZTR-5 毒株全基因组片段的基因序列。ZTR-5 毒株全基因共 18 055 个碱基,确定该毒株属轮状病毒 A 群轮状病毒,其准确基因为 G3-P[2]-I2-R2-C5-M5-A5-N5-T5-E2-H5 (VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5),简称 P[2]G3 型轮状病毒(这部分由本实验室其他人员完成)。目前提出控制轮状病毒

的主要手段在于:健全和完善轮状病毒流行病学监测系统,开发高效安全的轮状病毒疫苗。轮状病毒灭活疫苗是开发轮状病毒疫苗可行的一项策略。许多病毒如脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒在开发减毒活疫苗后,又成功开发出相应的灭活疫苗,两类疫苗互相补充,为疾病的预防提供了多种手段。这些疫苗的研发为轮状病毒灭活疫苗的研制也提供了一定的思考和基础。在制备实验性灭活疫苗过程中发现蚀斑筛选试验中同一来源的毒株存在蚀斑形态上的差异。按该病毒一般特性筛选出毒力较强的大斑,筛选出的斑适应到 Vero 细胞上刚开始会出现病毒复制下降以及复制时间延长,在 Vero 细胞上传代后,随着传代代次的增加,表现出感染性滴度和增殖能力增强的趋势,最终达到稳定增殖。基因组检测表明病毒传代培养过程中病毒基因核酸带型保持不变及病毒在适应性培养过程中保持良好的遗传稳定性。在规模化制备中发现病毒滴度易受多种因素的影响,如病毒的感染复数(MOI)、细胞密度及质量或者它们的交叉作用均会对病毒的滴度产生显著影响。实验中灭活病毒采用的方法是化学方法(甲醛灭活),与有关文献报道的热灭活方法相比,甲醛灭活更完全。实验性灭活轮状病毒疫苗以不同剂量分组免疫小鼠后,引起的免疫反应具有剂量依赖性和记忆效应,随免疫剂量和次数增加,血清轮状病毒特异性抗体水平呈增高趋势,第一次加强免疫后,各剂量组的抗体水平明显增加,第二次加强免疫后抗体水平达到最高值,但较第一次加强免疫后抗体效价升高不显著。此外,与有关文献报道的 Al(OH)₃ 吸附制备的热灭活轮状病毒样品免疫效果相比较,实验中免疫的小鼠血清抗体效价达到较高水平,可能与疫苗制备的方法或者病毒本身有关。这项研究为使用轮状病毒 ZTR-5 纯-1 毒株研究灭活轮状病毒疫苗提供了重要依据。

参考文献

[1] De Vos B, Vesikari T, Linhares A C, et al. A rotavirus vaccine for prophylaxis of infants against rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J*, 2004, 23(10 suppl): S179-S182.

[2] Estes M K, Graham D Y. Identification of rotaviruses of different origins by the plaque reduction test. *Am J Vet Res*, 1980, 41(1):151-152.

[3] 张永欣,刘馨,张光明,等. Vero 细胞微载体技术规模化培养轮状病毒. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(4): 336-337,348.

Zhang Y X, Liu X, Zhang G M, et al. *Chin J Biologicals*, 2008,

- 21 (4):336-337, 348.
- [4] 马应霞,易山,张光明,等. 轮状病毒 P[8]G1 株在 KMB17 细胞上的适应性及其免疫原性. 中国生物制品学杂志,2010,23(9):942-945.
- Ma Y X, Yi S, Zhang G M, et al. Chin J Biologicals, 2010, 23(9):942-945.
- [5] Ciarlet M, Sani-Grosso R, Yuan G, et al. Concomitant use of the oral pentavalent humanbovine reassortant rotavirus vaccine and oral poliovirus vaccine. Pediatr Infect Dis J, 2008, 27(10): 874-880.
- [6] Armah G E, Steele A D, Binka F N, et al. Changing patterns of rotavirus genotypes in Ghana: emergence of human rotavirus G9 as a major cause of diarrhea in children. J Clin Microbiol, 2003, 41 (6): 2317-2322.
- [7] 胡必勇,陈茂义,张齐良. 酶联免疫吸附试验检测轮状病毒效果研究. 中国科技信息, 2005, (17):252-253.
- Hu B Y, Chen M Y, Zhang Q L. China Science and Technology Information, 2005, (17):252-253.
- [8] Qiao H, Nifsson M, Abreu E R, et al. Viral diarrhea in children in Beijing China. J Med Virol, 1999, 57(4): 390-396.

Preparation and Immunogenicity of a Scalable Inactivated Vaccine, Strain ZTR-5 in Mice

JIA Qin-mei¹ WU Jin-yuan¹ YI Shan¹ ZHANG Guang-ming¹
GAO Yan² YANG Xing¹ ZHAO Xiao-nan¹ SUN Mao-sheng¹ LI Hong-jun¹

(1 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 650118, China)

(2 Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

Abstract Objective: To study preparation and immunogenicity of a scalable inactivated human rotavirus vaccine, strain ZTR-5 in mice. Method: The clones of rotavirus ZTR-5 strain cultured in MA104 cells were purified by plaque screening and inoculated to Vero cell for adaptive cultivation, then determined for infectious titer by FFA, the harvest virus solution was purified by Centrifugation, ultrafiltration and molecular sieve, then inactivated by formaldehyde, quantitatively detected for content of antigen with Al(OH)₃ adsorption which was experimental vaccine. Using different doses (8EU, 32EU, 128EU, 256EU) immunized mice by intramuscular injection, a total of three immune and immune interval of 2 weeks. Detected for the serum antibody titers by indirect ELISA. Results: By plaque purification, screened a purified strain that was the virus ZTR-5 pure-1, and infectious titer reached 7.35logCCID₅₀/ml after adaptive cultivation in Vero cells. The infectious titer of virus original solution acquired after large-scale cultivation was 7.57logCCID₅₀/ml, and the antigenic content of the manufactured and obtained rotavirus samples was 2 560EU/ml. All animals of dose group had received positive seroconversion after the initial immunization by intramuscular injection and seroconversion rate was 100%. After the first booster immunization, the serum antibody levels were significantly higher, and the mice serum antibody titers of the two dose groups (256EU and 128EU) reached 1:10 240. After the second booster immunization, each dose group (8EU, 32EU, 128EU, 256EU) serum antibody titers followed up 1:5 120, 1:7 456, 1:14 481.54, 1:14 481.54. Conclusion: Human rotavirus ZTR-5 strain was stably proliferated in Vero cell, and the prepared vaccine had good immunogenicity and got a good immune effects with 128EU / 2 times.

Key words Human rotavirus Vero cells Inactivated vaccine Immunity test