



第八次全国生物制品学术会议 论文汇编 2004-2005

中国微生物学会生物制品专业委员会

中华预防医学会生物制品分会

2005. 昆明



中国医学科学院
中国协和医科大学

医学生物研究所

INSTITUTE OF MEDICAL BIOLOGY CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES & PEKING UNION MEDICAL COLLEGE

简介

中国医学科学院医学生物研究所建于1958年，是集医学科研究和生物制品生产为一体的研究所。主要从事医学病毒学、微生物学、免疫学、分子生物学、医学遗传学、生物工程、实验动物学等基础和应用研究，进行疫苗、免疫制品和基因工程产品的规模化生产以及以灵长类动物为主的实验动物饲养、繁殖及有关研究。是世界卫生组织（WHO）首批认可的“WHO肠道病毒参考研究合作中心”，是中国协和医科大学硕士和博士学位授予点。

目前主要产品有脊髓灰质炎减毒活疫苗（糖丸、液体）、甲型肝炎减毒活疫苗、甲型肝炎灭活疫苗、甲型肝炎减毒活疫苗（冻干剂型）、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子转移因子、胸腺肽等。正在研制开发的还有甲-乙型肝炎联合疫苗、脊髓灰质炎灭活疫苗、重组人结缔组织生长因子以及一些基因工程多肽药物，与美国共同研制的爱滋病疫苗等。

研究所已建成欧洲GMP标准的生物制剂现代化大规模生产厂房和全国最大的甲型肝炎疫苗工业性实验生产基地，为研制开发高质量的生物制品提供了有利条件。1万平方米科研大楼，齐全先进的仪器设备，为基础和应用开发研究提供了良好的条件。所属的全国医学灵长类研究中心是药物、疫苗开发研制评价的重要实验基地。饲养猕猴在数量、质量、遗传背景上都处于世界领先。



研究所已建成欧洲GMP标准的生物制剂现代化大规模生产厂房和全国最大的甲型肝炎疫苗工业性实验生产基地，为研制开发高质量的生物制品提供了有利条件。1万平方米科研大楼，齐全先进的仪器设备，为基础和应用开发研究提供了良好的条件。所属的全国医学灵长类研究中心是药物、疫苗开发研制评价的重要实验基地。饲养猕猴在数量、质量、遗传背景上都处于世界领先。

研究所在人事制度和分配制度方面的改革已取得了一些进展和成效，为适应今后研究所的改制发展奠定了基础。如今，研究所已发展成为一个以高科技为坚实后盾，以疫苗、生物技术产品为主导产业，具备拥有生物技术开发、生物制品研制与生产较强实力的现代化综合性研究所。

INSTITUTE OF MEDICAL BIOLOGY
CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES & PEKING UNION MEDICAL COLLEGE



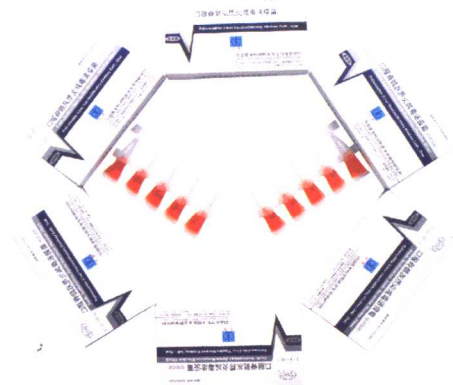
中国医学科学院
中国协和医科大学 医学生物学研究所

INSTITUTE OF MEDICAL BIOLOGY CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES & PEKING UNION MEDICAL COLLEGE

新产品介绍

液体型口服脊髓灰质炎减毒活疫苗

中国医学科学院医学生物学研究所最新开发的液体型口服脊髓灰质炎减毒活疫苗 (LOPV) 于2000年获得国家食品药品监督管理局颁发的药品生产批准文号。LOPV与糖丸剂型口服脊髓灰质炎减毒活疫苗 (OPV) 同样具有良好的免疫原性和安全性, 热稳定性优于糖丸剂型, 易运输保存。LOPV适宜所有需要进行免疫的人群。特别适用于婴儿免疫。LOPV采用进口低密度聚乙烯 (LDPE: Low-Density Polyethylene) 塑料管分装符合药品、生物制品包装要求, 最小量为/瓶 (10人份)。



甲型肝炎灭活疫苗 (维赛瑞安)

中国医学科学院医学生物学研究所承担的国家重点攻关课题“甲型肝炎灭活疫苗”取得突破性进展, 于2003年正式获得1992年首家获得国家食品药品监督管理局颁发的新药证书和生产批准文号, 2004年1月其生产车间通过GMP认证。所生产的甲型肝炎灭活疫苗 (维赛瑞安) 免疫原性好, 阳转率高, 接种后产生抗体快, 适合做应急性接种, 可用于控制甲型肝炎的暴发流行及预防性接种。

冻干剂型甲型肝炎减毒活疫苗 (维赛瑞吉)

中国医学科学院医学生物学研究所研制的冻干剂型甲型肝炎减毒活疫苗 (H2株), 经实验证明其冻干前后感染性滴度无显著变化, 热稳定性明显优于液体疫苗, 易运输保存; 经临床研究表明具有良好的临床安全性和免疫原性; 能较快地诱导抗体产生, 并达到较高的抗体滴度, 从而更快地产生对机体的保护效果。



地址: 昆明市茭菱路379号
电话: 0871-8334326 0871-8334521
传真: 0871-8334483
邮编: 650118

目 录

论 著

- 细菌多糖—蛋白质结合疫苗研究进展..... 谢贵林(1)
- 全球脊髓灰质炎免疫现状及其挑战..... 姜述德(4)
- 重组牛肠激酶在大肠杆菌中的表达及制备..... 范 开等(5)
- 单管一步产物增强性逆转录反应的建立及其对疫苗生产用细胞基质
逆转录酶活性的检测 范小勇等(9)
- 液质联用分析重组人白细胞介素-11 的肽图..... 杨 英等(16)
- CDAP 活化多糖制备副甲多糖结合疫苗 秦 敏(22)
- 三种不同载体的 C 群脑膜炎球菌荚膜多糖-蛋白质结合疫苗比较研究..... 吴 兵等(28)
- 幽门螺杆菌肽脱乙酰基酶基因的高效表达及包涵体复性研究 么山山等(35)
- 对我国 GMP 发展的几点思考 姜典才等(40)
- 对我国生物制品批签发工作的几点思考 李凤祥等(42)
- 中国百日咳疫苗生产株 S1 和 Prn 蛋白基因序列分析 徐颖华等(44)
- 狂犬病疫苗与长生扶康联合免疫预防狂犬病效果的研究 张 路等(51)
- 双抗体夹心法酶联免疫诊断试剂盒在狂犬病街毒的应用 徐葛林等(55)
- 人源抗狂犬病毒 G 蛋白单链抗体 (ScFv) 的表达和鉴定 闭 兰等(59)
- 中国及亚洲地区狂犬病毒的分子流行病学研究 陈波等(63)
- 直接病变法检测牛腹泻病毒的方法建立与验证 陈波等(68)
- 干扰素 α 1b 在美国进行的 I 期临床试验: 一种耐受性较好的干扰素? 童 塘等(75)
- 干扰素 α 1b 突变体的高效表达、纯化及生物学活性研究 陈朝洪等(84)
- 用骨髓间充质干细胞及基因治疗方法对大节段骨损伤的修复..... 王之田等(85)
- HSV-1 VP22 和 hIL-18 增强 HBV DNA 微球疫苗诱导的小鼠体液免疫应答 瞿 素等(94)
- HCV 多表位抗原融合肽的表达与免疫原性的研究 傅 涛等(100)
- 乙肝病毒 DNA 疫苗双表达载体的构建及其诱导小鼠的免疫应答..... 冷 梅等(105)
- 重组 sTRAIL 分子对 K562 细胞的凋亡作用..... 田生和等(110)
- Vero 细胞蛋白过敏原性研究、定性及定量检测的探索性研究..... 田 博等(114)
- 阿尔采默氏病治疗性疫苗原核表达载体的构建..... 吴永革等(120)
- 利用人 U6 snRNA 启动子构建 RNA 干扰质粒载体..... 楚莉辉等(125)
- 用微载体培养 Vero 细胞制备狂犬疫苗..... 李平忠等(131)
- 50L 生物反应器培养狂犬病毒工艺研究..... 孙 文等(135)
- 结核分枝杆菌 CFP10、MTB 38 和 MTB 48 抗原基因克隆及在大肠杆菌中的
表达纯化..... 叶 凡等(138)

用体内激活的启动子调控 HCV 核心抗原表达可增强重组鼠伤寒

沙门氏菌的免疫原性·····	廖小玲等(145)
重组天花蛋白突变体质量标准的研究和建立·····	韩春梅等(151)
减毒株灭活脊髓灰质炎疫苗的研制·····	石慧颖等(157)
Vero 乙脑纯化疫苗生产工艺参数的研究·····	王 辉等(167)
江苏省 2003 年~2004 年预防接种不良反应报告系统工作运转情况及评估·····	张晋琳等(170)
不同色谱介质纯化人源破伤风毒素单克隆抗体的比较·····	赵 红等(172)
欧美流感疫苗等禽胚疫苗生产的自动化介绍·····	张晓秋等(176)

综 述

A 群脑膜炎球菌结合疫苗的临床研究进展 ·····	朱 为等(181)
α 1-抗胰蛋白酶的研究进展及临床应用前景·····	李 炜等(187)
富含 IgM 免疫球蛋白制剂的研究进展·····	王 焰等(192)
肠出血性大肠杆菌 O157 EspA 的研究进展·····	毛旭虎等(195)

摘 要

加强兽医生物制品产业技术平台的建设·····	张念祖(199)
反向疫苗学——疫苗研究的新策略·····	吴玉章(200)
含磷酸二酯键 CpG ODN 的脂质体乙肝疫苗的免疫原性和安全性研究·····	何春艳等(200)
HAV 吕 8 株生长特性及残余活毒检测方法的研究·····	谢忠平等(201)
采用药物净化方法培育清洁级叙利亚金黄地鼠·····	陈俏梅等(201)
采用银染法检测短串联重复序列 (STR) 位点鉴别 MRC-5 细胞·····	丁筱骏等(201)
HSV-1 病毒 ICP47 基因在大肠杆菌中的表达及其抗血清的制备·····	郭宏雄等(202)
丙型肝炎病毒抗原检测试剂在临床诊断中的初步运用·····	谢忠平等(202)
DNAzyme 抑制 H-ras 基因表达的研究·····	吕 峰等(203)
HIV1 中国流行株 RL42 Gp120 与 HBsAg 融合蛋白在毕赤酵母中的表达和纯化·····	李媛媛等(203)
重人组 CNTF 衍生物的构建、表达和活性分析·····	张振龙等(203)
重组人白细胞介素 1 8 在原核系统中高效表达的策略·····	杨京生等(204)
荧光染料 R-藻红蛋白标记小鼠抗人 CD4 单克隆抗体·····	赵亚杰等(204)
荧光标记 CD3/CD4/CD8 单克隆抗体的质量控制·····	孙可芳等(204)
小鼠 Vero 细胞测定白喉类毒素抗体方法的研究·····	杨邦玲等(205)
HepG2 2.2.15 细胞内 HBV 基因复制、转录和表达的研究·····	刘汉平等(205)
Fab 噬菌体抗体分子基因序列的分析和比较·····	张爱华等(205)
双抗体夹心 ELISA 与 NIH 法在狂犬病疫苗抗原检测中的比较·····	朱 蓉等(206)
呼吸道合胞病毒单克隆抗体的研制及初步应用·····	陈晓琦等(206)
囊虫特异性 IgG 快速检测试剂盒 (金标渗滤法) 的研制和考核·····	干小仙等(207)
乙型肝炎卡介苗联合疫苗稳定性的研究·····	赵小琳等(207)

重组 (CHO 细胞) 乙型肝炎疫苗生产工艺病毒灭活验证·····	赵小琳等 (208)
胸腺肽纯化前后抗白色念珠菌效果比较·····	迟春萍等 (208)
rhGM-CSF 联合 IFN α 2b 治疗慢性乙肝的初步临床研究·····	迟春萍等 (209)
人乳头瘤病毒 16 型 L1/E7 嵌合基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达·····	宋衍燕等 (209)
免疫核糖核酸 (iRNA) 特异性抗肿瘤的实验研究·····	郑晓霞等 (210)
重组 IFN α 2b 对小鼠的 CD ⁺ 16+56 细胞数量和 NK 细胞活性的影响·····	程晓耕等 (210)
流感病毒抗血清在小鼠流感早期感染中的保护作用的初步研究·····	迟宝琦等 (210)
重组人干扰素 α 1b 滴眼液稳定性的研究·····	崔颖杰等 (211)
病毒疫苗滴定用小牛血清的筛选·····	高 静等 (211)
乙型脑炎纯化疫苗的研究·····	韩 亮等 (211)
人用皮内注射布氏菌活疫苗的研究·····	李恪梅等 (212)
DNA 疫苗的安全性研究进展·····	洛淑萍等 (212)
中国株 HIV-1 B/C 亚型包膜蛋白真核表达载体的构建及稳定表达 细胞株的筛选 ·····	马红霞等 (213)
白细胞介素 12 对 HIV-1 疫苗免疫应答的增强作用·····	姜春来等 (213)
人乳头瘤病毒 16 型晚期蛋白 (L1) 基因重组 MVA 病毒的构建及鉴定·····	刘大维等 (213)
重组毕赤酵母生产干扰素 α -2b 的研究·····	蒲广西等 (214)
破伤风抗体酶联免疫诊断试剂盒的临床考核及人体破伤风抗体水平调查 ·····	邵 华等 (214)
HBV PreS2 融合蛋白在大肠杆菌 pMAL-P2x 系统中的表达·····	邵丽军等 (215)
人内皮素 1 基因的克隆表达及其诱发自身抗体的初步研究·····	石继红等 (215)
Vero 细胞森林脑炎疫苗毒种的选育及其生物学特性研究·····	宋宗明等 (215)
国产与进口 HBsAg ELISA 试剂盒筛检无偿献血者价值比较·····	孙文利等 (216)
SARS 冠状病毒核衣壳蛋白融合蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化·····	王宣军等 (216)
乙型肝炎卡介苗联合疫苗动物过敏试验的研究·····	王 志等 (217)
破伤风类毒素抗体酶免双抗原夹心法检测试剂研制及评价·····	张 燕等 (217)
乙型肝炎-卡介苗联合疫苗皮下免疫豚鼠安全试验病理学研究·····	赵亚力等 (217)
金黄地鼠耳螨病皮肤病理组织学观察·····	赵亚力等 (218)
重组人干扰素 α 2b 栓剂的检定及其临床疗效·····	郭 桥等 (218)
获得高效价抗-TT 原料血浆免疫方法的研究 ·····	杨 明等 (219)
使用 BCG 分子伴侣 Chaperonin10 进行融合蛋白的表达·····	张秀霞等 (219)
乙型肝炎卡介苗联合疫苗与单价乙型肝炎疫苗免疫效果的比较·····	金立杰等 (219)
BCG-CpG-DNA 免疫活性作用的初步研究·····	赵爱华等 (220)
第一代无细胞百日咳疫苗毒性国家参考品制备工艺的研究·····	侯启明等 (220)
建立检测金葡素注射液主要有效成分方法的研究·····	骆 鹏等 (221)
重组水蛭素生物学活性测定参考品的制备和标定·····	丁有学等 (221)

血吸虫病诊断试剂 IgG 抗体冻干免疫血清国家参考品的制备及标定·····	辛晓芳等 (221)
血吸虫诊断试剂质量评价·····	薄淑英等 (222)
含前 S1、前 S2 和 S 免疫决定簇乙肝表面抗原复合颗粒的表达和性质研究·····	谭昌耀等 (222)
S/D 法结合低 pH 孵释法在富含 IgM 的静注免疫球蛋白中的应用·····	郑朝共等 (223)
伤寒 Vi 多糖结合疫苗的研制·····	秦 敏 (223)
应用 ELISA 法定量检测正常人血浆中呼吸道合胞病毒 IgG 抗体水平·····	刘 菊等 (224)
改良双抗体夹心酶联免疫检测法测定细胞培养液中重组人活性蛋白 C (rhAPC)含量的方法研究·····	李 征等 (224)
甲肝减毒活疫苗口服免疫动物后的抗体反应·····	龙润乡等 (224)
用反向间接乳胶凝集试验法检测霍乱毒素·····	陈翠萍等 (225)
Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统转染效率的研究·····	朱诗应等 (225)
两种甲肝疫苗免疫小鼠后细胞因子变化的探讨·····	马 进等 (226)
知识型员工在生物制品 GMP 管理中的作用·····	李映波等 (226)
人工饲养猕猴自发性糖尿病模型的血液学、血液生化值测定与分析·····	和占龙等 (227)
应用毛细管 SDS 无胶筛分电泳测定小分子多肽分子量·····	李 响等 (227)
柱层析纯化 pVax1-gB Δ Tm 质粒 DNA 的研究·····	张中洋等 (228)
重组乙型肝炎疫苗(CHO 细胞)免疫效果的观察·····	孙俊业等 (228)
三联流感病毒裂解疫苗免疫动物制备单克隆抗体谱的研究·····	王压娣等 (229)
制备单克隆抗体分析三株人冠状病毒 N 蛋白的抗原相关性·····	丘立文等 (229)
S/D 法病毒灭活的 α_1 抗胰蛋白酶纯化初探·····	蔡 骏等 (229)
不动杆菌下呼吸道医院感染的危险因素及耐药性分析·····	龙 军等 (230)

细菌多糖—蛋白质结合疫苗的研究现状

——兰州所多糖蛋白质结合疫苗的研究进展

谢贵林

(兰州生物制品研究所, 兰州 730046)

2002 年《Jordan Report》在总结疫苗研究进展时将细菌多糖蛋白质结合疫苗列为过去二十年疫苗领域的十大发明之一。正是由于该技术的逐渐成熟, 使预防 b 型流感嗜血杆菌、流行脑膜炎球菌 (A、C、Y、W135 群)、肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌感染的疾病有了安全、有效的疫苗, 即细菌多糖—蛋白质结合疫苗。由于这些疫苗具有 T 细胞依赖抗原所具有的加强免疫应答效应和良好地抗体亲和性, 赋予了这类疫苗很好的安全性、免疫原性和免疫保护效果。

一、细菌多糖及其免疫学基本特性

1. 细菌多糖的种类

用于疫苗成份的细菌多糖主要有构成细菌表面荚膜的荚膜多糖 (Capsule polysaccharide CPS) 和细菌细胞壁外层 LPS 中的 O-特异性多糖 (O-Specific Polysaccharide, O-SP) 两类, CPS 的分子量一般在 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ Dalton 不等, O-SP 的分子量约为 3×10^4 Dalton, 这些多糖都是由 1—8 种单糖相互连接组成的重复单位 (Repeat unit, RU) 相互连接成线性多聚体。其中的 O-乙酰基, 丙酮酰基、磷酸酯等基团是多糖抗原表位的主要成分。由于这类多糖分子表面带有重复出现的相同抗原表位, 在体细胞内不容易被降解, 不能被吞噬细胞吞噬, 故不能将抗原呈递给 T 细胞。故称为 TI-2 型抗原。和 TD 类抗原相比, 不形成免疫记忆细胞, 同种抗原的再次接种不产生加强效应, 不随着免疫次数的增加而出现抗体亲和性的成熟和抗体类型转换, 这类免疫应答的完善具有年龄相关性。

2. 载体效应与 Ti 抗原向 TD 抗原的转换

1) 目前人们对 TI-2 型抗原的免疫应答机理尚不完全清楚。但一般认为, 多糖类抗原上的重复排列的表位与 B₁ 类细胞的抗原识别受体有较强的亲和性, 这种重复排列的抗原表位与 B₁ 类细胞表面的抗原识别受体 (BCR-Ig α Ig β) 发生交联, 当这种交联范围增大到一定程度时, 其形如“帽状”, 可使镶嵌于 B₁ 细胞表面受体 (BCR-Ig α Ig β) 发生流动, 激活细胞内 cAMP 系统, 形成细胞信号传导, 刺激细胞增殖分化, 产生与膜受体相似的抗体类型 IgM 抗体。由于免疫应答过程没有巨噬细胞和 T_H 的参与, 没有 IL-1, 2, 4, 5 和 6 等细胞因子的产生, 故不能产生 TD 抗原所具有的免疫应答特征。

2) 载体蛋白质分子与多糖抗原结合后, 载体分子在保持抗原表位原有的免疫应答特异性基础上, 改变了抗原表位特异性免疫应答类型的作用, 给多糖赋予了载体效应。当多糖—蛋白质结合疫苗进入机体后, 由于结合物中载体蛋白的作用, 该结合物可能先被几种吞噬、摄入、加工处理成抗原表位与 MHC-II 类复合物, 分泌到巨噬细胞膜表面, 这种复合物通过 MHC 限制性机理将抗原信息传递给 T_H 细胞或 B 细胞, 同时在 IL-1 和 IL-2、4、5、6 的作用下激活 B 细胞, 增殖、分化成抗体产生细胞和 Bm 细胞, 形成 TD 抗原的应答的过程。从 TI-2 抗原转变成 TD 抗原, 给多糖赋予了加强免疫应答、抗体亚类转换、抗体亲和性提高等特性。

二、细菌性结合疫苗的类型

1. 单端连接的结合疫苗 (Neoglycoconjugate)

最早制备的 Neoglycoconjugate 结合物是由 Stowell 和 Lee 将一种具有单端活性功能的糖残基共价结合到一种可溶性的蛋白质载体上, 由于糖分子是单端功能, 每个分子的糖链上只有一个可以和蛋白质共价结合的基团, 所得到的结合物中的蛋白质分子之间、糖分子之间及糖与蛋白质之间无交叉连结。

2. 网状连接结合物(Lattice Structures)

多糖分子为天然的 CPS 或 O-SP, 糖分子主链上被随机活化形成多个连接位点, 与同样具有多功能基团的蛋白质分子发生多位点结合, 这种结合方式形成的结合物中具有不同空间结构的连接形式。目前绝大多数化学连接方式所形成的结合物的形状属于网状结构。

3. 颗粒状结合物 (Particle-Based)

这类结合物所使用的载体蛋白是不溶性颗粒状的脑膜炎球菌外膜蛋白复合体 (Outer membrane protein complexity, OMPC) 或 *Bacillus alvei* 的表面层状蛋白质 (Surface-layers)。Merck 公司曾报道的肺炎球菌结合疫苗使用 OMPC 为载体蛋白, 属于颗粒状结构。

三、国外结合疫苗研究现状与兰州所结合疫苗研究进展

1. 以细菌荚膜多糖为多糖抗原的结合疫苗

1.1 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗: 自从表面上看 1987 年第一个 Hib PRP-DT 结合疫苗注册后, 先后有不同结合方式、不同载体蛋白质的四种疫苗, 从免疫效果看 PRP-TT 和 PRP-OMP 对婴幼儿的免疫原性最好, 美国使用 Hib 结合疫苗 10 年后, 4 岁以下婴幼儿中侵袭性 Hib 疾病的发病率下降了 98%。兰州生物制品研究所研制的 Hib 结合疫苗于 2003 年底获得国家食品药品监督管理局颁发的新药证书和生产文号, 2004 年 11 月产品上市销售。该产品免疫 3 月龄婴幼儿后有 99% 受试者血清抗 Hib PRP 特异性 IgG 抗体浓度 $\geq 0.15\mu\text{g/ml}$, 91% 的受试者血清抗 Hib PRP 特异性 IgG 抗体浓度 $\geq 1.0\mu\text{g/ml}$, 具有良好的安全性和免疫原性。

1.2 脑膜炎球菌结合疫苗 早在 1999 年, 英国就研究开发了单价 C 群脑膜炎多糖蛋白质结合疫苗, 接种该疫苗一剂后, 有 91% 以上的人群血清抗 C 群脑膜炎球菌多糖 IgG 抗体有四倍以上升高 (青少年 98%, 成人 91%)。2005 年 1 月 17 日, Sanofi Aventis 宣布四价脑膜炎球菌 A、C、Y 和 W135 多糖与白喉类毒素结合疫苗—Menactra 获得了美国 FDA 的注册。接种一剂 Menactra 结合疫苗能产生比四价多糖疫苗强的免疫应答, 有 98-100% 的血清学阴性的青少年可获得抗四型脑膜炎球菌抗体四倍升高; 即使是血清抗体阳性的成人, 接种后也有 91-100% 的人群抗脑膜炎球菌抗体四倍升高。国内只有 A 群脑膜炎球菌结合疫苗完成临床研究, 兰州所正在研制四价多糖蛋白质结合疫苗。

1.3 肺炎球菌多糖蛋白质结合疫苗 肺炎球菌是引起婴幼儿侵袭性疾病如肺炎、化脓性脑膜炎、中耳炎和菌血症的主要病原菌。虽然 23 价肺炎球菌多糖疫苗对成人有效, 但在婴幼儿中其免疫原性很差, 所以无保护效果。美国 Wyeth Lederle Vaccines 于 2000 年 2 月注册成功了适用于婴幼儿的 7 价肺炎球菌 (4, 6B, 9V, 14, 18F, 19F, 23F) 多糖蛋白质结合疫苗—Pneumovax™。该疫苗免疫接种程序为 2, 3, 6 月, 在美国观察的结果显示, 该结合疫苗对肺炎球菌引起的菌血症的对型保护率为 85%, 对肺炎球菌性脑膜炎的对型保护率为 83%, 对中耳炎的对型保护率为 65%; 在 1 岁、2 岁和 5 岁以下儿童侵袭性肺炎球菌性疾病减少的比例分别为 87%、58% 和 62%。上市后的观察证明该疫苗在预防 2 岁以下婴幼儿肺炎球菌性脑膜炎和肺炎非常有效。

兰州所正在进行 9 价 (1, 2, 3, 5, 6A, 14, 18C, 19F, 23F) 肺炎球菌多糖蛋白质结合疫苗, 除 3 型外, 其他 8 个血清型细菌的发酵培养、多糖纯化、多糖衍生、结合物制备工艺、多价疫苗配方和质量指标已经确定, 临床前研究结果显示各型结合疫苗和 4-5 型结合疫苗配制的多价疫苗都具有良好的动物免疫原性。

1.4 伤寒 Vi 多糖蛋白质结合疫苗 从上世纪八十年代中期以后, NICHHD 研制的伤寒 Vi 多糖疫苗取代了传统地灭活全菌体疫苗, 注射一剂的流行病学保护效果达 72-80%, 在全世界得到了广泛地应用。2003 年, NICHHD 的专家有研制出伤寒 Vi-rEPA 结合疫苗, 在越南 12000 名 2-5 岁儿童流行病保护效果研究中证实, 接种两剂后 27 个月时的保护效果为 91%; 第 28-40 月期间的保护效果为 88%。兰州生物制品研究所应用与 NICHHD 相同的 rEPA 制备的伤寒 Vi-rEPA 结合疫苗已完成了全部临床前研究内容, 并经 SFDA 药品审评中心专家评审, 即将进入临床研究。

1.5 金黄色葡萄球菌多糖蛋白质结合疫苗 美国已批准注册了 5 型和 8 型金黄色葡萄球菌多糖蛋白结合疫苗。该疫苗可用于肾透析病人主动免疫, 预防肾透析病人葡萄球菌感染; 此外该疫苗还作为制备抗 5 型和 8 型金黄色葡萄球菌特异性免疫球蛋白的抗原。

四、以细菌 O-SP 为多糖抗原的结合疫苗

细菌 O-SP (即 O 侧链) 是位于革兰氏阴性杆菌 LPS 最外层的多糖, 它是细菌型特异性的抗原决定簇部分, 其内侧是具有群特异性的核心寡糖, 通过 KDO 分子连接。在酸性条件下可以使 O-SP 与核心寡糖在 KDO 分子处断裂。将分离纯化的半抗原 O-SP 与蛋白质连接制备成的结合物具有良好地免疫原性。

1. 痢疾 O-SP 蛋白质结合疫苗 美国 NICHHD 的 Robbins 带领的课题组正在开发经肠道外接种的痢疾 O-SP-rEPA 结合疫苗在以色列军队中进行的随机双盲研究中证实, 接种一剂宋内氏痢疾 O-SP-rEPA 结合疫苗的流行病学保护效果为 74%。另一项研究表明, 宋内氏和福氏 2a 痢疾菌两种 O-SP-rEPA 结合疫苗在 4-7 岁儿童中具有很好的安全性和免疫原性。兰州生物制品研究所研制的宋内氏痢疾菌 O-SP-rEPA 和福氏 2a 痢疾菌

O-SP-rEPA 结合疫苗已获得 SFDA 的临床研究批件, I 期临床研究接种的青壮年、少年和 2-5 岁儿童组都显示了良好的安全性。II 期临床研究正在进行中。

2. 甲型副伤寒杆菌 O-SP-rEPA 结合疫苗

由于灭活全菌体伤寒副伤寒三联疫苗严重的副反应, 目前尚无可用的预防甲型副伤寒杆菌感染的疫苗, 但国内由甲型副伤寒杆菌引起的小范围流行屡见不鲜, 西南华中部分地区尤为多见, 流行病学以水源污染为主, 农民和寄宿中、小学生为主要人群。兰州所研制的甲型副伤寒杆菌 O-SP-TT 结合疫苗在小鼠体内具有很好的免疫原性, 能诱导小鼠产生高水平的血清 IgG 抗体, 并有明显的加强免疫效应, 免疫后的小鼠血清在补体系统存在的条件下具有体外杀菌活性, 目前正在申请临床研究批件。

3. 大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 结合疫苗疫苗

美国 NICHHD 的科学家制备的 O-SP-rEPA 结合疫苗已在成年志愿者中进行了初步的安全性和免疫原性观察, II 期临床研究正在计划中。为研究既针对该细菌 LPS, 又能中和其类志贺氏毒素的结合疫苗, 他们用无毒突变的志贺氏毒素作为载体, 制备了 O-SP-sh toxin I 结合疫苗。此外, 为消除大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 在中间宿主的带菌状态, 有人用大肠杆菌 O₁₅₇:H₇LPS 与载体蛋白制备成结合疫苗, 试验正在进行中。兰州所研制的大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ O-SP-rEPA 结合疫苗已进入临床批件申请阶段。

除了上述几种结合疫苗外, 正在研究阶段的细菌性多糖蛋白质结合疫苗还有 GBS III、I a、I b、II 和 V 型, 绿脓杆菌 O-SP-TA, O1 群霍乱弧菌等的结合疫苗。总之, 结合疫苗技术的成熟不只是促进了细菌性疫苗的研究, 而且也对传统地免疫学提出了课题。

全球脊髓灰质炎免疫现状及其挑战

姜述德

(中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

✓ 脊髓灰质炎(脊灰)是由脊灰病毒 1, 2, 3 型引起的传播广泛且危害极大的急性传染病。一旦患病, 重者死亡, 轻者终生残疾。该病只能预防, 脊灰疫苗是预防和消灭脊灰的有力武器。

目前已处于消灭脊灰的最后阶段, 实现全世界消灭脊灰的宏伟目标, 尚须不懈努力, 例如: 加强实施免疫计划; 中断野毒株在全球的传播; 遏制实验室及疫苗制造厂野毒株的播散; 加强检测循环的脊灰病毒; 储备单价口服脊灰活疫苗(OPV); 制定全球同时停用 OPV 的方法; 停用 OPV 后制定出长期的脊灰免疫政策以及确保消灭脊灰的资金等。面对挑战, 人类有能力把脊灰这一急性传染病彻底埋葬。

一、脊灰主动免疫的有力武器—疫苗

科学家们为研制预防脊灰疫苗付出了半个世纪的艰辛劳动, 终于由两位杰出的美国科学家 Dr. J. E. Salk 于 1955 年和 Dr. A. B. Sabin 于 1961 年分别研制成功脊灰灭活疫苗(IPV)和 OPV。历经半个世纪的实践证明 IPV 和 OPV 都是安全有效的。OPV 在预防和消灭脊灰的过程中起到了主导作用, 随着该病的消灭 OPV 将完成其历史使命。IPV 先于 OPV 使用, 少数欧洲国家一直使用 IPV, 全世界停用 OPV 后, 一些国家特别是发达国家和中等发达国家将继续使用 IPV。近年来对遏制脊灰病毒的要求越来越严格, 从生物完全角度考虑, 荷兰、日本和中国正在研制 Sabin IPV。

二、全世界消灭脊灰的进展

1988 年第 41 届世界卫生大会(WHA)作出了全世界消灭脊灰的决议, 其主要措施是实施强化免疫。除了常规免疫外, 增加了国家强化免疫(NID), 亚国家强化免疫(SNID)和补充免疫(SIA)。历经 17 年的强化免疫, 脊灰病例数减少了 99%以

上, 防止了 500 万麻痹病例。截止 2002 年 6 月全世界六大地区已有美洲, 西太和欧洲三大地区发放了消灭脊灰的证书。截止 2005 年 9 月中旬脊灰病例数为 1219 例, 2004 年后期到现在尚有 6 个国家发生脊灰流行, 此外又有 10 个国家重新发生了脊灰。

三、免疫方案的改变

IPV 和 OPV 各有其优缺点。OPV 的缺点是服苗后可发生疫苗相关病例(VAPP)和疫苗衍生株(VDPV)病例。2000—2004 年全世界共发生了 4 次 VDPV 病例。随着消灭脊灰的进展, VAPP 和 VDPV 病例日益引起人们的重视。IPV 可避免 VAPP 和 VDPV 病例。美国, 德国, 新西兰等已由 OPV 过度到使用 IPV。丹麦, 匈牙利, 以色列, 意大利改用 IPV/OPV 序贯免疫方案。目前全世界有 24 个国家单独使用 IPV, 12 个国家使用 IPV/OPV 序贯免疫。

四、WHO 和 WHA 的决策

2005 年 5 月第 58 届 WHA 再次确定了全球消灭脊灰的宏伟目标, WHO 向 WHA 提交了全世界停用 OPV 的时间表。继续使用 OPV 不可能消灭脊灰, 因而在确证了中断脊灰野毒株传播并且达到了停用 OPV 的 6 条要求后, 全世界应尽快同时停用 OPV 常规免疫。

WHO 预期 2005 年底或最迟 2006 年中期中断脊灰野毒株传播, 2008 年发放全球消灭脊灰证书, 2009 年停用 OPV。

尽管尚存在一些挑战性的问题, 消灭脊灰的美好前景已呈现在我们面前。面对挑战, 面对这一历史任务, 人类坚信最终一定埋葬肆虐在人间病魔—脊髓灰质炎。

重组牛肠激酶在大肠杆菌中的表达及制备

范开¹ 陈海容² 梅翔²

(1. 重庆工学院生物工程学院, 重庆 400050 2. 重庆富进生物医药有限公司, 重庆 400041)

[摘要] 目的 克隆重组肠激酶轻链(EK_L)基因并在大肠杆菌宿主系统中高效表达出具有生物活性的EK_L蛋白。方法和结果 通过PCR获得二硫键异构酶(DsbA)基因和EK_L基因的融合片断, 此片断经回收和纯化后插入pET-3c表达质粒载体并获得高效表达DsbA-EK_L的菌株, 表达含EK_L融合蛋白(含有6×His)经Ni柱螯合和Q柱纯化后, 显示出高效的EK酶切活性。结论 用DsbA基因与EK_L融合可溶性表达的重组蛋白中具有EK的高效酶切活性, 为进一步研究EK活性和在生物制品中奠定基础。

[关键词] 重组牛肠激酶轻链 融合表达 高效酶切

肠激酶(Enterokinase, EK), 是一种高度专一性识别氨基酸序列Asp-Asp-Asp-Asp-Lys(DDDDK)的蛋白酶。在生理条件下EK从赖氨酸(K)的羧基端进行切割。肠激酶在多种反应条件下都可保留其活性并能在pH4.5~9.5, 温度4℃~45℃及存在多种去污剂的情况下特异切割蛋白, 在基因工程重组融合蛋白中广泛运用。其切割特点是在被切割蛋白的氨基端不遗留任何多余氨基酸残基。肠激酶轻链(EK_L)具有EK完全一致的生物活性, 其牛源性EK活性最高。目前有应用酵母重组EK_L, 应用大肠杆菌分泌表达的文献报道。本文首先应用二硫键异构酶(DsbA)与EK_L进行融合表达, 使EK_L大肠杆菌表达中能自然复性表现出其高酶活性。

材料和方法

1. 材料

1.1 质粒和菌株

pET-3c购自美国Novagen公司产品, *E. coli* BL21DE3)pLysS, *E. coli* DH5α购自美国Invitrogen公司。

1.2 主要试剂

核酸分子量标准、限制性内切酶、T4连接酶、Tag DNA聚合酶、dNTP均购于TaKaRa公司(大连), DNA纯化试剂盒购自上海华舜, 肠激酶标准购于Invitrogen公司, 所用引物自行设计, 由上海生工合成。pVG-DsbA-TEV、pUC57-EK_L、

pMAL-c2x-SA均由本室保存。

其他产品均为进口或国产分析纯。

2. 方法

2.1 PCR扩增DsbA-His₆-EK_LcDNA片段

根据GenBank中的DsbA cDNA序列设计上游引物1: 5'-cat atg aaa aag att tgg ctg gcg ctg gct ggt tta- 3'及下游引物2: 5'-acc acc aac gat atg gtg atg gtg atg gtg tcc ttt ttt ctc gct taa- 3', 以pVG-DsbA-TEV为模板扩增DsbA基因。根据Genebank中Enterokinase的编码序列设计上游引物3: 5'-tta agc gag aaa aaa gga cac cat cac cat atc gtt ggt ggt-3' (含编码6个His序列)及下游引物4: 5'-gga tcc tta gtg caa gaa gga ttg gta aac acc tgg tct gtt-3', 以pUC57-EK_L为模板扩增His₆-EK_L基因, 引物2和引物3在设计上部分序列相互反向重叠, 因此可以通过以DsbA基因及His₆-EK_L基因作模板, 用上游引物1和下游引物4进行重叠延伸PCR将DsbA基因与EK_L基因融合而成DsbA-His₆-EK_L基因。

PCR扩增条件: 95℃, 预变性8 min; 95℃变性1 min, 62℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 共30个循环; 最终72℃延伸10 min。扩增产物以100 bp DNA Ladder Marker作为分子量对照, 1.0%琼脂糖凝胶电泳观察, 并按照DNA纯化试剂盒回收PCR产物。

2.2 pET3c-DsbA-His₆-EK_L重组质粒的构建

将DsbA-His₆-EK_L基因及质粒pET-3c用Nde I和BamH I双酶切, 回收目的片段后用T4

DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5 α 。在平板上随机挑取若干个单菌落, 37℃ 摇菌过夜。用质粒 DNA 抽提试剂盒提取质粒, 以 *Nde* I 和 *Bam*HI 双酶切, 筛选出阳性克隆, 命名为 pET3c-DsbA-EK_L 重组质粒。委托上海生工对 pET3c-DsbA-EK_L 重组质粒的目的片段进行全序列测定。重组质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3)pLysS 表达细胞中形成重组工程菌 pET3c-DsbA-EK_L/*E. coli* BL21(DE3)pLysS。

2.3 重组蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

挑取转化的重组工程菌单菌落接种于含 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 选用最佳表达条件为: 37℃ 220 rpm 振荡培养到 OD_{600nm}=0.6 时加入 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L, 30℃ 诱导 4 h 后离心收集发酵菌体, 12%SDS-PAGE 进行凝胶电泳[2]分析, 确定蛋白表达量。

2.4 重组蛋白 DsbA-His₆-EK_L 的纯化

将 100g 表达菌体用 100 mL 破菌液 (50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 0.1 mg/mL 溶菌酶, pH9.0) 悬浮超声破菌, 12000×g, 4℃ 离心收集上清。用平衡缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, pH8.0) 平衡 Ni⁺亲和层析柱, 平衡 3 个柱体积。上样。用缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Imidazole, pH8.0) 洗去杂蛋白, 再用缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 200 mmol/L Imidazole, pH8.0) 洗下目的蛋白。然后用缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0) 平衡 Sephrose Q, 上样, 用缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, pH8.0) 快速洗脱目的蛋白以透去咪唑 (Imidazole)。最后将洗下的目的蛋白用缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH8.0) 透析以去除 NaCl, 加入终浓度 50% 的甘油分装, -80℃ 保存。

2.5 DsbA-His₆-EK_L 的酶活性分析

用含有一个 EK_L 酶切位点的重组融合 MBP-SA (麦芽糖结合蛋白-DDDDK-干扰素) 做底物检测 DsbA-His₆-EK_L 的生物活性。

12%SDS-PAGE 后用 GST 凝胶系统软件分析并计算其对底物的酶切效率。为了进行定量酶切效率的分析, 将 0, 5, 10, 20, 40 ng 的 DsbA-His₆-EK_L 分别加入 20 μg MBP-SA 中, 20℃ 温育 16 h, 反应缓冲液为 50 mmol/L Tris-HCl pH8.0。

结果

1. 两次 PCR 扩增产物及其酶切鉴定

如图 1 所示, 第一次 PCR 扩增出 700 bp 的片段, 与预期结果相符, 第二次, PCR 产物扩增出约 600 bp 的片段, 重叠延伸 PCR 扩增出 1300 bp 的片段, 与预期结果相符。

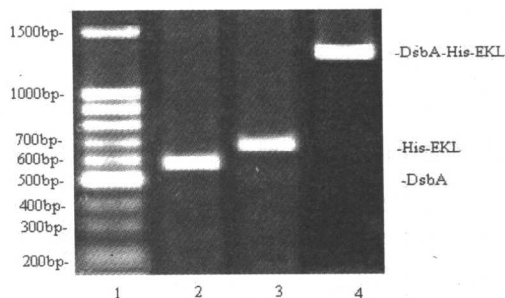


图 1 EK 基因的 PCR 产物及 DsbA PCR 产物

1. 100 bp DNA LadderMarker
2. DsbA gene PCR product
3. His₆-EK_L gene PCR product
4. DsbA-His₆-EK_L gene PCR product

2. 重组质粒 pET3c-DsbA-His₆-EK_L 的序列分析及酶切鉴定

测序结果显示, 所扩增的牛 EK2 基因部分碱基序列与 GenBank 的完全一致。重组质粒 pET3c-DsbA-His₆-EK_L 经 *Nde* I 和 *Bam*HI 双酶切, 分别显示一条 1300 bp 和 4000 bp 片段(图 2), 结果与预期一致, 初步确定在目的基因片段正确插入表达质粒。

3. 重组质粒 pET3c-DsbA-His₆-EK_L 在大肠杆菌中的表达及纯化

重组质粒 pET3c-DsbA-His₆-EK_L 成功转化 *E. coli* BL21(DE3)pLysS 后, 经 IPTG 诱导表达, 12%SDS-PAGE 分析 (图 3), 表明诱导后的目的

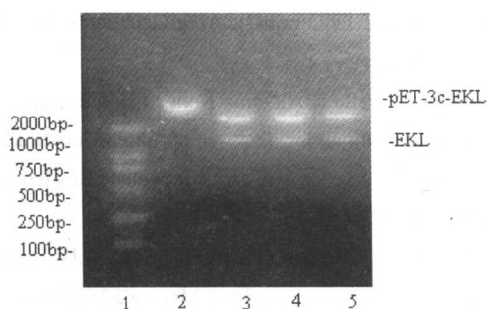


图2 重组表达质粒 pET-3c-DsbA-EK_L 的酶切鉴定

DNA marker DL2000 2. pET3c-DsbA-His₆-EK_L
3-5. pET3c-DsbA-His₆-EK_L / Nde I+BamH I

蛋白其 Mr~50000, 与 DsbA 与 His₆-EK_L 融合后的相对分子量吻合。融合蛋白绝大部分以可溶形式表达。经软件分析, 目的蛋白量占总蛋白的 28%, 由于引入 His₆ 标记, 用 Ni²⁺亲和层析柱, 在用咪唑进行梯度洗脱, 经 Q 柱除去咪唑, 以缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, pH8.0) 洗下目的蛋白, 加入 50%甘油, 储存于 -80 °C。

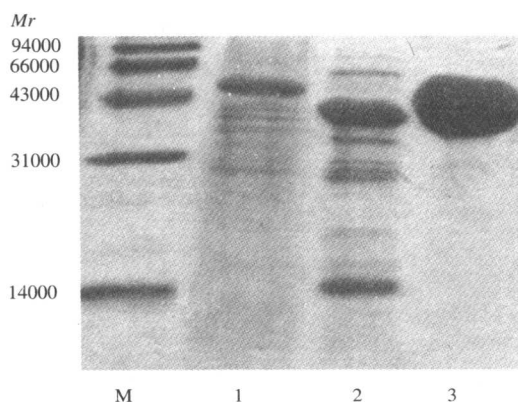


图3 重组 EK_L Ni 柱纯化

M. Marker 1. sample before elution.
2. eluted by buffer with 50 mmol/L Imidazole.
3. eluted by buffer with 200 mmol/L Imidazole.

4. DsbA-His₆-EK_L 的生物活性分析

DsbA-His₆-EK_L 的酶切活性以 MBP-SA 融合蛋白作为底物加以检测, (图 4)。酶切效率与酶底物比率之间的关系测定显示 20 °C、16 h 后, 20 μg MBP-SA 能被 20 ng 重组 DsbA-His₆-EK_L 完全酶切。

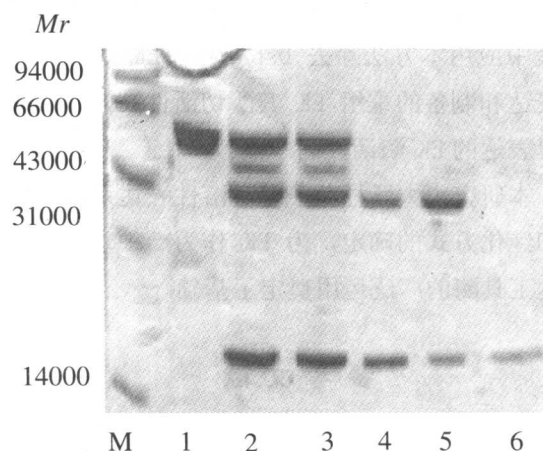


图4 DsbA-His₆-EK_L 酶切 MBP-SA 融合蛋白

M. Marker 1. MBP-SA
2. MBP-SA incised by 5 ng of DsbA-His₆-EK_L
3. MBP-SA incised by 10 ng of DsbA-His₆-EK_L
4. MBP-SA incised by 20 ng of DsbA-His₆-EK_L
5. MBP-SA incised by 40 ng of DsbA-His₆-EK_L
6. SA (Control)

讨 论

目前, 大多数商业用 EK 为全酶, 从牛或猪肠中纯化而得, 价格高且易被微量的肠蛋白酶所污染。近来国内外有文献报道在酵母和大肠杆菌中表达、纯化含 235 个氨基酸的肠激酶轻链 (EK_L), 该轻链比提纯的牛肠激酶具有更高的酶活性。肠激酶轻链 (EK_L) 含有丝氨酸蛋白酶, 能识别胰蛋白酶原的氨基酸序列 DDDDK 并在切割后将其转化为有活性的胰蛋白酶。

EK_L 蛋白质分子内有四对二硫键, 对维持其结构功能十分重要。一般的大肠杆菌表达系统不能使 EK_L 的二硫键正确形成, 故不能产生正常折叠的重组 EK_L。

外源蛋白的融合表达广泛用于基因工程重组蛋白的制备。借助不同的外源蛋白可以帮助靶蛋白正确复性、提高靶蛋白得率、增加靶蛋白可溶性或使得靶蛋白容易纯化。本研究表达的融合蛋白 DsbA-His₆-EK_L, 主要是利用外源蛋白 DsbA 帮助 EK_L 蛋白中的二硫键正确折叠, 同时可避免细胞膜内蛋白酶的破坏性降解, 高活性的 EK_L。由于引入 His₆-Taq, 运用 Ni²⁺亲和层析柱纯化, 即可

得到高纯度的目的蛋白。同时可有效地从被酶切溶液中应用本方法除去 DsbA-His₆-EK_L 应用本方法表达和制备的重组 EK_L 其酶切活性高,比国外酵母表达的 EK_L 酶活性高一倍。

本研究中大肠杆菌 EK_L 可溶性表达系统的建立和纯化方式的确定,为 EK_L 作为一种重组融合表达工具酶的广泛运用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Kitamoto Y, Yuan X, Wu Q, McCourt D W, Sadler JE. Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains(J). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:7588-7592
- [2] Huang Jing , QIAO Chuan-ling, Li Xuan, XING Jian-Min. cloning and fusion expression of detoxifying gene in *Escherichia coli*(J). *Acta Genetica sinica*, 2001, 28:583-588
- [3] Kitamoto Y, Veile R A, Donis-Keller J E. Cdna sequence and chromosomal localization of human enterokinase proteolytic activator of trypsinogen(J). *Biochemistry*, 1995, 34:5462-4568
- [4] LaVallie E R, Rehemtulla A, Racie L A, DiBlasio E A, Ferenz C, Grant K L, Light A, McCoy J M. Cloning and functional expression of a cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase(J). *J Biol Chem*, 1993, 268:23311~23317.
- [5] Vozza L A, Wittwer L, Higgins D R, Purcell T J, Bergseid M, Collins Racie L A, Lavallie E R, Hoeffler J P. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*(J). *Biotechnology*, 1996, 14:77~81.

单管一步产物增强性逆转录反应的建立及其对疫苗 生产用细胞基质逆转录酶活性的检测

范小勇¹ 吕国贞² 吴丽娜¹ 陈静华¹ 张秀娟³ 徐闻青³ 郭盛洪¹

(上海生物制品研究所细胞与分子生物实验室¹、质保部²、疫苗二室³, 上海 200052)

【摘要】 出于安全需要, 人用生物制品不能有造成潜在健康危险因素的存在。世界卫生组织最新标准提出, 疫苗生产的任何传代细胞都必须没有外源性病毒, 尤其是逆转录病毒的污染。最近, 一种超敏感的逆转录酶反应, 我们称之为产物增强性逆转录酶反应 (PERT) 或建立在 PCR 基础上的逆转录反应 (PBRT), 可用来检测到单个逆转录病毒粒子中的微量逆转录酶活性, 此反应的敏感性是常规逆转录酶检测方法的 10^6 倍。我们在国外文献报道的基础上建立了一种单管一步 PERT (STOS-PERT) 法, Ampliwax 的应用可以把逆转录和 PCR 反应在同一个微量离心管中分隔开, 反应的效率和重复性更高, 而反应的敏感性却不受影响。此外, 在逆转录步骤中加入肝素可以完全抑制 PERT 反应中由于细胞凋亡所释放的细胞聚合酶 (如 DNA 聚合酶 α 、 γ 等) 引起的假阳性结果。我们应用调整后的 STOS-PERT 法分析了多种细胞品系, 结果显示, 大多数哺乳动物细胞 (MRC-5, Vero, WISH, 2BS, RK-13, MDCK 等) 的细胞上清液为 PERT 阴性, 而细胞裂解液所呈现的 PERT 弱阳性, 则是由于细胞中 DNA 聚合酶所引起的缘故, 但这种假阳性结果可被肝素抑制。而鸡起源细胞, 无论是来自鸡胚纤维原还是来自 SPF 级鸡胚的尿囊液, 杂交瘤细胞 SP2/0 等都含有确定的逆转录酶活性, 且不能被肝素所抑制。总之, 本文所描述的改进后的 STOS-PERT 方法具有高度敏感性和特异性, 可方便的区分细胞中真实的逆转录酶活性和真核细胞 DNA 聚合酶引起的 RTase-like 活性, 操作简便、快速, 可用于疫苗生产用细胞基质中微量逆转录病毒污染的筛查。

【关键词】 产物增强性逆转录酶反应 (PERT) 逆转录病毒 生物制品 细胞基质 肝素 细胞 DNA 聚合酶

生物制品如病毒类疫苗等, 在世界范围内有着很普遍的用途, 它们帮助人类预防各种疾病的同时, 其自身也同样存在着一些潜在的危险性, 主要是因为用作疫苗生产用的病毒培养基质是可能使人致病的传代细胞。有鉴于此, 世界卫生组织 (WHO) 规定生物制品生产过程中不得含有能被发现的抗原污染物、外源因子 (尤其是逆转录病毒) 及其产物, 和残留的宿主细胞 DNA。在拟用于生产人用生物制品的细胞株带有病毒时, 强调必须在其制造过程消除或灭活可能感染人体的病毒的能力 [1]。WHO 关于麻疹和腮腺炎等病毒类疫苗的生产规程规定, 用于生产的鸡胚细胞应来自于严格监控的无特定病原体 (SPF) 鸡群, 应不含传染性的禽逆转录病毒 [2]。为了确保生物制品中不含有可发现的逆转录病毒的存在, 我们致力于研究一些简单易行且快速准确的方法来检测各种生物制品中是否含有逆转录病毒的存在。

逆转录病毒是一类真核生物的 RNA 病毒, 它能将自身基因组的 DNA 拷贝整合至宿主的染色体中。DNA 拷贝是由病毒的酶——依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶 (逆转录酶, Reverse Transcriptase, RTase) 所合成的。几乎所有的脊椎动物中都有可能找到逆转录病毒, 因而有必要对生物制品进行逆转录病毒的筛查。逆转录病毒的常规体外检测方法有三种: 透射电子显微镜法、敏感细胞的病毒培养法、逆转录酶活性检测法, 前二者或烦琐、费时费力; 或不便于细胞培养不易检出, 因而常采用第三种方法, 即检测逆转录病毒的特征性产物——逆转录酶。传统使用的逆转录酶活性检测方法以人工合成的 poly rA : oligo dT 作为模板和引物, 在有适当的放射物标记的 dNTP、二价阳离子等存在的情况下, RTase 能将标记的核苷掺入到以 RNA 为模板新合成的 DNA 链中, 通

联系作者: 范小勇, Tel: 021-62803189-62, E-mail: xyfan008@hotmail.com
上海延安西路 1262 号, 200052
上海生物制品研究所细胞与分子生物实验室

过液闪计数器计数, 但该法不甚敏感, 且有放射性污染[3]。而用作检测 RTase 的免疫学方法如竞争性酶联免疫方法 (ELISA) 和抗原-捕获三明治法, 灵敏度也不高, 需花费很长的时间, 且易出现非特异性反应和边缘效应, 因而给结果的判断带来困难。

最近, 国外开展使用了一种结合 PCR 扩增的逆转录酶活性检测方法——PERT 法 (Product-enhanced Reverse Transcriptase assay, 产物增强性逆转录反应) 来进行逆转录酶活性的检测或逆转录病毒的筛查[4]。PERT 法高度敏感 ($10^6 \sim 10^7$ 倍于常规 RT 方法), 可检测到低至 10^{-9} U 的 MuLV 逆转录酶, 相当存在于 $3 \sim 11$ 个病毒颗粒中的 210 个 RT 分子。PERT 法是目前国际上公认的检测逆转录酶活性最为敏感的方法, 也是 WHO 推荐在生物制品生产过程中使用的方法[5]。新版《中国药典》也将其纳入规程, 但国内此项目开展较晚且尚未有标准方法建立, 因而有必要进行此方面的系统性研究工作。

材料和方法

1. 实验材料

引物 RT-1 (5'-CATAGGTCAAACCTCCTA GGAATG-3')、RT-2 (5'-TCCTGCTCAACTTCCT GTCGAG-3')、生物素标记探针 Bio-Probe (5'-Bio-TTAATGTCTTTAGCGAGACGC-3') 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 逆转录酶 AMV-RTase、MMLV-RTase、RNA 酶抑制剂 RNasin 购自 Promega 公司, Superscript II 购自 Invitrogen 公司, MS2 RNA 模板购自 Roche 分子诊断公司, 肝素钠购自上海生化制药厂 (12500 U / 2 ml), Taq DNA 聚合酶、RNase A 分别为 MBI Ferments 和华美公司产品, Ampliwax PCR Gem 50 为 PE Applied Biosystems 产品; 实验所需的全部生化试剂均为分子生物级。

2. 单管一步 PERT (STOS-PERT) 方法的建立

在 0.2 ml PCR 薄壁管中分别加入 25 μ l PCR 主反应液及一粒 Ampliwax PCR Gem 50, 60℃ 孵育 5 min 以融化石蜡, 然后将薄壁管置于 37℃ 冷却至石蜡重新凝固, 再加入 20 μ l RT 主反应液于凝固的石蜡之上, 然后加入 5 μ l 样品液于配制好的 STOS-PERT 反应体系中。其中 RT 主反应液的各项终浓度分别为 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 500 μ M dNTPs, 5 mM DTT, 0.15 μ M RT-1, 8 U RNasin, 300 ng MS2 RNA; PCR 主反应液的各项终浓度为 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 8 ng RNase A, 0.10 μ M RT-2, 2 U Taq DNA 聚合酶。薄壁管放置于 PCR 仪 (Px2, ThermoHybaid, Franklin, MA) 上, 37℃ 逆转录反应 1 hr, 于 94℃ $\times$ 4 min 灭活 RNasin 并融化石蜡使得逆转录产物与 PCR 主反应液混合, 再于 37℃ 孵育 30 分钟消化 RNA 模板后, 进行 PCR 扩增, PCR 程序设置为 (94℃ $\times$ 30 s, 55℃ $\times$ 30 s, 72℃ $\times$ 30 s) 为一循环, 扩增 35 个周期, 最后 72 延伸 5 分钟, 置 4℃ 备用。反应阳性对照为 10 倍比稀释的商品化逆转录酶 AMV-RTase, 阴性对照为稀释 AMV-RTase 用的缓冲液 Buffer A (50 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM DTT, 0.25 mM EDTA, 0.025 % Triton X-100, 50 % glycerol)。

3. Southern-Blot 分析扩增产物

取 10 μ l mSTOS-PERT 扩增产物上样于 2 % 琼脂糖凝胶, 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液中稳压 (120W) 电泳 20 min 左右, EB 染色后, 紫外灯下观察并凝胶成像。凝胶碱变性后转移至带正电的尼龙膜 (Hybond-N +, Amersham, UK), 尼龙膜中和后置于 PerfectHyb 杂交液 (ToYoBo, Osaka, Japan) 37℃ 预杂交 30 min, 然后加入生物素标记的探针 Bio-Probe 200 pmol, 37℃ 杂交 2 h。杂交膜经严格洗涤后置于 TBS-T 缓冲液 (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.5 % Tween 20) 中, 并按 1:10000 比例加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶 (KPL