

· 论 著 ·

Triton X-114 液相分离法去除流感单价病毒原液中内毒素的实验研究*

黄秋香¹, 毕湖冰², 张新文², 高菁霞², 蔡 玮², 刘 泽², 姚忠萍², 姜述德², 李映波^{2△}

(1. 云南大学单克隆抗体工程技术中心, 昆明 650091; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院、医学生物学研究所, 昆明 650118)

摘要:目的 探讨 Triton X-114 液相分离法去除流感单价病毒原液中内毒素的效果。方法 用终浓度为 1、2、3% Triton X-114 抽提、液相分离法去除流感单价病毒原液中的内毒素; 用鲎试剂凝胶法检测去除前后内毒素含量、Lowry 法测定蛋白质含量、红细胞凝集试验检测血凝效价、单相免疫扩散法测定血凝素含量等。结果 通过 3 轮抽提, Triton X-114 能够将单价病毒原液中内毒素水平降至低于 0.25 EU/mL, 去除率达到 99.9%, 蛋白质回收率为 85.11%, 血凝效价保持不变, 血凝素含量几乎无变化。以 1% Triton X-114 去除流感单价病毒原液中内毒素效果最好。结论 Triton X-114 液相分离法可有效去除流感病毒原液中的内毒素。

关键字: 流感单价病毒原液; 内毒素; Triton X-114

中图分类号: R373.13; R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)04-0385-03

Method of the removal endotoxin from influenza monovalent virus concentrate by triton X-114 liquid phase separation*HUANG Qiu-xiang¹, BI Hu-bing², ZHANG Xin-wen², et al.

(1. Yunnan University Monoclonal Antibody Center, Kunming 650091, China; 2. Institute of

Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union of Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract: Objective To probe the efficacy of endotoxin in monovalent influenza virus concentrate is removed by Triton X-114 liquid phase separation. **Methods** Endotoxin was removed by Triton X-114 liquid phase separation, which final concentration were 1%, 2% and 3% separately. The endotoxin content, before and after removal, was detected by tachypleus ameboyto lysate assay. The content of protein was tested by Lowry assay, HA titer by chicken-hemagglutination inhibition test and the HA content was measured by single radial immunodiffusion assay. **Results** The endotoxin content of monovalent influenza virus concentrate was reduced to less than 0.25 EU/mL after the third extraction by Triton X-114, the ratio of reducing was up to 99%, and no changes in HA titer, the recovery ratio of protein was 85.11%, and the change of HA content was very little. The best final concentrate of Triton X-114 to remove endotoxin from influenza virus concentrate was 1%. **Conclusion** Triton X-114 liquid phase separation is an effective method for removing endotoxin from monovalent influenza virus concentrate.

Key words: influenza single virus concentrate; endotoxin; Triton X-114

流感病毒原液是通过鸡胚培养法获得的病毒尿囊液, 由于鸡胚带有潜在病原菌, 在鸡胚病毒培养以及后处理分离纯化过程中, 易造成潜在的内毒素污染。

现有的方法大多根据内毒素分子特性来破坏或去除内毒素, 主要为超滤法、离子交换色谱法或亲和色谱法等^[1]。但由于内毒素固有的生物特性, 使得这些方法都具有一定局限性, 且操作繁琐, 成本高。本文以流感单价病毒原液为研究样品, 从最终内毒素含量、蛋白质回收率、血凝效价及血凝素含量等进行分析, 探讨 Triton X-114 液相分离法去除流感单价病毒原液中内毒素的效果。

1 材料与方

1.1 材料 流感 H3N2 型单价病毒原液由本室提供; Triton X-114 购自 Amresco 公司, 批号 3396B505; 细菌内毒素工作标准品购自中国药品生物制品检定所, 规格为 140 EU/mL, 批号 150601-2006-3; 鲎试剂购自湛江博康海洋生物有限公司, 灵敏

度 0.25 EU/mL, 批号 0711060; 细菌内毒素检查用水购自湛江博康海洋生物有限公司, 规格为每支 5 mL, 批号 0711060; 蛋白质含量测定国家标准品购自中国药品生物制品检定所, 规格为每支 21.24 mg, 批号 2002/04。

1.2 实验方法

1.2.1 不同浓度 Triton X-114 分离方法 在 500 μ L 流感单价病毒原液中分别加入终浓度为 1、2、3% Triton X-114, 混匀, 冰浴 5 min, 使成一相, 升温超过其云点 21 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C 孵育, 观察分层情况。待溶液中出现明显分层后, 室温下 12 000 r/min, 离心 5 min, 吸取上清液, 重复抽提 2 次。

1.2.2 细菌内毒素含量测定 按照《中国药典》第 3 部(2005 版)进行^[2]。在鲎试剂灵敏度复核试验及供试品干扰试验通过的情况下, 将样品稀释成一定浓度溶液, 用灵敏度为 0.25 EU/mL 鲎试剂, 根据细菌内毒素凝胶半定量法检测规定进行。结果判断见药典说明。

* 基金项目: 国家“863”基金资助项目(2006AA02Z409); 云南省自然科学基金资助项目(2004C0720M, 2006XY29)。 Δ 通讯作者, E-mail: lyb1010@sohu.com.

1.2.3 蛋白质含量测定 采用 Lowry 法^[2]。取蛋白质含量测定国家标准品 1 支,用水定量稀释至 1mg/mL,为标准蛋白质贮备液。精确量取标准蛋白质贮备液 6mL 于 10mL 量瓶中,用水稀释至刻度,为标准蛋白质溶液。精密量取一定体积样品置试管内,加水至 1mL,加 5mL 碱性铜溶液,混匀,室温放置 10min,快速加入酚试剂 0.5mL,混匀,室温放置 30min,显色后按紫外-可见分光光度法试验,在波长 650nm 处测定吸光度。精密量取标准蛋白质溶液 0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5mL,分别置 10mL 试管中,自加水至 1mL 起,同法操作,第 1 管为空白对照,以标准曲线的蛋白质浓度对应其吸光度,求直线回归方程,将测得样品的吸光度代入直线回归方程,计算样品的蛋白质含量。

1.2.4 血凝效价测定 采用红细胞凝集试验。96 孔血凝板各行 2~12 列均加入 50 μ L 0.87% 灭菌生理盐水,A~H 行第 1 孔分别加入待测样品 50 μ L,用多道微量移液器从第 1 列吸出 50 μ L,加入第 2 列,反复吹打后吸出 50 μ L 加入第 3 列,如此类推做倍比稀释,至第 11 列反复吹打后吸出 50 μ L 弃去,第 12 列用 50 μ L 0.87% 灭菌生理盐水做阴性对照。再使用多道微量移液器于血凝板所有孔中均加入 50 μ L 0.1% 鸡红细胞悬液,轻拍板壁混匀,静置 40~60min,观察结果。效价判定及计算方法按照参考文献^[3]进行。

1.2.5 血凝素含量检测 血凝素含量测定采用单向免疫扩散 (SRID) 法。按要求将抗原参考品稀释至控制浓度,然后以 9:1 比例分别将参考品和样品与去污剂混匀,室温静置 30min。对抗原参考品作 100、75、50、25% 稀释,样品稀释至抗原参考品范围内取甲 3 型抗体加入 1% 琼脂中制板,打孔,将稀释后抗原参考品和样品分别加入琼脂板孔中,置湿盒 20~25 $^{\circ}$ C 孵育 18~24h,经染色、脱色后测量抗原参考品形成的沉淀环直径,对照血凝素含量作直线回归分析,求得回归方程,带入样品沉淀环直径计算血凝素含量^[4]。

1.2.6 残余 Triton X-114 的去除 吸取离心后上清液,用无热原 PBS 透析 72h,以去除其中残余 Triton X-114,每 6 小时换液 1 次。收集透析后液体,检测 Triton X-114 含量。同时检测蛋白含量及血凝效价。

1.3 统计学方法 采用 SPSS11.5 软件对 3 种不同浓度 Triton X-114 分别在 3 次去除内毒素后病毒原液中的血凝素含量进行方差分析。

2 结 果

2.1 不同浓度 Triton X-114 对分离效果的影响 通过终浓度为 1、2、3% Triton X-114 分别对同一体积 500 μ L 的流感单价病毒原液进行液相分离去除内毒素,重复 3 次试验,流感单价病毒原液中内毒素含量均降至低于 0.25EU/mL,远低于国家药典规定的限值(200EU/mL),去除率达到 99.9%,血凝效价不变,蛋白质含量合格,但血凝素回收各自不一。不同浓度 Triton X-114 去除流感病毒原液中内毒素后对血凝素含量差异无统计学意义。综合流感疫苗检测指标,蛋白质含量合格(<国家标准 300 μ g/mL),血凝素含量损失较少(表 1、2)。

2.2 1% Triton X-114 内毒素去除效果 3 批 H3N2 流感病毒原液中内毒素水平均能降至低于 0.25EU/mL,清除率均大于 99.9%,结果稳定,重复性好。同时对 A 批 H3N2 流感病毒原液去除内毒素过程中 3 次抽提后内毒素含量、蛋白质含量、血凝效价及血凝素含量进行追踪检测,发现随抽提次数增加病毒

原液中内毒素逐步下降,蛋白质含量在一定程度上也有所降低,血凝效价保持不变,血凝素含量几乎无变化;第 3 轮抽提结束后细菌内毒素含量已降至低于 0.25EU/mL,去除率达到 99.9%。蛋白质含量降低,血凝素含量损失很小,保证病毒原液质量,达到最终去除内毒素的目的(表 3、4,插页 I 彩图 1)。

表 1 抽提前后各指标比较

时间	内毒素含量 (EU/mL)	血凝效价	蛋白质含量 (μ g/mL)	血凝素含量 (μ g/mL)
抽提前	200~400	512	141.090 4	86.75
抽提后				
1% Triton X-114 实验次数				
1	<0.25	512	120.145 6	86.15
2	<0.25	512	119.835 5	86.72
3	<0.25	512	119.894 7	86.48
均值	<0.25	512	119.958 6	86.64
2% Triton X-114 实验次数				
1	<0.25	512	114.092	86.52
2	<0.25	512	116.132 1	86.19
3	<0.25	512	115.345 6	86.31
均值	<0.25	512	115.189 9	86.34
3% Triton X-114 实验次数				
1	<0.25	512	114.010 6	85.88
2	<0.25	512	113.554 6	85.98
3	<0.25	512	114.081 7	86.08
均值	<0.25	512	113.882 3	85.98

表 2 流感病毒原液中血凝素含量方差分析

变异来源	偏差平方和	自由度	F	P
组间	0.655	2	3.071	0.121
组内	0.640	6		
总	1.295	8		

表 3 1% Triton X-114 内毒素去除效果

时间	内毒素含量 (EU/mL)	血凝素含量 (μ g/mL)	内毒素去除率 (%)	血凝素回收率 (%)
抽提前				
A 批 H3N2	200~400	86.75	—	—
B 批 H3N2	100~200	87.96	—	—
C 批 H3N2	100~200	84.26	—	—
抽提后				
A 批 H3N2				
试验次数 1	<0.25	86.15	>99.9	99.31
试验次数 2	<0.25	86.72	>99.9	99.97
试验次数 3	<0.25	86.48	>99.9	99.69
均值	<0.25	86.64	>99.9	99.87

—:表示无此项。

续表 3 1% Triton X-114 内毒素去除效果

时间	内毒素含量 (EU/mL)	血凝素含量 (μg/mL)	内毒素 去除率(%)	血凝素 回收率(%)
B 批 H3N2				
试验次数 1	<0.25	86.92	>99.9	98.82
试验次数 2	<0.25	86.51	>99.9	98.35
试验次数 3	<0.25	86.61	>99.9	98.47
均值	<0.25	86.68	>99.9	98.54
C 批 H3N2				
试验次数 1	<0.25	84.22	>99.9	99.95
试验次数 2	<0.25	84.21	>99.9	99.94
试验次数 3	<0.25	84.20	>99.9	99.93
均值	<0.25	84.21	>99.9	99.94

—:表示无此项。

表 4 A 批 H3N2 流感病毒原液抽提前后各指标比较

A 批 H3N2 流感 病毒原液	内毒素含量 (EU/mL)	血凝效价	蛋白质含量 (μg/mL)	血凝素含量 (μg/mL)
抽提前	200~400	512	140.207 2	86.78
第 1 次抽提后	12.5~25	512	126.119 8	86.69
第 2 次抽提后	2.5~12.5	512	120.102 8	86.53
第 3 次抽提后	<0.25	512	119.341 1	86.52

2.3 残余 Triton X-114 的去除 透析前后 Triton X-114 残余量由 100μg/mL 降至 5μg/mL, 蛋白和血凝素微量损失, 内毒素含量和血凝效价未发生改变(表 5)。

表 5 透析前后各量的变化

样品	Triton X-114 含量(EU/mL)	内毒素含量 (EU/mL)	血凝效价	蛋白质含量 (μg/mL)	血凝素含量 (μg/mL)
透析前	100	<0.25	512	113.882 3	86.52
透析后	5	<0.25	512	112.944 9	86.37

3 讨 论

内毒素污染的去除历来都受到各国学者的重视。现有的方法常根据其分子特性来去除内毒素, 如依据内毒素分子通常以聚合状态存在, 具有较大的相对分子重, 可选用超滤膜来去除内毒素, Czermak 等^[5]发现疏水合成的超滤膜能有效去除内毒素。内毒素分子 pK1 值约为 1.3, 在生理条件下带有部分负电荷, 根据这一性质, 可用阴离子交换色谱法去除蛋白质制品中的内毒素。欧洲学者(专利号 EP0800862)采用含有磺酸基苯乙烯-二乙烯基苯共聚物来去除重组蛋白质肿瘤坏死因子或白介素中内毒素, 其原理是利用离子交换手段主要吸附重组蛋白质。但由于内毒素具有的一些固有特性, 如带电性与部分蛋白质相同、双性分子以及易形成微囊结构等, 使得上述常用从蛋白质溶液中去内毒素的方法很难将其与蛋白质彻底分离。

1990 年 Aida 和 Pabst^[6]首次报道用 Triton X-114 液相分离法去除重组蛋白溶液中内毒素, Liu 等^[7]比较 Triton X-114 分离法、多粘菌素-琼脂糖和组氨酸-琼脂糖亲和层析法在较大量重组蛋白质中去除内毒素方面的优缺点, 发现 Triton X-114 分离法较其他两种方法有效。王雪薇和王建华^[8]报道 Triton X-114 萃取法可以去除 A 群脑膜炎荚膜多糖中内毒素。作者在参考前人工作基础上, 经过多次试验摸索, 建立了 Triton X-114 去除流感单价病毒原液中内毒素的液相分离方法。

作者通过不同浓度 Triton X-114 对流感单价病毒原液中内毒素液相分离效果的摸索, 结果显示不同浓度 Triton X-114 均能有效去除流感单价病毒原液中内毒素, 效价保持不变, 但蛋白质和血凝素回收率不同。Triton X-114 浓度越低, 蛋白质损失越小, 血凝素含量损失越小, 最终选择 1% 作为 Triton X-114 去除内毒素的浓度。

最后, 作者采用透析法去除残余 Triton X-114, 蛋白质含量和血凝素含量损失很小, 且血凝效价未发生改变。虽然有文献报道可采用凝胶过滤法^[8], 但考虑到不可避免地引起蛋白质溶液的稀释或吸附, 故未采用。

综上所述, 以 Triton X-114 去除内毒素的液相分离法为基础, 首次建立了去除流感单价病毒原液中内毒素的方法, 最后采用透析法去除残余 Triton X-114, 所有指标均优于国家标准, 方法简单易行, 且经济有效。

参考文献:

- [1] Perola OM, Andre ML, Priscila GM, et al. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review [J]. J Pharm Pharmaceut Sci, 2007, 10(3): 388.
- [2] 国家药典委员会. ISBN 750256526 中华人民共和国药典(三部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [3] 郭元吉, 程小雯. 流行性感病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997.
- [4] 魏晓露, 高菁霞, 何香莲, 等. 流感病毒裂解方法优化研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(12): 1307.
- [5] Czermak P, Ebrahimi M, Catapano G. New generation ceramic membranes have the potential of removing endotoxins from dialysis water and dialysate[J]. Int J Artif Organs, 2005, 28(7): 694.
- [6] Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114[J]. J Immunol Methods, 1990, 132: 191.
- [7] Liu SG, Tobias R, McClure S, et al. Removal of endotoxin from recombinant protein[J]. Clin Biochem, 1997, 30(6): 455.
- [8] 王雪薇, 王建华. Triton X-114 萃取法去除脑膜炎球菌荚膜多糖中的内毒素[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(5): 438.

(收稿日期: 2009-03-25 修回日期: 2009-08-07)