

AT-2 灭活 HIV-1 病毒及纯化回收鉴定

鲍琳琳¹, 邓巍¹, 孙丽华¹, 高虹¹, 卢葳², 秦川¹

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021; 2. 法国巴黎第五大学肿瘤免疫治疗研究中心)

【摘要】 目的 制备具备完整空间构型且纯度在 90% 以上的灭活 HIV-1 病毒, 用于 HIV 疫苗研究。方法 应用化学制剂 2,2'-dithiodipyridine (aldrithiol-2; AT-2) 灭活 HIV-1 病毒, 对灭活的病毒超速离心浓缩并洗涤去除灭活用的化学制剂 AT-2。采用分子筛技术去除灭活病毒中残存的杂质蛋白质。结果 250 μmol/L AT-2 与 HIV-1 37℃ 作用 1 h 可以彻底灭活病毒的感染性, 同时保留病毒的免疫原性。灭活的病毒纯化后检测不到 AT-2 的残留, 检测牛血清白蛋白残余量低于 50 ng/mL。结论 灭活的 HIV-1 病毒经过纯化后纯度达到 95.6%, 可以满足作为 HIV 疫苗研究的免疫刺激剂的使用要求。

【关键词】 AT-2; 灭活病毒; 纯化

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)04-0021-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.04.005

AT-2-Inactivation of HIV-1 Virus and Its Purification and Identification

BAO Lin-lin¹, DENG Wei¹, SUN Li-hua¹, GAO Hong¹, Louis LU², QIN Chuan¹

(1. Center of Comparative Medicine, Institute of Laboratory Animal Science, CAMS & PUMC, Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health, Beijing 100021, China,

2. Institut de Recherche sur les Vaccins et l'Immunothérapie des Cancers et Sida, Université René Descartes (Paris V), Paris, France)

【Abstract】 Objective To prepare an inactivated HIV-1 virus with configurational integrity and more than 90% purity for HIV vaccine research. **Methods** HIV-1 virus was inactivated by 2,2'-dithiodipyridine (aldrithiol-2, AT-2) with complete immunogenicity. Ultracentrifugation and washing was conducted to remove the chemical reagent used for virus inactivation. The residual impurity proteins in the inactivated virus was removed by molecular sieve technology. **Results** For chemical inactivation, HIV-1 virus was treated with 250 μM AT-2 for 1 h at 37℃. Chemically inactivated noninfectious SIV with conformationally and functionally intact envelope glycoproteins was produced by treatment with AT-2 as described elsewhere^[1-2]. No AT-2 residue was detected in the purified inactivated virus. Residual bovine serum albumin was detected less than 50 ng/mL. **Conclusions** In this study HIV-1 virus was successfully inactivated with AT-2 and reached a purity of 95.6%. It can meet the requirements as an immune stimulating agent in HIV vaccine research.

【Key words】 AT-2; Inactivation, virus; Liquid chromatography; Purification

【基金项目】 科技重大专项-艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治:2009ZX10004-307; 卫生公益性行业科研专项项目:200802036; 中央级公益性科研院所基本科研业务费:DWS200810。

【作者简介】 鲍琳琳, 助理研究员, 研究方向: 艾滋病免疫治疗。

【通讯作者】 秦川, 教授, 博士生导师, Email: chuanqin@vip.sina.com。

传统的病毒灭活方法有加热灭活或者应用一定浓度的甲醛液灭活,这些方法通常会破坏病毒的空间结构从而改变病毒的抗原性,灭活的病毒多作为免疫原用于制备疫苗。HIV 病毒在多年的研究中常采用加热的方法灭活,灭活后的病毒与小片段的多肽在体外刺激试验中比较,多肽具有更好的刺激活性,但是体内试验的结果正好相反。造成这种结果的原因是多方面的,这与病毒的构型改变影响了灭活病毒的免疫原性有关。有文献报道用化合物 2,2'-dithiodipyridine (aldrithiol-2, AT-2) 共价修饰 HIV 病毒核衣壳(NC)蛋白中的锌指结构,从而灭活其感染性,这种灭活方法保持了病毒表面的病毒和宿主细胞来源的蛋白结构和功能的完整性。本研究是应用这种化学制剂将 HIV-1 病毒灭活,对灭活的病毒加以纯化已达到能够进行体内试验的纯度,为进一步研究 HIV 免疫机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 病毒:HIV 病毒来自于 HIV 病人血浆,由 PBMC 细胞培养后收集上清液,存放于 -80°C 保存备用。

1.1.2 主要仪器设备:XK16/70 柱(Pharmacia GE),GC-17 气相色谱仪,液相色谱仪(Bio-Rad),酶标仪(Bio-Rad),涡旋振荡器 LDZ5-2,分析天平,AR1140 万分之一,低速离心机,生物安全柜, -80°C 冰箱。

1.1.3 主要试剂及耗材:AT-2(Roche 公司),PBS,20% 乙醇,Sephacryl S-1000 super fine(Pharmacia GE),30% 丙烯酰胺混合液,10% 十二烷基硫酸钠(SDS),10% 过硫酸铵,分离胶缓冲液(1.5 mol/L pH8.8 Tris-HCl 缓冲液),2×SDS 凝胶上样缓冲液,5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液,转膜缓冲液,10×TBS,TBS/T 洗液,封闭液,底物液,SDS-PAGE 蛋白电泳:采用 Tris-甘氨酸-SDS-PAGE。羊抗人 IgG 辣根酶标记(Jackson),Mark Prestain prolander(Invitrogen),ecl 染色剂(中山公司)。PerkinElmer Life Sciences, Inc.,HIV-1 p24 ELISA 试剂盒。定量检测牛血清白蛋白酶联免疫试剂盒(无锡博生医用技术开发有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 灭活 HIV 病毒:使用二甲基亚砜将 AT-2 的浓度调配到 $250\ \mu\text{mol/L}$,在 37°C 条件下,将溶解的

AT-2 滴加入待灭活的 HIV 病毒,边滴加边摇匀。滴加完毕后在 37°C 条件下反应 $1\ \text{h}^{[3]}$ 。

1.2.2 灭活效果测定:RPMI 1640 培养液(含 10% 牛血清)中加入 PHA,将配好的培养基加入 PBMC 细胞中,置 CO_2 培养箱培养过夜。次日用 PBS 洗细胞 1 次。细胞中加入 RPMI 1640 培养液(含 $\text{IL-20}\ \text{U/mL}$),放 CO_2 培养箱。4 d 后接种灭活的 HIV 病毒。接种病毒后观察 2 周,4、6、9、12、14 d 取样品上清作病毒载量测定。

1.2.3 浓缩及洗涤灭活病毒:将灭活的 HIV 病毒已超速离心的方法浓缩洗涤, $100\ 000\ \text{g}$ ($29\ 300\ \text{rpm}$) 4°C 离心 2 h。离心 3 次洗涤 HIV 灭活病毒。

1.2.4 纯化灭活 HIV 病毒:XK16/70 ($140\ \text{mL}$, $70\ \text{cm}$ 柱长度凝胶层),应用这种分子筛对灭活 HIV 病毒进行纯化。聚丙烯酰胺葡聚糖超微凝胶(Sephacryl S-1000 Super fine)装填于 XK16/70 的柱子中并用 PBS 平衡柱子,调基线使基线为零。上蓝色葡聚糖-2000(大分子量分子全排阻),观察装柱情况,如蓝色葡聚糖均匀稳定成一条基线向下移动证明柱子已装好。用 PBS 将葡聚糖冲出。上样,加 5 ml 的灭活 HIV 病毒进入柱子,并用液相色谱仪记录,收集峰值的液体,同时用 PBS 洗脱。同时测定回收液 280 nm 的 A 值,确定回收的溶液中的总蛋白含量。

1.2.5 AT-2 残余量测定:气相色谱分析:用移液器精密量取对照品 $100\ \mu\text{L}$,置于 $10\ \text{mL}$ 容量瓶中,加入乙酸乙酯稀释至刻度,摇匀,作为 1 号标准溶液,浓度为 $10\ \mu\text{g/mL}$,再用逐步稀释法,配成 8、6、5、4、2、1 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液,按照色谱条件进样分析,以峰面积与浓度作标准曲线。用“金羊工作站”提供的统计软件进行结果分析。

1.2.6 残余牛血清测定:应用 ELISA 的方法检测灭活 HIV 病毒中牛血清含量,根据药典第三部要求作为抗原刺激剂的生物制品牛血清残留量不超过 $50\ \text{ng/mL}$ 。

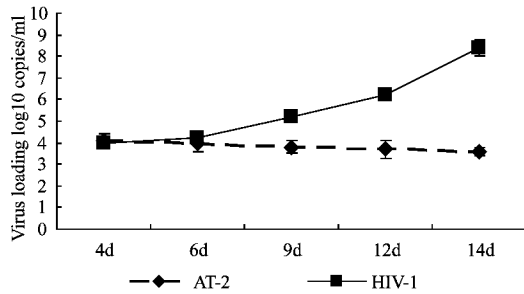
1.2.7 抗原含量测定:用 ELISA 方法进行 P24 测定。

2 结果

2.1 HIV 病毒灭活效果

AT-2 灭活后的 HIV-1 病毒和未灭活的 HIV-1 病毒分别加入到 PBMC 细胞中,在接种后的第 4、6、

9、12、14 天取出一半的溶液作病毒载量测定。测定结果显示,灭活的病毒在 PBMC 细胞中没有增殖,证明病毒已经被彻底灭活。结果见图 1。



HIV-1 病毒 ,HIV-1 : HIV-1 病毒对照

图 1 病毒载量变化 ,AT-2 : AT-2 灭活的

Note: AT-2: AT-2 inactivated HIV-1 virus;

HIV-1: HIV-1 virus control

Fig. 1 Viral loading in days

2.2 灭活病毒浓缩及洗涤的效果

灭活的 HIV-1 病毒超速离心,后经过 3 遍洗涤体积浓缩了 100 倍。RT-PCR 检测灭活 HIV-1 病毒载量,灭活病毒比超离前浓缩了 50 倍,回收率在 51% 左右。气相色谱分析的方法检测 MT-2 在灭活 HIV-1 病毒中的残余量,AT-2 残留量在气相色谱检测的域值以下,即检测不到灭活剂的残留。灭活病毒洗涤前、后的变化见表 1。

表 1 灭活病毒洗涤前后比较

Tab.1 Results of ultracentrifugation of the inactivated HIV-1 virus

组别 Groups	体积 Volume (mL)		载量 Virus loading (copies / mL)		AT-2 含量 AT-2 content (μg / mL)	
	洗涤前 Before washing	洗涤后 After washing	洗涤前 Before washing	洗涤后 After washing	洗涤前 Before washing	洗涤后 After washing
Test 1	900	9	1.006 × 10 ⁸	5.124 × 10 ⁹	N	-
Test 2	1000	10	0.971 × 10 ⁸	5.01 × 10 ⁹	N	-
Test 3	600	6	0.947 × 10 ⁸	4.792 × 10 ⁹	N	-

N 未检测, - 未检测到

Note: N: not tested; - not detected

2.3 对纯化前、后的样品进行蛋白含量测定

A₂₈₀ nm 测定峰 1 回收液中蛋白含量为:0.022 mg/mL;峰 2 回收液中蛋白含量为:0.001 mg/mL。根据液相色谱分析图显示图 2,两个峰已经完全分开 根据蛋白量计算纯度为 95.6%。

2.4 抗原回收率及纯化结果

对几次纯化结果进行了灭活病毒 P24 测定,各

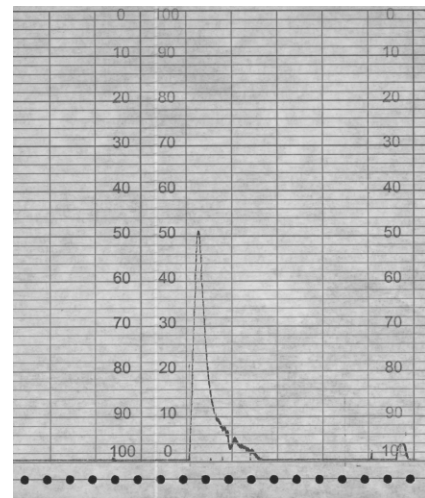


图 2 灭活 HIV Sephacry S-4000 柱层析图谱

Fig. 2 Sephacry S-4000 column chromatographic profile of the purified inactivated HIV virus.

次结果都很接近,重复性较好。按灭活病毒原液量、纯化后的灭活病毒收液量及其 P24 浓度进行计算,灭活病毒的平均回收率为 74%。柱层析后牛血清蛋白清除率为 99% 以上,纯化后的样品中牛血清蛋白残留含量 < 50 ng/mL。灭活病毒纯化蛋白含量及回收率结果见表 2。

表 2 灭活病毒纯化蛋白含量及回收率

Tab.2 Results of ultracentrifugation of the inactivated HIV-1 virus

组别 Groups	牛血清蛋白含量 BAS content (ng/mL)		P24 含量 P24 content (p/mL)		回收率 Recovery %
	洗涤前 Before washing	洗涤后 After washing	洗涤前 Before washing	洗涤后 After washing	
Test 1	N	6.12	2.94 × 10 ⁴	2.13 × 10 ³	75
Test 2	N	7.14	2.67 × 10 ⁴	1.73 × 10 ³	70
Test 3	N	5.78	2.39 × 10 ⁴	1.42 × 10 ³	77

N 未检测 - < 50 ng/mL

Note: N: not tested; - < 50 ng/mL

3 讨论

一些被灭活的完整病毒颗粒已成功应用于疫苗研制,但以前的灭活方法可使病毒蛋白变性,免疫原性降低使灭活的病毒失去了作为免疫刺激剂的基本结构。一接种疫苗后,值得注意的是,一些疫苗促进了疾病的发展而非起到保护作用。我们用化合物 2,2'-dithiodipyridine (aldrithiol-2; AT-2) 共价修饰人免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 核衣壳 (NC) 蛋白中的锌指结构^[4,7],从而灭活其感染性。

(下转第 61 页)

免疫指标的影响 [J]. 实验动物与比较医学, 2010 31 (2): 113-116.

[6] 卢斌, 王坚, 孙玲君, 等. 五味子对实验性水上漂浮及高强度运动大鼠垂体-性腺轴的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(8): 26-29.

[7] 宁钢民, 俞方敏, 白岩, 等. 基于遥测技术的大鼠 24 小时心率变异性分析 [J]. 生物医学工程学杂志, 2006, 23(2): 235-238.

(修回日期) 2010-10-08

(上接第 23 页)

灭活病毒在体外不易发觉感染性。和常规方法加热或甲醛液处理灭活的病毒相比, 保持了病毒表面的病毒和宿主细胞来源的蛋白结构和功能的完整性。AT-2 灭活病毒其结构和功能的完整性的维持表明这种病毒可能是有效的疫苗抗原^[3, 5-9]。我们的研究也证实了这种化学方法灭活的病毒是被彻底灭活的, 病毒不再具有感染性和复制能力。

灭活的 HIV-1 病毒用作体内试验的免疫刺激剂, 对于其纯度有一定要求。其中混在的蛋白在一定程度上会影响灭活病毒的免疫效果。基于这种要求, 对于灭活的病毒做了纯化和浓缩的处理。灭活 HIV 病毒经过超速离心浓缩后过 Sephacry S-1000 凝胶柱纯化, 99% 以上的杂蛋白及残留牛血清被除去。灭活病毒回收率为 74% 左右。总蛋白含量的减少说明纯度的提高, 达到了纯化的目的。凝胶过滤层析是层析技术中最简单、条件最温和, 对保持生物大分子的活性最有力的方法。纯化后的灭活病毒纯度在 95.6%, 已经可以满足体内试验的要求, 为做 HIV-1 病毒免疫机制研究以及研发疫苗做准备。

参考文献:

[1] Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins

[J]. J Virol. 1998; 72:7992-8001.

[2] Arthur LO, Bess JW Jr, Chertova EN. Chemical inactivation of retroviral infectivity by targeting nucleocapsid protein zinc fingers: a candidate SIV vaccine [J]. AIDS Res Hum Retrovir. 1998, 14 (Suppl. 3): S311-S319.

[3] Murdin AD, Barreto L, Plotkin S. Inactivated poliovirus vaccine: past and present experience. Vaccine. 1996, 14:735-746.

[4] Berg JM, Shi Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc [J]. Science. 1996, 271:1081-1085.

[5] Clemens R, Safary A, Hepburn A, et al. Clinical experience with an inactivated hepatitis A vaccine [J]. J Infect Dis. 1995, 171 (Suppl. 1): S44-S49.

[6] Cranage MP, Baskerville A, Ashworth LA, et al. Intrarectal challenge of macaques vaccinated with formalin-inactivated simian immunodeficiency virus [J]. Lancet. 1992, 339: 273-274.

[7] Henderson LE, Copeland TD, Sowder RC, et al. Primary structure of the low molecular weight nucleic acid-binding proteins of murine leukemia viruses [J]. J Biol Chem. 1981, 256:8400-8406.

[8] Murphey-Corb M, Martin LN, Davison-Fairburn B, et al. A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques [J]. Science. 1989, 246:1293-1297.

[9] Ott DE. Cellular proteins in HIV virions [J]. Rev Med Virol. 1997, 7:167-180.

(修回日期) 2010-09-29