



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102764432 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201110357360. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 11. 11

A61K 39/12 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

C12N 7/06 (2006. 01)

CCTCC GDC0174 2011. 10. 21

C12N 7/02 (2006. 01)

CCTCC V201134 2011. 10. 21

A61P 31/20 (2006. 01)

(71) 申请人 中国水产科学研究院长江水产研究所

地址 430223 湖北省武汉市武汉东湖高新技术开发区武大园一路 8 号

(72) 发明人 曾令兵 肖汉兵 孟彦 马杰
肖艺 周勇 高正勇 孙建滨

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗及制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗及制备方法和应用,其步骤:A. EPC 细胞复苏;B. EPC 细胞培养,用于扩增大鲵虹彩病毒;C. GSIV 病毒扩增:待 EPC 传代细胞在瓶底铺满时,加入感染的病毒悬液;D. GSIV 病毒的收获:病毒连续培养,获得扩增病毒液,用于后续滴度实验以及灭活疫苗;E. 病毒滴度测定,病毒滴度为灭活疫苗的效价;F. GSIV 病毒的灭活:获得大鲵虹彩病毒灭活疫苗原液,置于冰箱保存;G. 灭活病毒疫苗:将灭活好的疫苗用鱼用生理盐水稀释,得到大鲵细胞培养灭活疫苗。灭活疫苗在制备治疗或预防大鲵病毒性出血病药物中的应用。方法简单、操作方便,病毒灭活彻底,安全性高。浸泡免疫的保护率达 73%,注射免疫保护率达 82%。

1. 一种大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗,其特征在于:中国大鲵 (*Andrias davidianus*), CCTCC V201134。

2. 根据权利要求1所述的一种大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗,其特征在于:所述的灭活疫苗含有鲤上皮瘤细胞系 (EPC), CCTCC GDC0174。

3. 权利要求1所述的一种大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗的制备方法,其步骤是:

A. EPC细胞复苏:取液氮中保存的EPC细胞,37℃温育2~3分钟使其融化,加入含10% V/V 小牛血清的 MEM 培养液:5ml/T₂₅ 培养瓶,pH7.2~7.5,转移至培养瓶中25~26℃静置6~8小时培养,在细胞培养2~3天铺满培养瓶底后,用胰蛋白酶消化法进行传代培养;

B. EPC细胞培养:取长满单层的鲤鱼上皮瘤细胞,在无菌超净台里吸弃旧培养基,每瓶添加2ml浓度为0.25% V/V 胰酶消化液,添加2ml含10% V/V 小牛血清的 MEM 培养基中和胰酶,用移液管轻吹细胞瓶底,收集细胞悬液至15ml离心管里,1000r/min离心5min,离心结束后,吸弃上清液,添加4~6ml含10% V/V 小牛血清的 MEM 培养基悬浮细胞沉淀,取4个T25细胞培养瓶,每瓶加4ml新鲜配置的培养基再添加1~1.5ml细胞悬液,置于25℃培养箱中培养,细胞形成汇合单层后,用于扩增大鲵虹彩病毒;

C. GSIV病毒扩增:待EPC传代细胞在瓶底铺满时,吸出培养液,然后按1/10的培养基体积加入感染的病毒悬液,病毒的感染复数MOI为1~5PFU/cell,在病毒吸附细胞40~60分钟后,补加含2% V/V 小牛血清的 MEM 维持液进行病毒增殖;

D. GSIV病毒的收获:病毒连续培养3~6天,在显微镜下观察,待鲤鱼上皮瘤细胞出现典型细胞病变效应时,将T25细胞瓶置于-80℃冰箱冻存,结冻后取出细胞瓶放室温溶解,反复冻融两次,在超净台里用移液管轻吹培养瓶壁,将病毒感染的细胞悬液装入50ml无菌离心管里,以4000r/min离心20min,收集离心后上清液,获得扩增病毒液,用于后续滴度实验以及灭活疫苗制备;

E. 病毒滴度测定:将待测病毒液进行一系列10倍稀释 $10^{-1} \sim 10^{-10}$,在96孔板上感染EPC细胞,在病毒感染24~120小时内,按Reed-Muench法计算病毒滴度TCID₅₀值,病毒滴度为灭活疫苗的效价;

F. GSIV病毒的灭活:取100ml大鲵虹彩病毒原液,加入0.2ml福尔马林,使其终浓度为0.2% V/V,混合均匀后置于37℃条件下灭活48~72h,待灭活结束后添加终浓度为0.05%的亚硫酸钠中和残余福尔马林,获得大鲵虹彩病毒灭活疫苗原液,并置于4℃冰箱保存备用;

G. 灭活病毒疫苗的使用:将灭活好的疫苗用鱼用生理盐水0.65%稀释至效价为 10^5 TCID₅₀/ml,得到直接使用的大鲵细胞培养灭活疫苗。

4. 权利要求1所述的一种大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗在制备治疗或预防大鲵病毒性出血病药物中的应用。

大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于水产养殖病害防控领域,具体涉及到一种大鲵病毒性出血病的细胞培养灭活疫苗,同时还涉及该灭活疫苗的制备方法,以及该大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗的用途。本发明所用的鲤上皮瘤细胞系(EPC)由武汉大学保藏中心保藏,保藏号为:CCTCCGDC0174;大鲵病毒性出血病毒病原——大鲵虹彩病毒由本实验室从患典型出血病的大鲵体内分离并鉴定,由武汉大学保藏中心保藏,保藏号为:CCTCC V201134。

背景技术

[0002] 大鲵(Chinese giant salamander)是我国特有的珍稀水生两栖类动物,俗称“娃娃鱼”,属于国家二级保护动物。大鲵肉质细嫩、营养丰富,并且具有很高的药用价值,也是水生动物向陆生动物过渡的类型,对研究物种进化有重要意义。随着国家对大鲵人工繁育驯养以及经营利用的许可,目前大鲵已经成为一种珍贵的水产养殖品种,在全国 20 多个省市都有养殖,市售价格约在 2400 元/kg,养殖效益非常可观。同时,由于大鲵养殖业规模的不断增加和集约化程度的提高,疾病成为制约养殖更大发展的瓶颈。近 5 年来,许多养殖场都暴发了大鲵病毒性出血病。该病传染性强且死亡率高,对大鲵养殖业造成了巨大的经济损失。我们通过病原学研究发现,此病由大鲵虹彩病毒感染引起,并分离鉴定了大鲵虹彩病毒。该病目前尚无有效的药物治疗方法。

[0003] 疫苗免疫被认为是控制水生动物病毒性传染性疾病的最佳手段。建立大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗的制备方法,制备大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗,对于开展疫苗的规模化生产与病害的免疫预防有重要意义。细胞培养灭活疫苗由于其生产成本低、工艺简单且安全性能好,可广泛应用于水产养殖中疾病的防控。

[0004] 目前尚未见到大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗的相关报道,本发明首次利用鱼类细胞系,建立了一种高效、安全、可规模生产的大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗的制备方法,并制备出大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗。

发明内容

[0005] 本发明的目的是在于提供了一种大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗,该疫苗含完整的病毒抗原蛋白,在效价为 10^5 TCID₅₀/ml 时免疫效果好。此外用亚硫酸钠 NaSO₃ 中和残余福尔马林,消除了灭活剂自身的毒性,提高了疫苗的安全性。

[0006] 本发明提供了一种大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗的制备方法。本发明制备疫苗的生产周期短,生产工艺简单,获得疫苗的数量多,疫苗的安全性与免疫原性好,该方法使用 0.2% (V/V) 的灭活剂福尔马林于 37℃ 灭活 48-72 小时即可达到完全灭活病毒的目的。该方法简单快捷,灭活彻底,并且不破坏抗原蛋白的完整性。

[0007] 本发明还有一个目的是在于提供了一种大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗在制备治疗或预防大鲵病毒性出血病药物中的应用。通过应用该疫苗对大鲵苗种进行注射免疫,其免疫保护率达 82%,浸泡免疫的保护率达 73%。

[0008] 为了实现上述的目的,本发明采用以下技术措施:

[0009] 大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗的制备方法,其步骤是:

[0010] A. EPC 细胞复苏:取液氮中保存的 EPC 细胞,37℃温育 2~3 分钟使其融化,加入含 10% (V/V) 小牛血清的 MEM(Eagle's minimum essential medium, Sigma) 培养液 (5ml/T₂₅ 培养瓶, pH7.2~7.5),转移至培养瓶中 25~26℃静置 6~8 小时培养,待细胞贴壁后换新鲜培养液。在细胞培养 2~3 天铺满培养瓶底后,用胰蛋白酶消化法进行传代培养。

[0011] B. EPC 细胞培养:取长满单层的鲤鱼上皮瘤细胞 2 瓶,在无菌超净台里吸弃旧培养基,每瓶添加 2ml 浓度为 0.25% (V/V) 胰酶消化液,在显微镜下观察发现细胞解离形成单个细胞后,迅速添加 2ml 含 10% (V/V) 小牛血清的 MEM 培养基中和胰酶,用移液管轻吹细胞瓶底,收集细胞悬液至 15ml 离心管里,1000r/min 离心 5min。离心结束后,吸弃上清液,添加 4~6ml 含 10% (V/V) 小牛血清的 MEM 培养基悬浮细胞沉淀。取 4 个 T25 细胞培养瓶,每瓶加 4ml 新鲜配置的培养基再添加 1~1.5ml 细胞悬液,置于 25℃培养箱中培养,待细胞形成汇合单层后,用于扩增大鲵虹彩病毒。

[0012] C. GSIV 病毒扩增:待 EPC 传代细胞在瓶底铺满时,吸出培养液,然后按 1/10 的培养基体积加入感染的病毒悬液,病毒的感染复数 MOI (Multiplicity of infection) 为 1~5PFU/cell,在病毒吸附细胞 40~60 分钟后,补加含 2% (V/V) 小牛血清的 MEM(pH7.2~7.5) 维持液进行病毒增殖。

[0013] D. GSIV 病毒的收获:病毒连续培养 3~6 天,在显微镜下观察,待鲤鱼上皮瘤细胞出现典型细胞病变效应时,立即将 T25 细胞瓶置于 -80℃冰箱冻存,结冻后取出细胞瓶放室温 (20~25℃,以下相同) 慢慢溶解,如此反复冻融两次,在超净台里用移液管轻吹培养瓶壁,将病毒感染的细胞悬液装入 50ml 无菌离心管里,以 4000r/min 离心 20min,收集离心后上清液,即获得扩增病毒液,用于后续滴度实验以及灭活疫苗制备。

[0014] E. 病毒滴度测定:将待测病毒液进行一系列 10 倍稀释 (10^{-1} ~ 10^{-10}),按上述病毒增殖方法在 96 孔板上感染 EPC 细胞。在病毒感染 24~120 小时内,每天观察细胞病变情况并记录。按 Reed-Muench 法计算病毒滴度 TCID₅₀ 值。此病毒滴度即为灭活疫苗的效价。

[0015] F. GSIV 病毒的灭活:取 100ml 大鲵虹彩病毒原液,加入 0.2ml 福尔马林,使其终浓度为 0.2% (V/V),混合均匀后置于 37℃条件下灭活 48~72h,待灭活结束后添加终浓度为 0.05% 的亚硫酸钠中和残余福尔马林,即获得大鲵虹彩病毒灭活疫苗原液,并置于 4℃冰箱保存备用。

[0016] G. 灭活病毒疫苗的使用:将灭活好的疫苗用鱼用生理盐水 (0.65%) 稀释至效价为 10^5 TCID₅₀/ml,即得到可直接使用的大鲵细胞培养灭活疫苗。

[0017] 3、大鲵病毒性出血病毒病原——大鲵虹彩病毒由本实验室从患典型出血病的大鲵体内分离并鉴定,大鲵属;中国大鲵 (Andrias davidianus);蛙病毒属大鲵虹彩病毒;武汉大学中国典型培养物保藏中心保藏单位;保藏号 CCTCC V201134。所述的大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗含有鲤上皮瘤细胞系 (EPC),CCTCC GDC0174。

[0018] 本疫苗具有如下特征:

[0019] 1. 本疫苗对 EPC 细胞和健康大鲵不具感染力。

[0020] 2. 本疫苗含有 GSIV 病毒的全部完整蛋白。

[0021] 3. 本疫苗效价为 10^5 TCID₅₀/ml。

[0022] 4. 本疫苗无菌、无灭活剂残留。

[0023] 5. 本疫苗为红色澄清液体, pH7.0 ~ 7.5。

[0024] 6. 本疫苗只对大鲵病毒性出血病有效。

[0025] 灭活疫苗的安全性检验:

[0026] 1) 灭活效果检验:取制备好的疫苗按上述病毒增殖的方法接种 EPC 细胞,同时设置阴性对照,观察 5 ~ 6 天,若出现细胞病变效应则表明病毒灭活不完全;若未见细胞病变效应,再盲传 2 次,若盲传出现细胞病变,则表明病毒灭活仍不完全,若盲传 2 次均未出现细胞病变,则表明病毒灭活完全,疫苗安全。将盲传未出现细胞病变效应的细胞培养物置 -80℃ - 室温冻融 2 次,采用病毒核酸提取试剂盒提取病毒核酸,用针对病毒外衣壳蛋白基因 (MCP) 设计的多聚酶链式反应 (PCR) 引物进行病毒核酸的 PCR 检测,同时设置阳性病毒核酸对照。如果从盲传培养病毒材料中的病毒核酸检测结果为阴性,则说明病毒被彻底灭活。

[0027] 2) 无菌检验:取上述制备好的疫苗,接种脑浸液细菌培养基 (BHI) 平板,用划线法涂平板后于 37℃ 培养 15 天,若有菌落生长,则表明疫苗有细菌污染,需用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后使用;若无菌落生长,则表明疫苗是无菌的。

[0028] 3) 鱼体安全性实验:取上述制备好的疫苗,注射健康 1 ~ 2 龄大鲵 30 尾体长 10 ~ 20cm), 注射剂量为 0.3 ~ 0.5ml/尾,阴性对照注射相同剂量的生理盐水。饲养 15 ~ 30 天,若疫苗组出现死亡,而阴性对照组未出现死亡,表明疫苗不安全;若疫苗组和阴性对照组均未见死亡,则表明疫苗安全。

[0029] 一种大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗在制备治疗或预防大鲵病毒性出血病药物中的应用。灭活疫苗的保护效果评估的步骤是:

[0030] 1. 取健康的 1 ~ 2 龄大鲵 30 尾 (体长 10 ~ 20cm) 于 20℃ 室内饲养 10 天,分组每尾注射 0.3 ~ 0.5ml 不同稀释度的灭活疫苗,同时用 MEM 细胞培养液注射相同数量的大鲵作为阴性对照,20℃ 饲养 10 天后,随意从每组中取出一部分鱼采血做血清中和试验,测定免疫鱼与对照鱼的血清中和抗体水平;

[0031] 2. 将每组中的另一部分鱼以强毒攻击,测定其免疫保护率。经试验测定,免疫鱼中和抗体效价为 1 : 1024;免疫保护率高达 82%。在较大规模的免疫保护效果测定试验中,用大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗 (效价为 10⁵TCID₅₀/ml) 按每尾 0.2ml 的剂量浸泡免疫 1000 尾大鲵 (规格 5 ~ 10cm,另设对照组 100 尾,养殖水浸泡),正常饲养 6 个月后,免疫组成活率达到 73%,对照组成活率为 40%,相对免疫保护力达到 55%。表明用福尔马林灭活的病毒疫苗注射和浸泡途径对大鲵进行免疫,均有很强的保护保护力,可以有效预防大鲵病毒性出血病。

[0032] 本发明与传统灭活疫苗相比,具有以下主要优点:

[0033] 1. 制备方法简单快捷、操作方便,适于规模化批量生产和应用。

[0034] 2. 疫苗免疫原性好,免疫保护力高。

[0035] 3. 病毒灭活彻底,安全性高。

[0036] 4. 可进行浸泡和注射免疫。浸泡免疫的保护率达 73%,注射免疫保护率达 82%。

[0037] 5. 具有商品化推广价值,与免疫佐剂同时使用可进一步提供鱼体免疫保护率。

具体实施方式

[0038] 实施例 1：

[0039] 大鲵虹彩病毒 GSIV 的制备方法，其步骤是：

[0040] A. EPC 细胞培养：取液氮中保存的 EPC 细胞，37℃ 温育 2～3 分钟融化，加入含 10% (V/V) 小牛血清的 MEM 培养液 (5ml/T₂₅ 培养瓶，pH 7.2～7.5)，转移至培养瓶中 26℃ 培养 6～8 小时，待细胞贴壁后换新鲜培养液。细胞培养 2～3 天铺满培养瓶底后，采用 0.1%～0.5% 的胰蛋白酶消化贴壁细胞，进行传代培养。所述的培养基为：MEM(Eagle's minimum essential medium)Sigma 公司。

[0041] B. GSIV 病毒制备：待传代后的 EPC 细胞在培养瓶底覆盖率达 80% 以上时，去掉培养液，然后按 1/10 的培养基体积加入感染的病毒悬液，病毒的感染复数 MOI (Multiplicity of infection) 为 1～5PFU/cell，在病毒吸附细胞 40～60 分钟后，补加含 2% (V/V) 小牛血清的 MEM (pH7 或 7.2～7.5) 维持液进行病毒增殖。所述的培养基为：MEM(Eagle's minimum essential medium)Sigma 公司。

[0042] C. GSIV 病毒的收获：在病毒感染 48～72h 期间，细胞病变效应达 80% 时收获病毒，-80℃ 至室温冻融 2 次，4℃ 条件下 4000rpm 离心 20 分钟，取上清。此上清即为制备灭活疫苗的 GSIV 病毒液，于 -80℃ 保存备用。

[0043] D. 病毒滴度测定：将待测病毒悬液进行一系列 10 倍稀释 (10^{-1} ～ 10^{-10})，按上述病毒增殖方法在 96 孔板上感染 EPC 细胞。在病毒感染 24～120 小时，分别观察细胞病变情况。按 Reed-Muench 法计算病毒滴度 TCID₅₀。此病毒滴度即为灭活疫苗的效价。本发明所用的鲤上皮瘤细胞系 (EPC) 由武汉大学保藏中心保藏，保藏号为：CCTCC GDC0174；

[0044] 实施例 2：

[0045] 大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗的制备方法，其步骤是：

[0046] A. GSIV 病毒的灭活：取保存于 -80℃ 的 GSIV 纯化病毒液于室温融化，加入福尔马林溶液使其终浓度为 0.2% (V/V)，混合均匀后置于 37℃ 条件下灭活 48～72h 灭活结束后，添加终浓度为 0.05% 的亚硫酸钠中和残余福尔马林，即获得大鲵虹彩病毒灭活疫苗原液，并置于 4℃ 冰箱保存备用。

[0047] B. 将灭活好的疫苗用生理盐水 (0.65%) 稀释至效价为 10^5 TCID₅₀/ml，得到可供直接使用的大鲵虹彩病毒细胞培养福尔马林灭活疫苗。

[0048] C. 灭活疫苗的安全性检验：

[0049] 1) 灭活效果：取上述制备好的疫苗，按上述病毒增殖的方法接种 EPC 细胞，同时设置阴性对照，观察 5～6 天，若出现细胞病变效应，则表明病毒灭活不完全；若未见细胞病变效应，再盲传 2 次，若盲传出现细胞病变，则表明病毒灭活仍不完全，若盲传 2 次均未出现细胞病变，则表明病毒灭活完全，疫苗安全。将盲传未出现细胞病变效应的细胞培养物置 -80℃ - 室温冻融 2 次，采用病毒核酸提取试剂盒提取病毒核酸，用针对病毒外衣壳蛋白基因 (MCP) 设计的多聚酶链式反应 (PCR) 引物进行病毒核酸的 PCR 检测，同时设置阳性病毒核酸对照。如果从盲传培养病毒材料中的病毒核酸检测结果为阴性，则说明病毒被彻底灭活。

[0050] 2) 无菌检验：取上述制备好的疫苗，接种脑浸出液细菌培养基平板，涂平板后于 37℃ 培养 15 天，若有菌落生长，则表明疫苗有细菌污染，需用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后使

用 ;若无菌落生长,则表明疫苗是无菌的。

[0051] 鱼体实验 :取上述制备好的疫苗,注射健康大鲵 30 尾,注射剂量为 0.3 ~ 0.5ml/尾,同时注射鱼用生理盐水作为阴性对照。饲养 15 天,若疫苗组出现死亡,而阴性对照组未出现死亡,表明疫苗不安全 ;若疫苗组和阴性对照组均未见死亡,则表明疫苗安全。大鲵病毒性出血病毒病原——大鲵虹彩病毒由本实验室从患典型出血病的大鲵体内分离并鉴定,由武汉大学保藏中心保藏,保藏号为 :CCTCC V201134。一种大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗,所述的灭活疫苗中含有鲤上皮瘤细胞系 (EPC),CCTCC GDC0174。

[0052] 实施例 3 :

[0053] 一种大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗在制备治疗或预防大鲵病毒性出血病药物中的应用,其具体步骤是 :

[0054] A. 实验室小规模实验 :健康的大鲵 (体长 10 ~ 20cm) 于室内饲养 10 天后,分组每尾注射 0.3 ~ 0.5ml 不同稀释度的灭活疫苗,同时用 MEM 细胞培养液注射另一批鱼做阴性对照,20℃ 饲养 10 天后,随意从每组中取出一部分鱼采血做血清中和

[0055] 试验,测定免疫鱼与对照鱼的血清中和抗体水平 ;将每组中的另一部分鱼以强毒攻击测定其免疫保护率。经试验测定,其中和抗体效价为 1 : 1024 ;保护率高达 82%。

[0056] B. 较大规模实验 :用大鲵出血病细胞培养灭活疫苗 (效价为 10^5 TCID₅₀/ml) 按每尾 0.2ml 的剂量浸泡免疫 1000 尾大鲵鱼种 (规格 10 ~ 20cm,另设对照组 100 尾,养殖水浸泡),正常饲养 6 个月后,统计实验组与对照组实验鱼的成活率。实验结果显示,免疫组成活率达到 73%,对照组成活率为 40%,相对免疫保护力达到 55%。

[0057] C. 以上两实验结果表明,用福尔马林灭活的大鲵病毒性出血病细胞培养灭活疫苗以注射和浸泡途径对大鲵进行免疫,均有很强的保护保护力,可以有效预防大鲵病毒性出血病。