

使用 Cellufine Sulfate 的人冠状病毒 OC43 的纯化事例

能够浓缩、纯化 β 属冠状病毒的亲色谱载体

随着疫苗和临床诊断的进步，对高度纯化浓缩后的大量病毒粒子的需求不断提升。Cellufine Sulfate 是色谱载体。因此，能够避免以往的繁杂且费时间并具有潜在危险的超离心分离及密度梯度法。另外，也能够大幅度提升病毒浓度和纯度。Cellufine Sulfate 能够减轻被固定化了的硫酸葡聚糖、硫酸软骨素、或者与肝素有关的试剂的流出、以及重现性的不稳定化。预装柱内吸附的物质通过增加离子强度能够简单地溶出。

Cellufine Sulfate 是以表面用硫酸基团修饰的低多孔性纤维素粒子作为基底载体（图 1）。该粒子结构可将源于鸡蛋或细胞培养的试样内含有的非特异性蛋白质的吸附控制在最低限。另一方面，大分子 (>100 nm) 病毒粒子会吸附于表面，因此是最适于病毒粒子纯化的结构。从粒子表面的 SEM 分析（图 2）结果可知，病毒粒子犹如涂层般包裹了纤维素粒子表面。

人冠状病毒 OC43 (hCoV OC43) 是引起一般性感冒的病毒。hCoV OC43 根据基于基因组序列的分类，被分类为包括 SARS-CoV、SARS-CoV-2、MERS-CoV 在内的 β 属冠状病毒。本报告将介绍通过病毒纯化经验丰富的 Cellufine Sulfate 实施的 hCoV OC43 的纯化示例。包括引起 COVID-19 的病毒在内的 β 冠状病毒 hCoV OC43 是通过 Cellufine Sulfate 进行高纯度纯化后的病毒。Cellufine Sulfate 是对 β 属冠状病毒纯化有效的色谱载体。

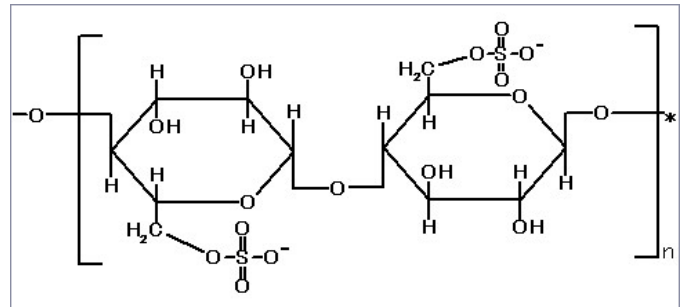
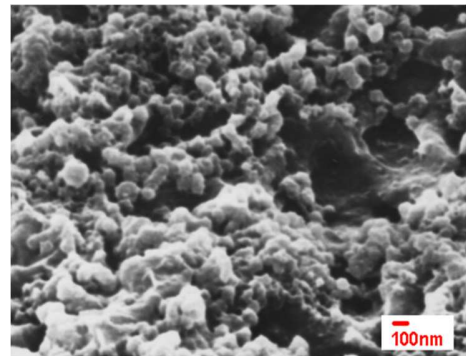


图 2 流感病毒粒子所吸附的 Cellufine Sulfate 的表面结构（SEM 分析）



病毒株: A/duck/Hokkaido /Vac-2/04(H7N7)

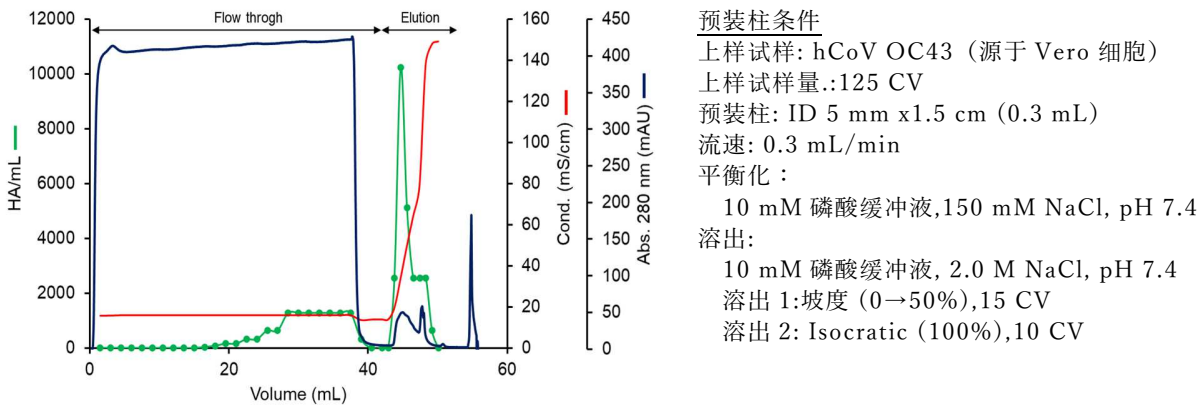
图 1 Cellufine Sulfate 的试剂结构

1. hCoV OC43 病毒粒子的纯化

利用 Vero 细胞培养的人冠状病毒 OC43 (hCoV OC43) 在采用 Cellufine Sulfate 纯化前使用 β -丙内酯进行了灭活。

在预装柱 (ID 0.5 mm x H1.5 cm) 内填充了 0.3 mL 的 Cellufine Sulfate。以 0.3 mL / min 的流速用平衡缓冲液 (10 mM 磷酸缓冲液、150 mM NaCl pH 7.4) 实施了离子平衡。将 125 CV 的澄清净化病毒培养上清 (0.45 μ M PVDF 过滤器) 装填入预装柱, 让其吸附 hCoV OC43 病毒粒子。上样试样后, 利用 10 CV 的平衡缓冲液清洗预装柱, 并清洗了弱结合的杂质。然后利用溶出缓冲液 (10 mM 磷酸缓冲液、2.0 M 氯化钠、pH7.4) 溶出了预装柱内吸附的 hCoV OC43。回收溶出试样, 并对病毒粒子、源于宿主细胞的 DNA 以及蛋白质的回收率进行了调查。以下所示的是通过 Cellufine Sulfate 实施的 hCoV OC43 纯化时的色谱 (图 3)。

图 3 通过 Cellufine Sulfate 实施的 hCoV OC43 的纯化



2. 利用血凝滴度 (HA 滴度) 进行病毒评价

预装柱溶出后的病毒采用血凝滴度 (HA 滴度) 进行了定量评价。通过使用 NaCl 的坡度溶出法, hCoV OC43 用大约 30 mS / cm 的电导率时被溶出, 回收率为 77% (表 1)。10%突破点时的动态绑定容量 (DBC) 为 0.3 mL / min (92cm/h、滞留时间 0.95 分钟) 流速的 76,200 HA / mL-预装柱。

表 1 通过 Sulfate 实施的 hCoV OC43 的回收率与吸附量

回收率 (%)	动态吸附量 (HA/mL-预装柱) *
77	76,200

*10%突破点时的动态吸附量

3. 源于宿主 DNA 与蛋白质量的评价

为了评价杂质的去除情况，溶出部分的源于宿主的 DNA 及蛋白质的回收率采用 Picoreen 及蛋白质测定法进行了评价。评价结果如表 2 及表 3 所示。

表 2 纯化后的源于宿主 DNA 的残留量

部分	DNA (µg)	DNA 回收率 (%)	DNA 残留量 (pg/HA)
上样试样	84	100	1758
流穿	75	89	4433
溶出	7	9	312

源于宿主细胞的 DNA 持有源于磷酸基团的负电荷。另外，Cellufine Sulfate 一直是将硫酸脂基团作为试剂使用，所以持有负的电荷。因此，DNA 不会被吸附于 Cellufine Sulfate，而是被蓄积在了流穿部分。该研究中，DNA 的 89% 被蓄积在了流穿部分。而溶出部分中还残留了 9%。被认为这是因为由 Vero 细胞生成病毒粒子时 DNA 被导入病毒粒子内。

表 3 纯化后的源于宿主蛋白质 (HCP) 残留量

部分	蛋白质量 (µg)	蛋白质回收量 (%)	蛋白残留量 (pg/HA)
上样试样	1.96	100	41
流穿	0.49	25	29
溶出	0.38	20	16

这些蛋白质部分中可能含有源于病毒的蛋白质，为了确认最终的溶出部分的纯度，需采用蛋白质印迹法进行评价。在该研究中，80% 以上的蛋白质被从上样试样中去除。

总结

Cellufine Sulfate 是被广泛用于病毒和病毒样粒子纯化的亲和色谱载体。Cellufine Sulfate 使用生理性 pH 及电导率清洗缓冲液能够去除众多的非特异性污染物质。并且，因为使用中性 pH 的高盐浓度的缓冲液溶出病毒，可抑制病毒的灭活性。由于其具有这些特性，适合用于日本脑炎、狂犬病、流感病毒等这些包膜病毒的纯化。因此，Cellufine Sulfate 被全世界众多的病毒疫苗厂家广泛使用。

在此次的研讨中，包括引起 COVID-19 的病毒 SARS-CoV-2 在内的 β 属冠状病毒成员之一的人冠状病毒 OC43，使用 1 个色谱载体实现了高纯度纯化。本研究中，源于宿主细胞的 DNA 的 92% 与源于宿主细胞的蛋白质的 80% 在 Vero 细胞培养试样中被去除。另外，溶出部分的病毒回收率维持了 77% 的水平。这些结果表明，hCoV-OC43 使用 Cellufine Sulfate 能够较容易从培养上清中纯化。

该结果表明，将 Cellufine Sulfate 用于纯化工序，能够实现 β 属冠状病毒疫苗的快速开发。JNC 将通过 Cellufine Sulfate 为人类战胜冠状病毒疫情和营造全世界的健康生活不断作出贡献。

关于产品信息的说明

Cellufine Sulfate

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/grade/grade-1-sulfate/>

使用说明书及技术资料可在以下网页中下载 pdf。

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/guide/>

对本事例有益的产品介绍

Cellufine ET clean – 在生理性 pH、 $\mu = 0.02 \sim 1.0$ 的离子强度、及 $0 \sim 25^\circ\text{C}$ 时能够从细胞产物溶液中去除内毒素。

Cellufine ET cleanS (分子量排除极限:2,000 Da)

Cellufine ET cleanL (分子量排除极限： $> 2 \times 10^6$ Da)

https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/guide/pdf/affinity/TD_ET_clean_N1_V7_J.pdf

Cellufine GH-25 脱盐载体 – 是球形的高度交联的多孔质纤维素粒子。由于分子量排除极限为 3kD，蛋白质在粒子外通过，但分子量较小的盐类会进入内部细孔，能够用分子筛进行脱盐。

https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/guide/pdf/gel/TD_GH-25_N1_V5_J.pdf

订购说明

产品名	填料尺寸	目录编号
Cellufine Sulfate	5 x1 ml 迷你预装柱	19845-51
	1 x 5 mL 迷你预装柱	19845-15
	10 mL	676943324
	50 mL	19845
	500 mL	19846
	5 L	19847
	10 L	19849

关于各种咨询和技术的说明

(北美&欧洲)

JNC America, Inc.
555 Theodore Fremd Ave,
Rye, NY10580

Tel: 914-921-5400

Fax: 914-921-8822

Email: cellufine@jncamericany.com

(日本、亚洲、其他)

JNC 株式会社
生命化学事业部
邮编：100-8105
东京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号
新大手町大楼 9 楼

Tel: 03 3243 6150

Fax: 03 3243 6219

Email: cellufine@jnc-corp.co.jp