

代昕宇, 胡博, 邓效禹, 等. 犬细小病毒层析纯化方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 49-53.

DAI X Y, HU B, DENG X Y, et al. Establishment of a method for chromatographic purification of canine parvovirus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 49-53.

犬细小病毒层析纯化方法的建立

代昕宇, 胡博, 邓效禹, 张成琪, 李昀真,
李甜甜, 孙亚杰, 许丽文, 白雪*
(中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112)

摘要: 病毒纯度是抗体制备和疫苗免疫效果提升的关键, 本文利用 Purose shell V15 离子交换层析和 Sepharose 4FF 分子筛层析分别建立了犬细小病毒 (CPV) 的纯化方法。将 CPV 经过离心澄清和膜包浓缩后, 用 AKTA 蛋白纯化仪结合 Purose shell V15 和 Sepharose 4FF 分别进行纯化, 最后使用超滤管浓缩, 通过病毒含量测定、总蛋白回收率测定、SDS-PAGE、Western blot 和电镜观察分析病毒的纯化效果。结果: 2 种方法纯化后病毒形态典型, 病毒颗粒大小约 20 nm, 总蛋白去除率 97% 以上, 回收率 71% 以上; Purose shell V15 纯化后的病毒经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析显示无细胞成分的杂带, 而 Sepharose 4FF 纯化后的病毒有少量的牛血清白蛋白条带。本试验结果表明这 2 种方法均可用于 CPV 的纯化, Purose shell V15 纯化后的病毒纯度更高。

关键词: 犬细小病毒; 纯化; 离子交换; 分子筛

中图分类号: S855.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)04-0049-05

Establishment of a method for chromatographic purification of canine parvovirus

DAI Xinyu, HU Bo, DENG Xiaoyu, ZHANG Chengqi, LI Yunzhen,
LI Tiantian, SUN Yajie, XU Liwen, BAI Xue*

(Institute of Special Animal and Plant Sciences, CAAS, Changchun 130112, China)

Abstract: The purity of the virus is the key basis for the preparation of antibodies and the improvement of vaccine immunity. In this paper, methods for purifying canine parvovirus (CPV) were established with Purose shell V15 ion-exchange chromatography and Sepharose 4FF molecular sieve chromatography. CPV was clarified by centrifugation and was concentrated with tangential flow filtration. Then, virus purification was performed on AKTA purifier 100 combined with Purose shell V15 or Sepharose 4FF, and was next concentrated by ultrafiltration spin columns. Finally, the virus content was analyzed with hemagglutination test, total protein removal rate was determined by BCA assay, and the purified virus was determined by SDS-PAGE, Western blot test and electron microscope observation. The results showed that the parvovirus purified with the two methods was typical in shape, and the diameter of the virus particle was about 20 nm. The total protein removal rate was over 97%. The virus purified by Purose shell V15 showed no disturbing bands of cellular components in the SDS-PAGE and Western blot experiments, while the virus purified by Sepharose 4FF had a few bovine serum albumin bands. The experiments showed that both the methods can be used for the purification of CPV, and the virus purified by Purose shell V15 was of higher purity.

Keywords: canine parvovirus; purification; ion-exchange; chromatography

犬细小病毒 (canine parvovirus, CPV) 属于细小病毒科、细小病毒亚科的原细小病毒属。细小病毒科由具有 4~6 kb 线性基因组的无囊膜单链 DNA 病毒组

成, 直径 18~26 nm, 可感染多种动物^[1]。原细小病毒属包括猫细小病毒 (feline parvovirus, FPV)、CPV、水貂肠炎病毒 (mink parvovirus, MEV) 和浣熊细小病毒 (rabbacon parvovirus, RPV)^[2]。CPV 于 20 世纪 70 年代末从一种类似 FPV 的原始病毒中出现, 可能是通过物种间跳跃获得了感染家养犬的能力^[3]。CPV 的线性单链 DNA (ssDNA) 基因组全长约 5 kb, 具有 2 个开放阅读框 (ORF), 编码 2 个非结构蛋白 (NS1 和 NS2) 和 2 个形成病毒衣壳的结构蛋白 (VP1 和 VP2)^[4]。

收稿日期: 2023-04-21; 修回日期: 2024-02-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32100408); 吉林省科技发展计划基金 (20200201126JC, 20200402111NC)

第一作者: 代昕宇, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 白雪, 研究员, 研究方向为动物病原流行病学与致病机制, E-mail: baixue01@caas.cn。

CPV 感染是引起犬死亡的主要原因之一，潜伏期 3~7 d，发病犬出现严重的肠胃炎、嗜睡、呕吐、发热等症状，病程中肠道组织中广泛自溶，肠道固有层塌缩，隐窝数量减少，可见的隐窝中增生性细胞发生大量堆积^[5-7]。CPV 对未接种疫苗幼犬的感染率和致死率都很高，可能会在卫生条件较差或未接种疫苗的犬舍暴发大规模的疫情^[4]。

病毒纯化是制备高质量抗体或更高安全性疫苗的必要条件。常规的实验室纯化病毒方法包括差速离心、蔗糖密度梯度离心、大分子沉淀和层析纯化等。蔗糖密度梯度离心的方法通常在实验室中采用，纯化少量细小病毒或病毒样颗粒^[8-9]，但该方法所用仪器昂贵，基本无法进行扩大生产。层析方法对病毒粒子损伤较小，操作简便，并且能够实现大量制备，已应用于多种病毒和病毒样颗粒的纯化，以去除生物制品中的病毒污染物^[10]。本试验建立了一种用于纯化 CPV 的层析方法，为犬细小病毒病的疫苗、诊断及治疗制品的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和耗材

MEM 培养基购于 Gibco 公司，FBS 购自上海牛耳生物科技有限公司。辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗小鼠 IgG 购自 BBI 生命科学有限公司；抗 CPV VP2 鼠源单克隆抗体由本团队制备并保存。0.22 μm 滤膜和超滤管购自默克-密理博公司；超滤膜包购自 Sartorius 公司；犬细小病毒检测试纸购自快灵生物有限公司。Sephacrose 4 Fast Flow（Sephacrose 4FF）填料及层析柱购自博格隆（上海）生物技术有限公司；Purose shell V15 填料购自嘉兴千纯生物有限公司。

1.2 细胞培养和病毒增殖

CPV-ZCS 株、F81 细胞均由本实验室保存。在 37 ℃，5% CO₂ 环境下，使用含 8% FBS 的血清培养 F81 细胞至长满单层，传代后按照感染比（MOI）为 0.1 接种 CPV-ZCS，继续培养至 90% 细胞发生病变后收获病毒，反复冻融 3 次以裂解细胞，收取病毒液。

1.3 病毒初步澄清和浓缩

将病毒液 5 000 r/min 离心 30 min 以初步澄清后，通过 50 kDa 膜包超滤系统对回收的病毒液进行 25 倍浓缩并进一步去除病毒液中的细胞碎片。

1.4 病毒的层析纯化

以浓缩后的病毒液作为样品，上样量 5 mL，使用 AKTA 蛋白层析系统分别在 Sepharose 4FF 填料和 Purose shell V15 填料中进行层析纯化，缓冲液为 20

mmol/L PBS 溶液，在 1 mL/min 的流速下收取紫外光（UV）280 nm 监测图谱中出现洗脱峰中的每 1 mL 流穿液，以细小病毒病原检测试纸初步判断病毒所在 UV 峰，并用血凝试验进一步确定，-80 ℃ 冻存备用。

1.5 纯化后病毒的超滤管浓缩

将病毒峰的流穿液合并成一管后加入 30 kDa 超滤管中，5 000 r/min 离心 30 min，取超滤管中未透过滤膜的液体，-80 ℃ 冻存。

1.6 纯化后产物的 SDS-PAGE 及 Western blot 检测

取纯化后 UV 值最高的病毒液 1 mL，以 CPV 病毒液作为阳性对照，F81 细胞总蛋白作为阴性对照，以 1% BSA 作为牛血清相关蛋白对照，将各样品上样于 10% SDS-PAGE 进行分离后，使用考马斯亮蓝染色液进行染色，观察样品中的蛋白条带；另取凝胶分离后的样品，通过半干式转膜将凝胶上的蛋白条带转移至 0.45 μm 的硝酸纤维（NC）膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后，PBST 清洗 3 次，每次 5 min，加入 1:2 000 稀释后的 CPV VP2 单抗作为一抗孵育 2 h，PBST 清洗 3 次，加入 1:10 000 稀释后的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h，PBST 清洗 3 次，最后使用 DAB 显色试剂盒进行染色并观察 NC 膜上的蛋白条带。

1.7 总蛋白去除率和病毒回收率测定

用 BCA 法测定层析前后的蛋白含量，计算出总蛋白去除率。将 CPV VP2 单抗作为包被抗体，HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为酶标二抗，以 ELISA 双抗体夹心法检测病毒液和纯化样品中的病毒含量，计算病毒回收率。

1.8 电镜观察

采用常规负染法对纯化后的病毒液进行染色，日立（日本）H8100 透射电子显微镜观察。

1.9 病毒的血凝性检测

采用血凝试验对不同纯化步骤的病毒进行血凝价的检测，血凝方法参考文献 [11]，在 96 孔 V 型血凝板上，每孔加入 25 μL pH=7.2 的 PBS 溶液，向第 1 排分别加入 25 μL 病毒液、浓缩后的病毒与纯化后的细小病毒，每组 2 个重复，进行 2 倍倍比稀释，加入 1% 的仔猪血红细胞，混匀后 4 ℃ 孵育 1 h，将 96 孔板立起观察结果。

2 结果

2.1 层析图谱分析

澄清及浓缩后的病毒层析图谱见图 1，使用快速试纸条检测发现，Sephacrose 4FF 流穿液中，流穿峰 2 为唯一含有病毒的峰；而在 Purose shell V15 中，流穿峰 1 是唯一检测出病毒的峰。经血凝试验进一步确

定(见表1),发现 Sepharose 4FF 流穿峰3和 Purose shell V15 流穿峰2中存在少量病毒。

2.2 纯化后病毒液总蛋白去除率和病毒回收率

由表2可知,2种层析填料的总蛋白去除率均在

97%以上,但 Purose shell V15 更高,可达99%以上。ELISA 试验结果显示 Purose shell V15 填料纯化后的病毒回收率更高,达到81.43%。

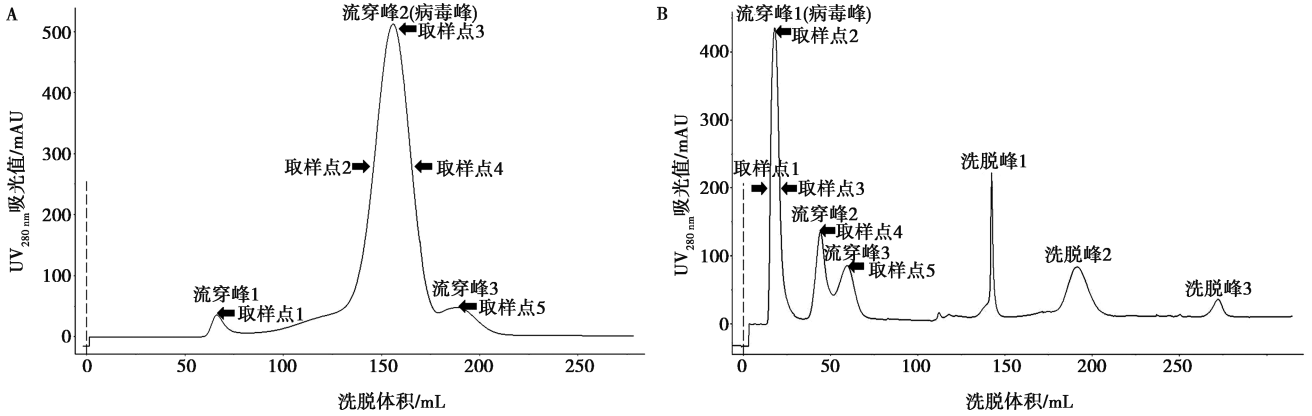


图1 Sepharose 4FF (A) 和 Purose shell V15 (B) 层析图谱

表1 各取样点血凝效价检测

层析填料	流穿峰 1				流穿峰 2 (病毒峰)		流穿峰 3	
	取样点 1	取样点 2	取样点 3	取样点 4	取样点 5	取样点 5	取样点 5	
Sepharose 4FF	0	5	7	5	3			

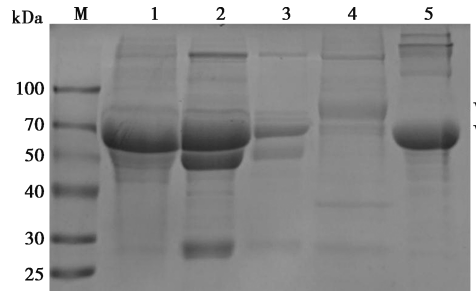
层析填料	流穿峰 1 (病毒峰)			流穿峰 2		流穿峰 3	
	取样点 1	取样点 2	取样点 3	取样点 4	取样点 5	取样点 5	取样点 5
Puroshell V15	6	8	6	2	0		

表2 2种层析柱纯化后的病毒液总蛋白去除率和病毒回收率

层析填料	病毒液		膜包浓缩液		纯化样品		总蛋白去除率/%	病毒回收率/%
	蛋白浓度/(mg · mL ⁻¹)	体积/mL	蛋白浓度/(mg · mL ⁻¹)	体积/mL	蛋白浓度/(mg · mL ⁻¹)	体积/mL		
Sepharose 4FF	3.82	500	5.86	20	1.53	35	97.20	71.32
Purose shell V15	3.67	500	5.72	20	0.82	20	99.10	81.43

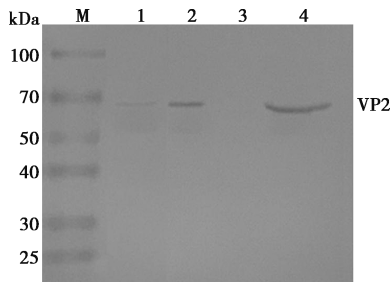
2.3 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

细小病毒含有3种结构蛋白,VP1(84 kDa),VP2(67 kDa)和VP3(63 kDa),其中VP3由VP2通过宿主蛋白酶裂解产生^[12]。经层析纯化后,选取抗原试纸测定含有病毒的UV峰,取最高峰的1 mL样品进行SDS-PAGE和Western blot检测。由图2可见,Purose shell V15纯化后可见VP1与VP2蛋白条带,Sepharose 4FF纯化后仅可见VP2条带,且含有部分牛血清蛋白。由图3可见,两种层析填料纯化样品均可见Western blot目标条带,但Purose shell V15纯化后目标条带更明显。



M. 蛋白质分子质量标准(100 kDa); 1. 阴性对照(F81细胞蛋白); 2. 阳性对照(CPV病毒液); 3. Sepharose 4FF 纯化样品; 4. Purose shell V15 纯化样品; 5. 1% BSA 对照。

图2 SDS-PAGE 检测纯化结果



M. 蛋白质分子质量标准 (100 kDa); 1. Sepharose 4FF 纯化样品; 2. Purose shell V15 纯化样品; 3. 阴性对照 (F81 细胞蛋白); 4. 阳性对照 (CPV 病毒液)。

图3 Western blot 检测纯化结果

2.4 电镜检测

电镜下观察病毒, 结果如图4所示, 完整的病毒粒子大小约20 nm, 呈二十面体结构。

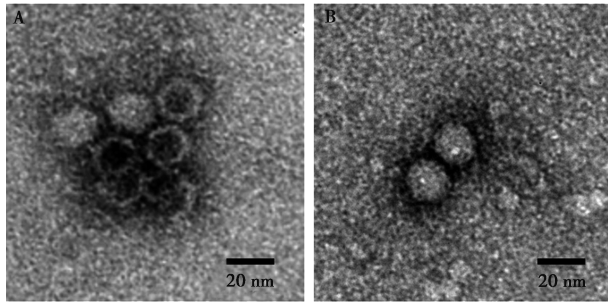


图4 Purose shell V15 (A) 和 Sepharose 4FF (B) 纯化样品电镜检测结果

2.5 血凝试验

对各步骤所得样品进行血凝试验, 观察孵育后完全凝集的孔数, 确定血凝效价。结果如表3所示, 使用2种层析填料纯化后血凝效价稍有降低, 超滤管浓缩后血凝效价明显增加, 病毒液浓度上升。

表3 血凝试验结果 (血凝效价) \log_2

层析填料	病毒液	膜包浓缩液	纯化样品	超滤管浓缩 纯化样品
Sephacrose 4FF	8	9	7	10
Purose shell V15	8	9	8	12

3 讨论

层析纯化作为一种常用的病毒粒子纯化方法, 与离心方法相比有着上样量大、易于放大的优点, 并且更容易保持病毒粒子的抗原性^[13], 因此在工业上大规模应用于灭活疫苗的纯化制备。本试验采用2种不

同填料的层析柱, 通过层析将浓缩后的病毒液中各个组分分开后, 用 SDS-PAGE 和 Western blot 确定了适合于细小病毒纯化的层析柱类型、基本过程参数和病毒主要所在的 UV 峰, 最后使用电镜确定了纯化后病毒的形态。

层析柱上样时对于病毒液的澄清度和浓度都有一定的要求, 本试验采用离心和切向流过滤的方式进行病毒上样前的预处理。低速离心 (5 000 r/min) 可以去除病毒液中的大部分固体颗粒, 有助于减小病毒在切向流过滤中受到的剪切力。膜包切向流过滤是一种通过可选孔径 (30~300 kDa) 的吸附性薄膜分离组分的技术, 广泛应用于生物制品的下游纯化工艺中^[14]。本试验中根据细小病毒粒子大小, 选用 50 kDa 膜包通过切向流过滤分离病毒与病毒液中的其他液体组分, 达到提高留存液中病毒浓度的效果。另外, 在层析试验过程中, 发现由于细小病毒体积与分子量较小, 分子筛填料无法将细小病毒与大部分杂质分离, 而带有离子配基的 Purose shell V15 填料能够将病毒分离在体积很小的 UV 峰中, 对于细小病毒的分离更有优势。

综上, 本试验建立的层析纯化方法能够得到高纯度的 CPV 粒子, 具有较好的总蛋白去除率和病毒回收率, 为抗体筛选和疫苗制备提供了良好的原材料, 为后续进一步的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] JING Z, JI P, WEI Y, et al. Isolation and identification of a novel canine parvovirus type 2c strain in domestic cats in Dalian, China [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 1001604.
- [2] YIP H Y E, PEASTON A, WOOLFORD L, et al. Diagnostic challenges in canine parvovirus 2c in vaccine failure cases [J]. *Viruses*, 2020, 12 (9): 980.
- [3] DONG B, ZHANG G, ZHANG J, et al. A systematic literature review and meta-analysis of characterization of canine parvoviruses 2 prevalent in mainland China [J]. *Virol J*, 2020, 17 (1): 195.
- [4] RAKIB T M, NATH B K, DAS T, et al. Retrospective genotyping and whole genome sequencing of a canine parvovirus outbreak in Bangladesh [J]. *Pathogens*, 2021, 10 (11): 1373.
- [5] KIM D H, HAN S H, GO H J, et al. Antiviral activity of canine interferon lambda 3 expressed using a recombinant adenovirus against canine coronavirus, canine parvovirus, and canine distemper virus [J]. *Vet Res Commun*, 2022, 46 (4): 1363-1368.
- [6] QI S, ZHAO J, GUO D, et al. A mini-review on the epidemiology of canine parvovirus in China [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 5.
- [7] LIN C M, HAUSE B, GUALTIERI D, et al. Parvoviral enteritis and salmonellosis in raccoons with sudden death [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2021, 33 (6): 1172-1175.
- [8] DUNBAR C A, CALLAWAY H M, PARRISH C R, et al. Probing

- antibody binding to canine parvovirus with charge detection mass spectrometry [J]. J Am Chem Soc, 2018, 140 (46): 15701-15711.
- [9] BIERI J, LEISI R, BIRCHER C, et al. Human parvovirus B19 interacts with globoside under acidic conditions as an essential step in endocytic trafficking [J]. PLoS Pathog, 2021, 17 (4): e1009434.
- [10] JUNTER G A, LEBRUN L. Polysaccharide-based chromatographic adsorbents for virus purification and viral clearance [J]. J Pharm Anal, 2020, 10 (4): 291-312.
- [11] CAVALLI A, MARTELLA V, DESARIO C, et al. Modified haem-agglutination inhibition assay for the detection of canine parvovirus type 2 antibodies in dog sera [J]. Vet J, 2021, 274: 105709.
- [12] CHEN B, ZHANG X, ZHU J, et al. Molecular epidemiological survey of canine parvovirus circulating in China from 2014 to 2019 [J]. Pathogens, 2021, 10 (5): 588.
- [13] PILATTI L, MANCINI ASTRAY R, ROCCA M P, et al. Purification of rabies virus glycoprotein produced in *Drosophila melanogaster* S2 cells: an efficient immunoaffinity method [J]. Biotechnol Prog, 2020, 36 (6): e3046.
- [14] CZERMAK P, GRZENIA D L, WOLF A, et al. Purification of the densovirus by tangential flow ultrafiltration and by ion exchange membranes [J]. Desalination, 2008, 224: 23-27.



北京大学图书馆
PEKING UNIVERSITY LIBRARY

《中文核心期刊要目总览》2023年版入编通知

《畜牧与兽医》主编先生/女士:

我们谨此郑重通知:依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,贵刊《畜牧与兽医》入编《中文核心期刊要目总览》2023年版(即第10版)之畜牧、动物医学、狩猎、蚕、蜂(除草地学、草原学)类的核心期刊。

《中文核心期刊要目总览》2023年版从2021年10月开始研究,研究工作由北京大学图书馆主持,共32个单位的148位专家和工作人员参加了本项研究工作,全国各地9473位学科专家参加了核心期刊表的评审工作。经过定量筛选和专家定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1987种核心期刊。

评选核心期刊的工作是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动。该研究成果只是一种参考工具书,主要是为图书情报界、出版界等需要对期刊进行评价的用户提供参考,例如为各图书情报部门的中文期刊采购和读者导读服务提供参考帮助等,不应作为评价标准。谨此说明。

顺颂

撰安

编号:2023-J2688

《中文核心期刊要目总览》
2023年版编委会
图书馆

