

• 疫苗研究 •

SARS-CoV-2 收获液滴度稳定性 及灭活动力学分析

郭冰峰, 韩斌, 郝一楠, 王魁, 殷吉祥, 李岩, 李楠, 凌相平, 潘若文
华兰生物疫苗股份有限公司, 河南 新乡 453003

摘要: **目的** 对严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 收获液在 2 ~ 8 °C 环境下的滴度稳定性及 β -丙内酯灭活剂对病毒的灭活效果进行研究。**方法** 将 3 批(批号: 202111001、202111002 和 202111003) SARS-CoV-2 收获液于 2 ~ 8 °C 放置 12 d, 每隔 3 d(0、3、6、9、12 d) 取样, 采用 Karber 法检测病毒滴度; 2 ~ 8 °C 过夜平衡的 3 批病毒收获液按 1 : 4 000 的体积分数加入 β -丙内酯进行灭活, 在不同的灭活时间点(0、0.5、1、1.5、2、3、4、8、16、24 h) 取样检测病毒滴度, 取灭活 8、0、16、24 h 的病毒液进行灭活验证, 取灭活 24 h 的病毒灭活液进行透射电镜观察。**结果** 2 ~ 8 °C 环境下, SARS-CoV-2 的滴度随放置时间的延长不断降低, 0 ~ 3 d 滴度下降不明显, 第 12 天滴度由最初的 7.75、6 和 7.5 lgCCID₅₀ / mL 降至 5.75、4.625 和 6.25 lgCCID₅₀ / mL, 表明 2 ~ 8 °C 环境下病毒活力呈逐渐降低的趋势; 随着灭活时间的增加, 病毒滴度不断降低, 灭活 3 h 后, 病毒滴度已无法检出。透射电镜观察显示, 灭活后的病毒颗粒完整, 刺突蛋白分布均匀。**结论** 2 ~ 8 °C 环境下保存的 SARS-CoV-2 毒力不稳定, 应尽快进行后续的灭活纯化工艺; 病毒灭活 3 h 后滴度已无法检出, 可为灭活工艺的确定提供参考。

关键词: 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2; 病毒滴度; 灭活动力学; 灭活验证

中图分类号: R91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2023)02-0129-05

Analysis of titer stability and inactivation kinetics of harvest solution of SARS-CoV-2

GUO Bing-feng, HAN Bin, HAO Yi-nan, WANG Kui, YIN Ji-xiang, LI Yan,
LI Nan, LING Xiang-ping, PAN Ruo-wen

Hualan Biological Vaccine Co., Ltd., Xinxiang 453003, Henan Province, China

Corresponding author: PAN Ruo-wen, E-mail: prw0023@hualan.com

Abstract: Objective To investigate the titer stability of the harvest solution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) at 2 ~ 8 °C and the inactivation effect of β -propiolactone inactivator on the virus. **Methods** Three batches of SARS-CoV-2 harvest solution (batch numbers: 202111001, 202111002 and 202111003) were stored at 2 ~ 8 °C for 12 d and sampled every 3 d (0, 3, 6, 9 and 12 d) for detection of the titers by Karber method; Three batches of virus harvest solution equilibrated overnight at 2 ~ 8 °C were inactivated by adding β -propiolactone at a volume fraction of 1 : 4 000 and detected for the titers at different inactivation time points (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8, 16 and 24 h), of which samples inactivated for 8, 16 and 24 h were taken for inactivation verification, and samples inactivated for 24 h were observed by transmission electron microscope. **Results** The titers of SARS-CoV-2 decreased with the prolongation of storage time at 2 ~ 8 °C, which showed no obvious decrease during 0 ~ 3 d, while decreased from the initial 7.75, 6 and 7.5 lgCCID₅₀ / mL to 5.75, 4.625 and 6.25 lgCCID₅₀ / mL on day 12, indicating that the virus activity showed a gradual decrease trend at 2 ~ 8 °C; With the inactivation time, the virus titer decreased continuously and could not be detected after inactivation for 3 h. Transmission electron microscope observation showed that the inactivated virus particles were intact and the spike protein was evenly distributed. **Conclusion** The virulence of SARS-CoV-2 stored at 2 ~ 8 °C was unstable, so the subsequent inactivation and purification process should be carried out as soon as possible; The titer of virus could not be detected after

基金项目: 河南省科学技术厅 / 河南省财政厅关于“新型冠状病毒肺炎防控应急攻关第二批项目”(201100311800)。

通信作者: 潘若文, E-mail: prw0023@hualan.com

3 h of inactivation, which provided a reference for the determination of the inactivation process.

Keywords: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); Virus titer; Inactivation kinetics; Inactivation verification

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory symptom coronavirus 2, SARS-CoV-2) 的发现最早追溯到 2019 年 3 月, 西班牙巴塞罗那大学在采集的废水样本中检测出 SARS-CoV-2, 2020 年 3 月 11 日, WHO 将新型冠状病毒肺炎 (Coronavirus Disease 2019, COVID-19) 作为全球性大流行病^[1-6]。

SARS-CoV-2 属冠状病毒科冠状病毒属, 为包膜病毒, 基因组长 29 800 ~ 29 900 bp, 具有冠状病毒的典型形态和基因组特征; SARS-CoV-2 普遍呈球形, 具有多形性, 直径 60 ~ 140 nm^[7-8]。人群普遍易感, 特别是中老年人及婴幼儿, 经呼吸道飞沫和密切接触传播, 以发热、干咳、乏力为主要表现; 部分患者以嗅觉、味觉减退或丧失等为首发症状, 少数患者伴有鼻塞、流涕、咽痛、结膜炎、肌痛和腹泻等症状^[9-10]。

目前尚无有效治疗 COVID-19 的特效药, 接种疫苗可使人体获得一定的免疫力^[11-14]。国内接种量最大的疫苗类型为灭活疫苗, 灭活疫苗的生产步骤通常为以 Vero 细胞为宿主, 通过细胞工厂或生物反应器进行病毒的增殖培养^[15-16], 病毒收获液经 β -丙内酯灭活后进行灭活验证, 完全灭活的收获液经过滤、纯化等工艺, 最终制得成品疫苗^[17-18]。为保证生产过程中质量的稳定性, 本研究采用 Karber 法对病毒收获液以及灭活样本进行滴度检测^[19], 在保证收获液质量的基础上, 进一步确保灭活工艺能够完全灭活病毒, 为新冠疫苗的安全研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、病毒收获液及细胞株 SARS-CoV-2 毒株 (工作代次为 V8 代) 由广东省疾病预防控制中心提供; 病毒收获液为华兰生物 BSL-3 实验室 5 L 生物反应器培养产物, 批号分别为 202111001、202111002 和 202111003; 非洲绿猴肾细胞 (Vero) 购自美国标准生物制品收藏中心 (ATCC CCL-81)。

1.2 主要试剂 DEME 培养基 (货号: 10564011)、0.25% 胰酶 (货号: 25200072) 和胎牛血清 (货号: 10099141) 购自美国 Gibco 公司。

1.3 Vero 细胞培养板的制备 取长至致密单层的 Vero 细胞培养瓶, 吸弃生长液, 加入胰酶消化 5 ~ 10 min, 吸弃胰酶, 加入生长液制备细胞悬液, 通过细胞计数, 将细胞悬液稀释至 2×10^5 个 / mL, 接种至 96 孔

细胞培养板, 100 μ L / 孔, 第 10 列补加 100 μ L 维持液作为阴性对照, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养细胞至单层, 转入生物安全三级实验室备用。

1.4 病毒滴度稳定性检测 采用 Karber 法。取 2021-11001、202111002 和 202111003 批病毒收获液, 于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 放置 12 d, 每隔 3 d (0、3、6、9、12 d) 取样 100 μ L, 测定病毒滴度: 加至 900 μ L 维持液中进行 10 倍系列稀释 (10^{-1} ~ 10^{-9}), 取不同稀释倍数的病毒液 100 μ L, 接种至 96 孔细胞板, 每个稀释度接种 8 孔, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 5 ~ 7 d, 以病变孔数不再增加、阴性对照细胞未老化之前进行滴度终点判定。

1.5 灭活动力学检测 取 202111001、202111002 和 202111003 批病毒收获液, 于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 冰箱过夜平衡温度, 按 1 : 4 000 的体积分数加入 β -丙内酯, 混匀后立即使用离心管进行样品分装, 分装的样品继续放至 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 冰箱进行灭活, 并在不同的试验条件下进行滴度检测和灭活验证, 检测时间点为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、8.0、16、24 h, 前 7 个时间点 (0 ~ 4.0 h) 检测病毒滴度, 后 3 个时间点 (8.0、16、24 h) 检测病毒滴度并进行灭活验证。

1.6 灭活验证

1.6.1 盲传 3 代 取长至单层 Vero 细胞的 T75 细胞瓶, 吸弃上清, 补加 8 mL 维持液; 吸取 25 mL 灭活液加至 T75 细胞瓶内, 每个样本设 3 个重复, 阳性对照为吸取 25 mL 病毒收获液 (病毒含量 10 CCID₅₀) 加至 T75 细胞瓶内, 阴性对照为吸取 25 mL 维持液加至 T75 细胞瓶内, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下进行盲传 1 代培养; 培养 5 d 后吸取盲传 1 代上清液 25 mL, 加至 T75 细胞瓶内 (含 8 mL 维持液), 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下进行盲传 2 代培养; 培养 5 d 后吸取盲传 2 代上清液 25 mL, 加至 T75 细胞瓶内 (含 8 mL 维持液), 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下进行盲传 3 代培养。5 d 后判定终点, 观察每次传代培养是否病变, 3 代 3 个重复均无病变则证明灭活完全。

1.6.2 滴度检测 采用 Karber 法对传代样本进行滴度检测, 具体操作步骤同 1.4 项。

1.7 病毒灭活液电镜观察 取灭活 24 h 的病毒灭活液, 加入戊二醛固定, 使其终浓度为 2.5%, 置 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 冰箱过夜保存。吸取固定样品 20 μ L, 滴加至有喷碳支持膜的铜网上, 使之形成小液滴, 放置 1 min

后用滤纸吸弃多余液体,纯化水洗涤1次后,滴加1%醋酸双氧铀染液,染色1 min;吸弃多余染液,自然干燥后进行透射电镜观察。

2 结果

2.1 病毒滴度稳定性 202111001、202111002和2021-11003批病毒收获液于2~8℃环境下放置12 d,滴度呈下降趋势,第3天滴度下降幅度不明显,病毒滴度降幅分别为1.6%、2.1%和5%;第12天病毒滴度降幅分别为25.8%、22.9%和16.7%。见表1。

表 1 3批 SARS-CoV-2 收获液放置不同时间的滴度变化 (lgCCID₅₀ / mL)

Tab. 1 Changes of titers of three batches of SARS-CoV-2 harvest solution stored for different time durations (lgCCID₅₀ / mL)

放置时间(d)	病毒收获液批号		
	202111001	202111002	202111003
0	7.750	6.000	7.500
3	7.625	5.875	7.125
6	7.125	5.125	6.750
9	5.875	4.875	6.500
12	5.750	4.625	6.250

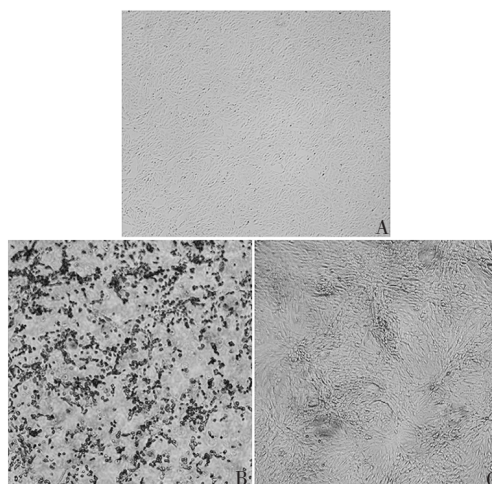
2.2 灭活动力学检测 202111001和202111002批病毒收获液均灭活2 h检测不出病毒滴度,202111003批病毒收获液灭活3 h检测不出病毒滴度,因此,病毒收获液经3 h灭活处理均可将病毒完全灭活,见表2。

表 2 3批 SARS-CoV-2 收获液灭活动力学滴度检测结果 (lgCCID₅₀ / mL)

Tab. 2 Inactivation kinetic titers of three batches of SARS-CoV-2 harvest solution (lgCCID₅₀ / mL)

灭活时间(h)	病毒收获液批号		
	202111001	202111002	202111003
0	7.875	5.750	7.125
0.5	5.125	3.625	5.500
1	3.750	2.875	5.000
1.5	3.000	1.750	4.375
2	0	0	2.875
3	0	0	0
4	0	0	0
8	0	0	0
16	0	0	0
24	0	0	0

2.3 病毒灭活验证 灭活8、16、24 h的病毒收获液盲传3代样品均无细胞病变,每次传代样品均未检出病毒滴度;阳性对照细胞发生完全病变,阴性对照细胞未发生病变。见图1。表明1:4 000体积分数的β-丙内酯处理8 h以上能够完全灭活SARS-CoV-2。



A:盲传3代样品;B:阳性对照;C:阴性对照。

图 1 灭活验证样品的显微镜观察(×40)

Fig. 1 Microscopy of inactivation verification of samples (×40)

2.4 病毒灭活液电镜观察 透射电镜观察可见,灭活的病毒呈圆球状,直径约100 nm,包膜周围有明显的刺突蛋白且分布均匀,见图2。表明该灭活工艺对病毒颗粒完整性影响不大。

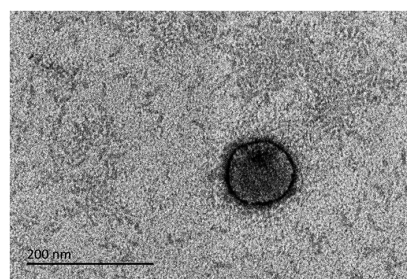


图 2 灭活的SARS-CoV-2的透射电镜观察

Fig. 2 Transmission electron microscope observation of inactivated SARS-CoV-2

3 讨论

目前国内已上市新冠疫苗种类有灭活疫苗、

腺病毒疫苗以及重组亚单位疫苗,其中灭活疫苗是国内接种量最多的疫苗类型^[20-22];对于灭活疫苗的研发及生产,其滴度稳定性影响成品的质量,病毒灭活工艺参数决定产品的安全,因此,对于 SARS-CoV-2 滴度稳定性以及灭活动力学研究显得至关重要^[23-25]。

本研究采用 Karber 法对置于 2 ~ 8 °C 的 SARS-CoV-2 收获液进行滴度检测,病毒滴度随着放置时间的延长不断降低;放置 3 d 后,3 批样本的滴度降幅为 1.6%、2.1% 和 5%,放置 12 d 后,滴度降幅达 25.8%、22.9% 和 16.7%,表明 2 ~ 8 °C 环境下 SARS-CoV-2 滴度稳定性较差;为保证后续纯化工艺顺利进行,建议病毒收获液于 3 d 内进行灭活处理。

灭活动力学研究中,按 1 : 4 000 的体积比加入 β -丙内酯处理 3 h 以上,病毒滴度降至 0,表明 β -丙内酯能够有效灭活 SARS-CoV-2;无论是 7.875 lgCCID₅₀ / mL 的高滴度病毒,还是 5.75 lgCCID₅₀ / mL 的低滴度病毒, β -丙内酯均能在 3 h 内灭活完全,表明在此滴度范围之内,灭活剂的加入量是足量且冗余的。WANG 等^[18]的研究表明, β -丙内酯在 4 h 内将病毒灭活完全,与本研究结果差异不大。本研究对灭活 8、16、24 h 的样本进行灭活验证,表明病毒完全灭活;对 SARS-CoV-2 进行电镜观察,发现灭活 24 h 的样本病毒颗粒完整,刺突蛋白分布均匀,与 GAO 等^[17]和 WANG 等^[18]的研究一致。表明该灭活工艺对 SARS-CoV-2 颗粒完整性影响较小,为后续生产工艺以及灭活时间的确定提供了理论依据。

综上所述,本研究对 SARS-CoV-2 在 2 ~ 8 °C 环境下的滴度稳定性以及灭活动力学进行了探讨,在保证病毒收获液质量的基础上,进一步确保了灭活工艺能够完全灭活病毒,为新冠灭活疫苗的安全研发奠定了基础。

参考文献

- [1] SIDIQ Z, HANIF M, DWIVEDI K K, *et al.* Benefits and limitations of serological assays in COVID-19 infection [J]. *Indian J Tuberculosis*, 2020, 67 (4S): S163-S166.
- [2] BAO L, DENG W, HUANG B, *et al.* The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice [J]. *Nature*, 2020, 583 (7818): 830-833.
- [3] RAI P, KUMAR B K, DEEKSHIT V K, *et al.* Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105 (2): 441-455.
- [4] CHAIMAYO C, KAEWNAPHAN B, TANLIENG N, *et al.* Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand [J]. *Virology*, 2020, 17 (1): 177.
- [5] FENOLLAR F, BOUAM A, BALLOUCHE M, *et al.* Evaluation of the panbio COVID-19 rapid antigen detection test device for the screening of patients with COVID-19 [J]. *Clin Microbiol*, 2021, 59 (2): e02589-20. DOI: 10.1128 / JCM.02589-20.
- [6] JIANG R D, LIU M Q, CHEN Y, *et al.* Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *Cell*, 2020, 182 (1): 50-58.
- [7] ZHU N, ZHANG D, WANG W, *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *New Engl J*, 2020, 382 (8): 727-733.
- [8] LU R, ZHAO X, LI J, *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10224): 565-574.
- [9] HUANG C, WANG Y, LI X, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan [J]. *Lancet*, 2020, 395 (10223): 497-506.
- [10] AIYEBBUSI O L, HUGHES S E, TURNER G, *et al.* Symptoms, complications and management of long COVID: a review [J]. *J R Soc Med*, 2021, 114 (9): 428-442.
- [11] MURALIDAR S, AMBI S V, SEKARAN S, *et al.* The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2 [J]. *Biochimie*, 2020, 179: 85-100.
- [12] SANTOS-LÓPEZ G, CORTÉS-HERNÁNDEZ P, VALLEJO-RUIZ V, *et al.* SARS-CoV-2: basic concepts, origin and treatment advances [J]. *Gac Med Mex*, 2021, 157 (1): 84-89.
- [13] KIRTIPAL N, BHARADWAJ S, KANG S G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 85: 104502.
- [14] BAKHIET M, TAURIN S. SARS-CoV-2: Targeted managements and vaccine development [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2021, 58: 16-29.
- [15] WURTZ N, PENANT G, JARDOT P, *et al.* Culture of SARS-CoV-2 in a panel of laboratory cell lines, permissivity, and differences in growth profile [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2021, 40 (3): 477-484.
- [16] KUMAR S, SARMA P, KAUR H, *et al.* Clinically relevant cell culture models and their significance in isolation, pathogenesis, vaccine development, repurposing and screening of new drugs for SARS-CoV-2: a systematic review [J]. *Tissue Cell*, 2021, 70: 101497.

- [12] Cancer Discovery Editorial Staff. YY1 facilitates enhancer-promoter contacts to promote gene expression [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8 (2): 135.
- [13] YANG P, LI J, PENG C, *et al*. TCONS_00012883 promotes proliferation and metastasis via DDX3 / YY1 / MMP1 / PI3K-AKT axis in colorectal cancer [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10 (6): e211. DOI: 10.1002 / ctm2.211.
- [14] VERHEUL T C J, VAN HIJFTE L, PERENTHALER E, *et al*. The why of YY1: Mechanisms of transcriptional regulation by Yin Yang 1 [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 592164.
- [15] KHACHIGIAN L M. The Yin and Yang of YY1 in tumor growth and suppression [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143 (3): 460-465.
- [16] ZHANG X C, LIANG H F, LUO X D, *et al*. YY1 promotes IL-6 expression in LPS-stimulated BV2 microglial cells by interacting with p65 to promote transcriptional activation of IL-6 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 502 (2): 269-275.
- [17] WU S, WANG H, LI Y, *et al*. Transcription factor YY1 promotes cell proliferation by directly activating the pentose phosphate pathway [J]. *Cancer Res*, 2018, 78 (16): 4549-4562.
- [18] WATERS M R, GUPTA A S, MOCKENHAUPT K, *et al*. RelB acts as a molecular switch driving chronic inflammation in glioblastoma multiforme [J]. *Oncogenesis*, 2019, 8 (6): 37.
- [19] MORALES-MARTINEZ M, VALENCIA-HIPOLITO A, VEGA G G, *et al*. Regulation of Krüppel-Like Factor 4 (KLF4) expression through the transcription factor Yin-Yang 1 (YY1) in non-Hodgkin B-cell lymphoma [J]. *Oncotarget*, 2019, 10 (22): 2173-2188.
- [20] LAN Q, WANG A, CHENG Y, *et al*. Guanylate binding protein-1 mediates EGFRvIII and promotes glioblastoma growth in vivo but not in vitro [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (9): 9680-9691.

收稿日期:2022-06-11 编辑:王佳凤

(上接第 132 页)

- [17] GAO Q, BAO L, MAO H, *et al*. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2 [J]. *Science*, 2020, 369 (6499): 77-81.
- [18] WANG H, ZHANG Y, HUANG B, *et al*. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2 [J]. *Cell*, 2020, 182 (3): 713-721.
- [19] LI H Y, WANG Z Y, PEI X F. Laboratory diagnosis of virus infection [M]. Beijing: People's medica publishing house, 2015: 54-56. (in Chinese)
李洪源, 王志玉, 裴晓方. 病毒学检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 54-56.
- [20] AWADASSEID A, WU Y, TANAKA Y, *et al*. Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17 (1): 8-19.
- [21] ZHANG J, HE Q, AN C, *et al*. Boosting with heterologous vaccines effectively improves protective immune responses of the inactivated SARS-CoV-2 vaccine [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10 (1): 1598-1608.
- [22] LI J X, ZHU F C. Inactivated SARS-CoV-2 vaccine (BBV152)-induced protection against symptomatic COVID-19 [J]. *Lancet*, 2021, 398 (10317): 2134-2135.
- [23] DELRUE I, VERZELE D, MADDER A, *et al*. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges [J]. *Expert Rev Vaccin*, 2012, 11 (6): 695-719.
- [24] KOZLOVSKAYA L I, PINIAEVA A N, IGNATYEV G M, *et al*. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in pre-clinical studies [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10 (1): 1790-1806.
- [25] OFFERSGAARD A, DUARTE HERNANDEZ C R, PIHL A F, *et al*. SARS-CoV-2 production in a scalable high cell density bioreactor [J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9 (7): 706.

收稿日期:2022-07-16 编辑:何巍