

流感疫苗脂质体制备的初步研究

王 鸿¹, 洪 冷², 梁文权³

(1. 浙江医学高等专科学校, 浙江杭州 310053; 2 邵逸夫医院; 3 浙江大学药学院)

摘要: 以包封率为依据, 采用薄膜分散法制备疫苗脂质体, 以 Lowry 检测法测定包封率。结果制备得到包封率高于 84 % 的疫苗脂质体。制备过程中冻融处理、磷脂用量对疫苗脂质体包封率影响较大, 该实验筛选得到的配方能制备得到较高包封率的疫苗脂质体。

关键词: 流感疫苗; 脂质体; 制备

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 6354(2004)05 - 0016 - 03

脂质体^{1,2} 作为疫苗载体具有许多优点, 它兼有佐剂和载体的作用, 可延长疫苗在体内的停留时间、减少疫苗用量、降低毒副作用, 并可产生免疫记忆, 提高免疫功能。接种疫苗所产生的抗体滴度比常规疫苗要高 10 倍以上, 可增加细胞免疫应答能力, 同时可提高多肽等亚单位抗原的稳定性, 并延长保存期和免疫时间。能够弥补现有疫苗的一些不足。因此, 脂质体疫苗具有较好的发展前景和经济效益。

1 材料与仪器

1.1 材料

灭活流感病毒胆固醇; 大豆磷脂; 磷酸二氢钾; 磷酸氢二钾; 氢氧化钠; 乙醚; 牛血清白蛋白; 硫酸铜; 草酸钠; 磷酸; 柠檬酸; 碳酸钠; 钨酸钠; 钼酸钠; 盐酸; 硫酸锂。

1.2 仪器

JY92 - 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所); FI - 200 高速分散均质机(上海标本模型厂); RE - 52C 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); UV - VIS Spectrophotometer TU - 180(北京通用公司); 台式离心机 TGL - 16G(上海安亭科学仪器厂); 超速离心机 Sorvall Biofuge Statos(美国科径仪器公司)。

收稿日期: 2004 - 04 - 12

作者简介: 王 鸿(1971 -), 女, 硕士, 讲师, 从事药剂学研究和教学。

2 方法和结果

2.1 制备方法的选择^{3,4}

2.1.1 高速分散法 取适量大豆磷脂, 加入适量磷酸缓冲液超声使溶, 缓慢注入高速搅拌下的适量的磷酸缓冲液, 搅拌, 得空白脂质体。

2.1.2 薄膜分散法 取大豆磷脂溶于适量乙醚, 旋转蒸发, 加入适量磷酸缓冲液, 旋涡震荡, 得空白脂质体。

2.1.3 两种方法的比较 用两种方法制得的脂质体在显微镜 16 × 40 下观察, 用高速分散法制备的空白脂质体, 未能清楚看到脂质体微粒; 而用薄膜分散法制备的空白脂质体, 显微镜下观察到的粒子大都在 2 μm 左右, 粒子实际大小在 3.12 μm 左右。而所用病毒直径约为 80 ~ 120 nm, 脂质体粒径过小影响包封率, 故采用薄膜分散法制备疫苗脂质体。

2.1.4 疫苗脂质体的制备 取大豆磷脂、胆固醇适量, 溶于乙醚, 旋转蒸发, 加入含有病毒液的磷酸缓冲液, 旋涡振荡, 得疫苗脂质体。

2.2 实验设计和优化选择

2.2.1 设计 运用正交实验的方法进行处方筛选, 主要因子有缓冲液的 pH 值、大豆磷脂和胆固醇的用量比、大豆磷脂的用量、冻融对包封率的影响。

2.2.2 包封率的测定 以蛋白质含量为包封率测定指标, 采用 Lowry 检测法测定包封率。将疫苗脂质体稀释 4 倍, 以

Study on chemical component of *Oxytropis kansuensis* Bunge.

. Analysis of component in extractive position of alkalinized chloroform

TONG De - wen, ZHAO Bao - yu, LIAN Shi - gang, FAN Ze - feng

(College of Animal Science and Technology, Northwest Sci - Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi, 712100, China)

Abstract: *Oxytropis kansuensis* Bunge. powder was dripped in methanol, the residue following evaporated of the methanol was dissolved in 1 mol/l HCl and filtered. The acidified filtrate at first extracted 8 times by chloroform, second alkalinized by NaOH, at last extracted 4 times by chloroform to obtain position of alkalinized chloroform. Applied 22.6 g position of alkalinized chloroform to a silica gel column and gradient eluted under system of chloroform - ethyl acetate - methanol, collected 30mL/fraction. 721 fractions was collected and monitored by TLC. Incorporated the same fraction to gain the crystal which was identified by TLC and spectrophotometry. Analysed the position of alkalinized chloroform with GC - MS to find 20 components, in which the structure of 1 alkaloid, 6 esters, 1 alcohol, 1 aromatic hydrocarbon, and 1 fatty acid were defined.

Key words: *Oxytropis kansuensis* Bunge.; TLC; column chromatography

23 000 r/min 超速离心 30 min,取上清液,测量游离病毒的蛋白质含量,算出包封率。

2.2.2.1 标准曲线的制作 配制浓度分别为 0.02 mg/ml, 0.04 mg/ml, 0.06 mg/ml, 0.08 mg/ml, 0.1 mg/ml 的蛋白质标准溶液,按 Lowry 检测方法测得 A_{595} 值,得标准曲线方程为:

$$A = 2.4986C + 0.0656 \quad r^2 = 0.9913$$

2.2.2.2 包封率的测定 正交实验的 18 个样品均进行 4

倍稀释,后以 23 000 r/min 离心 30 min,取上清液,用 Lowry 检测法测定,测得包封率,以包封率为依据,进行配方筛选。包封率的计算公式为:

$$\text{包封率} = 1 - (A_{595} - 0.0656) \times 2.987$$

2.2.3 电镜拍摄 取正交实验的 3、7、11 号样品各 15 μ l,稀释到 1 ml,电镜拍摄。结果见图 1。

2.2.4 结果 分析正交实验结果,各因素对包封率的影响,

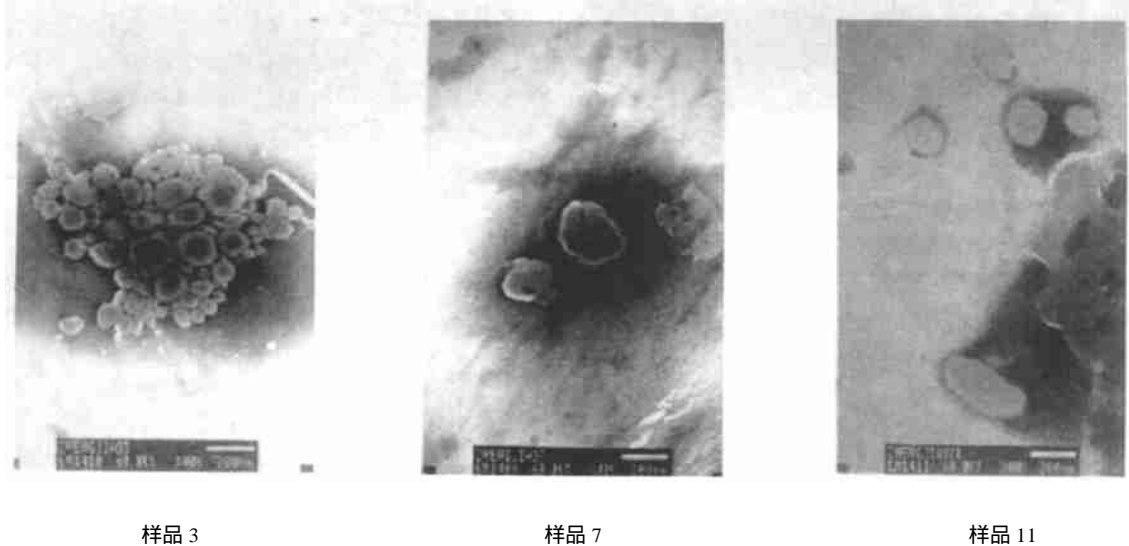


图 1 样品的电镜图片

由大到小排列为:冻融处理、大豆磷脂的用量、大豆磷脂与胆固醇的用量比、缓冲液的 pH 值。最佳条件为:不冻融、大豆磷脂用量 300 mg、磷脂胆固醇 = 41、缓冲液 pH 值 6.5。结果见表 1。

表 1 正交设计的处方组成和试验结果

| 编号 | 缓冲液 pH 值 | 磷脂 胆固醇 | 磷脂 用量/mg | 冻融处理 | 包封率/% |
|----|----------|--------|----------|------|-------|
| 1 | 5.8 | 4 | 300 | 冻融 | 61.95 |
| 2 | 5.8 | 2 | 400 | 冻融 | 67.32 |
| 3 | 5.8 | 3 | 500 | 冻融 | 41.93 |
| 4 | 6.5 | 4 | 400 | 冻融 | 49.10 |
| 5 | 6.5 | 2 | 500 | 冻融 | 53.88 |
| 6 | 6.5 | 3 | 300 | 冻融 | 67.92 |
| 7 | 7.2 | 4 | 300 | 冻融 | 78.97 |
| 8 | 7.2 | 2 | 400 | 冻融 | 64.04 |
| 9 | 7.2 | 3 | 500 | 不冻融 | 46.71 |
| 10 | 5.8 | 4 | 500 | 不冻融 | 72.70 |
| 11 | 5.8 | 2 | 300 | 不冻融 | 84.65 |
| 12 | 5.8 | 3 | 400 | 不冻融 | 81.96 |
| 13 | 6.5 | 4 | 500 | 不冻融 | 81.06 |
| 14 | 6.5 | 2 | 300 | 不冻融 | 81.96 |
| 15 | 6.5 | 3 | 400 | 不冻融 | 81.36 |
| 16 | 7.2 | 4 | 400 | 不冻融 | 83.45 |
| 17 | 7.2 | 2 | 500 | 不冻融 | 61.65 |
| 18 | 7.2 | 3 | 300 | 不冻融 | 79.57 |

3 讨论

3.1 所用病毒与其它有囊膜病毒一样,对乙醚、氯仿、丙酮等有机溶剂均敏感。常用的消毒药容易将其灭活,如福尔马林、-丙内酯、去氧胆酸钠、羟胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、稀酸、氨离子、卤素化合物(如漂白粉和碘剂等)、重金属离子等都能迅速破坏其传染性。病毒对热也很敏感,56 加热 30 min、60 10 min、65~70 加热数分钟即丧失活性。该病毒对冻融作用较稳定,但冻融的次数过多,最终会使病毒灭活。因而,在制备过程中,应尽量避免使用影响疫苗活性的材料和制备方法。

3.2 大豆磷脂同胆固醇的用量比,一般在 2:1 以上,若胆固醇用量过多,成膜不均匀,且易析出。

3.3 病毒的囊膜由纤突、双层类脂膜和基质蛋白构成。基质蛋白是病毒粒子内的主要蛋白成分,其形成的基质膜紧贴在类脂双层内面包围着核衣壳,是维持病毒形态的结构蛋白。所用病毒粒子的化学组成⁵为:RNA 0.8%~1.1%、蛋白质 70%~75%、脂质 20%~24%、碳水化合物 5%~8%。本实验采用测量蛋白质含量的方法来测定脂质体的包封率,通过测定上清液中游离病毒的蛋白质含量,以减量法计算出包封率。

3.4 脂质体在 16 000 r/min 离心 30 min,重复 6 次,得到的上清液在 750 nm 处测得的吸光度仍大于 0.2,上清液中的脂质体未能全部离心除尽。以 23 000 r/min,离心 30 min,效果也不理想。据文献⁶报道,脂质体在低温下,以 50 000 r/min

宁夏利通区产奶期奶牛铜盈亏状况调查

张 力¹, 周学辉¹, 蒋学勤², 焦 婷³, 龚伟宏⁴, 陈雁玲⁵, 邓建新⁶, 阎锡虎⁶, 杨学文⁶,
熊双丽³, 刘彩琴³, 王月霞⁶, 杨彦梅⁶, 贾玉珍⁶, 刘 晖⁶, 苗小林¹

(1. 中国农科院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050; 2. 宁夏农牧厅;

3. 甘肃农业大学; 4. 宁夏畜牧技术推广总站; 5. 西北农林科技大学; 6. 宁夏利通区畜牧局)

摘 要: 对宁夏吴忠市利通区 4 个奶牛场和 10 户农户进行奶牛产奶期铜营养状况进行了调查, 分别测定了奶牛盛乳期、产奶中期、产奶后期血清和毛铜的含量和血清中铜蓝蛋白、SOD 的活性。结果表明: 在盛乳期、产奶后期, 散户(产奶后期)、中户奶牛血液铜、毛铜含量偏低, 但未出现明显缺乏症状, 处于亚临床缺乏状态; 产奶中期各户奶牛各项指标均在正常范围之内, 混合料中的铜符合标准。各期小户奶牛各项指标基本正常, 饲喂状况良好。产奶各期血液铜蓝蛋白、SOD 的活性变化范围较小, 处于正常范围之内。

关键词: 奶牛; 产奶期; 铜; 盈亏调查

中图分类号: S816.72

文献标识码: A

文章编号: 1009-0533(2002)-05-0018-03

铜是奶牛体内的必需微量元素, 在维持生命和产奶过程中铜是不可缺少的。铜与机体的造血过程有密切关系, 参与成骨过程、色素代谢和角质化过程, 构成体内多种酶的组成

成分, 是许多酶的激活因子; 铜对维持奶牛的正常繁殖过程、机体的免疫功能具有重要作用。产奶牛每天从奶中排出一定量的铜, 对铜的需要量较高, 如果奶牛的饲料中铜缺乏时, 可造成机体铜缺乏, 临床表现为贫血、腹泻、生长受阻、骨代谢紊乱、平衡失调、毛发脱落和退色、繁殖机能紊乱、发情延迟、排卵延迟、流产或胎儿死亡。奶牛对饲料中铜的消化利用受许多因素的影响, 饲料中的锌、钼、硫对铜的消化吸收都有影响, 饲料搭配不合理, 添加剂使用不当, 都影响奶牛对铜

收稿日期: 2004-04-12

项目来源: 宁夏农牧厅科教处资助

作者简介: 张 力(1956-), 男, 研究员, 主要从事动物营养、饲料和化学饲料添加剂研究。

的速度下离心 4 h, 所得上清液脂质体基本除尽。本实验中, 由于实验条件的限制, 将脂质体稀释 4 倍, 以 23 000 r/min 离心 30 min, 所得的上清液在 750 nm 处吸光度在 0.02 以内, 对实验结果的影响可以忽略不计。

3.5 脂质体冻融过程中, 溶液局部的 pH 值会发生改变, 使药物发生转移, 因此很多药物可以通过冻融来提高包封率。但在本实验中, 冻融反而使包封率下降, 可能是由于本实验采用的药物, 对 pH 值的变化不敏感所致。

参考文献:

1 何宏虎, 田仁位. 免疫佐剂研究进展简介 [J]. 天津畜牧兽医, 1996, 13(2): 13.

2 Dougals C. Powers, Peter J. hanscome. In previously immunized elderly adults inactivated influenza A [J]. Vaccine, 13 (14): 1330 ~ 1335.

3 Aviva joseph, Igal Louria - Hayon. Liposoma immunostimulatory DNA sequence [J]. Vaccine, 20 (2002): 3342 ~ 3354.

4 Yan Huang, Robert Anderson. Enhanced immune protection by a liposome - encapsulated recombinant [J]. Vaccine, 2002, 20: 1586 ~ 1592.

5 吴正红, 平其能. 反相高效液相色谱法测定多糖包覆脂质体中胰岛素 [J]. 药物分析杂志, 2002, 22(6): 425 ~ 427.

Study on the preparation of liposome of deactivated virus

WANG Hong

(Zhejiang Medical College, Hangzhou Zhejiang 310053, China)

Abstract: Objective: To prepare the liposome enveloping deactivated virus. To gain the best formulation with the envelope ratio as the index, which will establish the basis for preparing virus liposome for oral/ injectable administration. Method: Vaccine liposome is prepared by film dispersion method and the Lowry method is used to detect the envelope ratio. Results: The vaccine liposome, the envelope ratio of which is higher than 80%, is obtained. Conclusion: The envelope ratio is affected by the frozen - fusion and the amount of phospholipid, the vaccine liposome, which was prepared, has high envelope ratio.

Key words: deactivated vaccine; liposome; preparation