

# *Ssp* DnaB intein 大肠杆菌中介导 FVIII 重链和轻链的连接

朱甫祥<sup>1</sup>, 刘泽隆<sup>1</sup>, 屈慧鸽<sup>1</sup>, 辛晓林<sup>1</sup>, 董洪新<sup>1</sup>, 刘相钦<sup>2</sup>

1 鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025

2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalhousie University, Halifax B3H 4H7, Canada

**摘要:** 研究利用 intein 的蛋白质反式剪接功能在大肠杆菌中对凝血 VIII 因子(FVIII)重链和轻链的连接作用, 将 B 结构域大部分缺失型 FVIII(BDD-FVIII)于满足剪接所需的保守性氨基酸 Ser<sup>1657</sup> 前断裂为重链和轻链, 分别与 split mini *Ssp* DnaB intein 的 106 个氨基酸的 N 端(Int-N)和 48 个氨基酸的 C 端(Int-C)融合, 构建到原核表达载体 pBV220。诱导表达后 SDS-PAGE 分析可见预期大小的 BDD-FVIII 蛋白条带, Western blotting 用 FVIII 特异性抗体证明其为剪接所产生的 BDD-FVIII 蛋白, 表明 intein 可有效连接 BDD-FVIII 的重链和轻链。为进一步甲型血友病基因治疗研究应用 intein 以双腺相关病毒载体(AAV)携带 FVIII 基因, 克服单个 AAV 载体的容量限制提供了依据。

**关键词:** Intein, 蛋白质反式剪接, 凝血 VIII 因子

## *Ssp* DnaB intein-mediated ligation of heavy and light chains of coagulation factor VIII in *Escherichia coli*

Fuxiang Zhu<sup>1</sup>, Zelong Liu<sup>1</sup>, Huige Qu<sup>1</sup>, Xiaolin Xin<sup>1</sup>, Hongxin Dong<sup>1</sup>, and Xiangqin Liu<sup>2</sup>

1 Life Science College of Ludong University, Yantai 264025, China

2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalhousie University, Halifax B3H 4H7, Canada

**Abstract:** We studied the ligation of coagulation factor VIII heavy and light chains in *Escherichia coli* by utilizing the intein-mediated protein *trans*-splicing. A B-domain deleted factor VIII (BDD-FVIII) gene was broken into two halves of heavy and light chains before Ser<sup>1657</sup> which meets the splicing required conserved residue and then fused to 106 and 48 amino acid-containing N-part termed Int-N and C-part termed Int-C coding sequences of split mini *Ssp* DnaB intein respectively. These two fusion genes were constructed into a prokaryotic expression vector pBV220. Through induction for expression of recombinant protein it displayed an obvious protein band as predicted size of BDD-FVIII protein on SDS-PAGE gel. Western blotting using factor VIII specific antibodies confirmed that this protein band is BDD-FVIII produced by protein *trans*-splicing. It demonstrated that the heavy and light chains of BDD-FVIII can be efficiently ligated with the *Ssp* DnaB intein-mediated protein *trans*-splicing. These results provided evidence for encouraging our ongoing investigation with intein as a means in dual AAV vectors carrying the factor VIII gene to overcome the packaging size limitation of a single AAV vector in hemophilia A gene therapy.

**Received:** March 23, 2009; **Accepted:** May 12, 2009

**Supported by:** Natural Science Foundation of Shandong Province (No. Y2005D14), Science and Technology Program of Yantai City (No. 2008152), Scientific Research Foundation from Education Ministry for the Returned Overseas Chinese Scholars, Scientific Research Foundation of Ludong University.

**Corresponding author:** Fuxiang Zhu. Tel: +86-535-6693825; E-mail: fuxiangmail@163.com

山东省自然科学基金(No. Y2005D14), 烟台市科技计划项目(No. 2008152), 教育部留学回国人员科研启动基金, 鲁东大学科研启动经费项目资助。

**Keywords:** intein, protein *trans*-splicing, coagulation factor VIII

Intein 是存在于蛋白质前体中的一段多肽序列,在蛋白质成熟过程中通过自催化作用被切除,同时伴随两侧宿主蛋白质(N-extein, C-extein)以肽键相连,成为具有生物学功能的成熟蛋白质<sup>[1]</sup>。迄今发现的100多种 intein 主要存在于原核生物和单细胞真核生物的宿主蛋白,序列对比分析表明, intein 之间的同源性较低,但在两侧的剪接部位存在保守的氨基酸,即 N 端的 Cys 或 Ser、C 端的 Asn 以及与之相连的 C-extein 首个 Cys、Ser 或 Thr,通过这些保守氨基酸之间的相互作用,经过不需要细胞机制参与和能量消耗的四步反应完成剪接过程,与 RNA 剪接相比,蛋白质剪接是发生于翻译后水平。蛋白质剪接分为顺式(*cis*)和反式(*trans*)两种,大多数属于前者, *Ssp* DnaE intein 是第一个发现于 *Synechocystis* sp. strain PCC6803 的 DNA 聚合酶催化亚基的反式剪接 intein<sup>[2]</sup>。另外,大多数 intein 在其分子的中部含有1个核酸内切酶功能域,参与 intein 在宿主基因组内的移动,去掉该功能域的 mini intein 通常不影响剪接功能。研究表明,另一种发现于 *Synechocystis* sp. strain PCC6803 的 DNA 解旋酶前体蛋白的 *Ssp* DnaB intein<sup>[3]</sup>由 429 个氨基酸残基组成,除去其内切酶功能域后的 mini *Ssp* DnaB intein 在满足 C-extein 首个保守氨基酸时表现出对外源蛋白的顺式剪接作用,而且断开成 2 部分的 split mini *Ssp* DnaB intein 仍然可介导外源蛋白不同程度的反式剪接<sup>[4]</sup>。正是基于 intein 的这些特性,促进了近年来对于 intein 应用的研究。

利用 intein 的蛋白质反式剪接功能,将较大的基因人工断裂后与 intein 融合,通过表达后的剪接,重新形成完整的蛋白质分子,对于克服某些病毒载体转运较大的治疗基因的容量限制,在基因治疗研究中是一个具有潜在应用意义的分子工具。基于这种策略,本研究应用原核表达系统,试验 intein 对于人 FVIII 的反式剪接作用。FVIII 基因属于较大基因,其缺陷导致甲型血友病。选用去掉大部分 B 结构域的功能性 FVIII(B-domain deleted factor VIII, BDD-FVIII, Δ761-1639)的 cDNA,在其分子中部满足 C-extein 首个保守残基 Ser<sup>1657</sup> 前将其断裂成重链和轻链,分别与 split mini *Ssp* DnaB intein 的 N 端

(Int-N)和 C 端(Int-C)基因融合,构建到强启动子温控诱导型原核表达载体 pBV220,诱导表达后检测到明显的剪接形成的 BDD-FVIII 蛋白,为后续的真核细胞表达、剪接以及动物体内基因治疗甲型血友病实验研究以双 AAV 载体系统转运 FVIII 基因奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒与菌株

含有 split mini *Ssp* DnaB intein 编码序列的质粒 pMST 为加拿大 Dalhousie 大学 Paul Liu 教授实验室构建,本室保存。含有 BDD-FVIII cDNA 的质粒 pcDNA3.1-F8 由本实验室构建、保存。温控型原核表达质粒 pBV220 由中国疾病预防控制中心病毒所张智清教授构建<sup>[5]</sup>,本室保存。大肠杆菌菌株 DH5α 为本室保存。

### 1.2 工具酶和主要试剂

限制性内切酶、DNA 连接酶试剂盒、蛋白质分子量标准购自 New England Biolabs 公司,高保真 *Pfu* Turbo DNA 聚合酶购自 Stratagene 公司; Gel Extraction Kit、PCR Purification Kit、Spin Miniprep Kit 均为 Qiagen 公司产品。FVIII 重链单克隆抗体 ESH5 和轻链单克隆抗体 ESH4 购自 American Diagnostica 公司,兔抗小鼠 HRP-二抗、ECL plus Western Blotting Detection 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech (GE)公司;酵母提取物和蛋白胨均为 Oxoid 公司产品;其他试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.3 重组原核 intein 融合表达载体的构建

为便于构建,先用定点突变试剂盒除去原核表达质粒 pBV220 的 CIts857 编码序列中的 2 个 *Hind* III 识别位点。合成一对互补的编码 FVIII 信号肽的寡核苷酸: 5'-GATCCAATGCAAATAGAGCTCTCC ACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCT TTAGTC-3', 5'-AATGACTAAAGCAGAATCGCAA AAGGCACAGAAAGAAGCAGGTGGAGAGCTCT ATTTGCATTG-3', 退火后两侧分别含 *Bam*H I 和 *Mfe* I 的粘性末端;以 5'-CTAGCAATTGTCACCAG AAATAGAAAAG-3'(下划线为 *Mfe* I 识别位点), 5'-GTTATGGACAATGATGACATTGG-3' 和 5'-TC

AGATCAAGAGGAAATTGACTATG-3', 5'-CTAGC TG CAGTCAGTAGAGGTCCTGTGCCTC-3' (下划线为 *Pst* I 识别位点) 2 对引物, 分别以 pMST 和 pcDNA3.1-F8 为模板扩增得到 split mini *Ssp* DnaB intein 的 Int-C 和 FVIII 轻链部分(Light chain, LC)的编码序列, 分别以 *Mfe* I 和 *Pst* I 酶切后, 与 *Bam*H I/*Pst* I 双酶切的质粒 pBV220 及退火后的 FVIII 信号肽编码序列以 T4 DNA 连接酶进行连接反应, 得到亚克隆质粒 pBV-IL。以 5'-CTAGCTGCAGATGCAA ATAGAGCTCTCCACCTG-3' (下划线为 *Pst* I 识别位点), 5'-CTGAAGAGTAGTACGAGTTATTTC-3' 和 5'-TGCATCAGTGGAGATAGTTTGTATC-3', 5'-CTA G AAGCTTTCACAATTGTAAGAGGAGCTTTCT AG-3' (下划线为 *Hind* III 识别位点) 为引物, 分别从 pcDNA3.1-F8 和 pMST 质粒扩增出 FVIII 重链部分 (Heavy chain, HC) 和 split mini *Ssp* DnaB intein 的 Int-N 编码序列, 分别以 *Pst* I 和 *Hind* III 酶切后与 *Pst* I/*Hind* III 双酶切得到的线性化质粒 pBV-IL 连接, 得到亚克隆质粒 pBV-ILHI。以质粒 pBV-ILHI 作为模板, 以 5'-TTAATAATAATGCAAATAGAGCTCT C CACCTG-3' 和 5'-TCCTCCTCAGTAGAGGTCCTG TGCCTC-3' 为引物进行反向 PCR, 将扩增产物自身连接环化, 得到 Int-C 和 LC 融合基因与 HC 和 Int-N 融合基因之间引入含有核糖体结合位点(Shine-Dalgarno

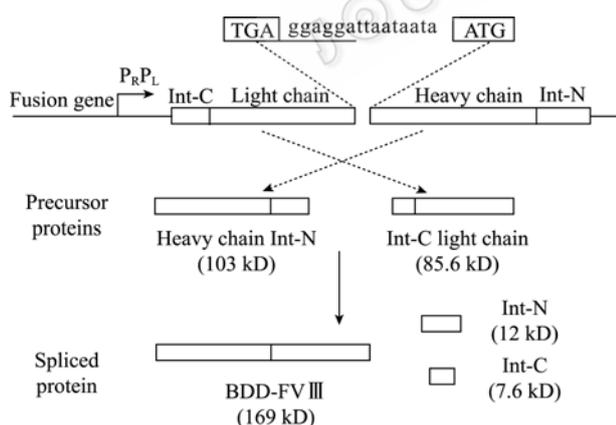


图 1 重组融合基因结构与预期蛋白产物示意图

Fig. 1 Schematic illustration of a recombinant fusion gene construct and predicted protein products. The intein-light chain fusion gene is placed in front of the heavy chain-intein fusion gene and constructed into plasmid pBV220. The two fusion genes are separated by a spacer sequence including the stop codon (boxed TGA) of first fusion gene, Shine-Dalgarno sequence (underlined) followed by an AT rich region and the start codon(boxed ATG) of the second fusion gene.

序列) 的间隔序列 (Spacer) 的重组原核表达质粒 pBV-IF8, 包括间隔序列的融合基因及预期表达蛋白产物如图 1 所示。将上述获得的重组子转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 含氨苄青霉素 LB 平板筛选转化子, 用酶切和 DNA 序列测定进行鉴定。另外, 将 BDD-FVIII cDNA 插入 pBV220, 构建 pBV-F8, 以作为对照表达完整的 BDD-FVIII 蛋白。以上引物及测序用引物均由上海生工公司合成。

#### 1.4 重组蛋白的表达和剪接的观察

将 pBV-IF8 及对照质粒 pBV-F8 分别转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取单菌落接种到 LB 培养液中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 次日以 2% 接种到新鲜的 LB 培养液, 30 $^{\circ}$ C 继续振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.6, 迅速转移至 42 $^{\circ}$ C 水浴升温, 然后转至预热至 42 $^{\circ}$ C 的培养摇床, 继续振荡培养 5 h 进行诱导表达。诱导结束后, 将培养物 4 $^{\circ}$ C 下以 10 000 r/min 离心 10 min 收集细菌沉淀, 加等体积的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液和双蒸水重悬细菌沉淀, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min。上样进行还原性 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 R-250 染色分析重组蛋白的表达和蛋白质的剪接, 灰度扫描测定蛋白质剪接的效率。

#### 1.5 Western blotting 鉴定剪接蛋白

样品进行 SDS-PAGE 后, 用半干电转仪(Bio-Rad 公司)将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 1%BSA 室温封闭 2 h, 用 1:500 稀释的人 FVIII 重链单克隆抗体 ESH5 或轻链单克隆抗体 ESH4, 37 $^{\circ}$ C 轻摇反应 1 h, 再用 HRP-二抗 37 $^{\circ}$ C 轻摇反应 1 h, ECL 法进行曝光。

## 2 结果

### 2.1 重组融合原核表达质粒 pBV-IF8 的鉴定

利用温度诱导型原核表达载体 pBV220, 所构建的亚克隆质粒 pBV-IL、pBV-ILHI 以及重组融合原核表达质粒 pBV-IF8 如图 2 所示。少量提取质粒进行了酶切电泳鉴定, 用 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切亚克隆质粒 pBV-IL, 阳性克隆可见 3.7 kb 的 pBV220 载体片段和 2.2 kb 的插入片段; 用 *Pst* I / *Hind* III 酶切 pBV-ILHI, 阳性克隆可见 5.9 kb 的 pIL 载体片段和 2.7 kb 的插入片段; 由于引入间隔序列时破坏了轻链和重链间的 *Pst* I 酶切位点, *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切的阳性 pBV-IF8 克隆可见 3.7 kb 的 pBV220 载体片段

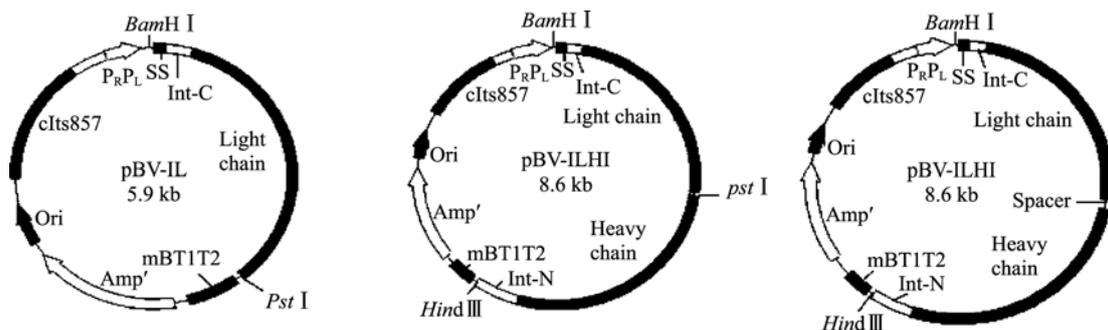


图 2 重组质粒 pBV-IL、pBV-ILHI 和 pBV-IF8 结构示意图

Fig. 2 Structures of recombinant plasmids pBV-IL, pBV-ILHI and pBV-IF8. SS: signal sequence of FVIII.

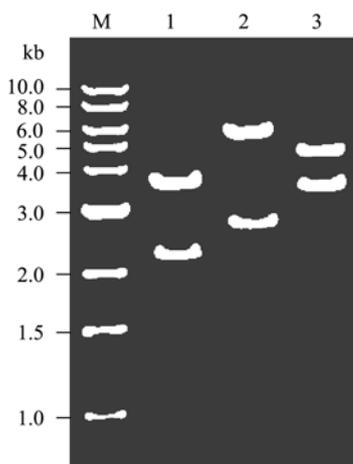


图 3 重组质粒酶切鉴定

Fig. 3 Digestion of recombinant plasmids. M: DNA marker; 1: *Bam*H I/*Pst* I digested pBV-IL; 2: *Pst* I/*Hind* III digested pBV-IL; 3: *Bam*H I/*Hind* III digested pBV-IF8.

和插入的 4.9 kb 的目的基因片段(图 3)。测序结果表明重组质粒序列与设计完全一致。

2.2 重组蛋白的表达与蛋白质剪接

由于 pBV220 的双启动子  $P_{RPL}$  受噬菌体温度敏感基因 *CIts857* 表达产物的控制, 通过对培养物 OD 值的监测, 控制诱导时间点位于细菌的对数生长期。将经温度诱导的细菌裂解液进行的 SDS-PAGE 显示, 与未经诱导的细菌相比, 对照质粒 pBV-F8 转化菌有一明显的 BDD-FVIII 蛋白表达条带, pBV-IF8 转化菌在同一水平上, 有一明显预期大小的 BDD-FVIII 蛋白剪接条带(H-L, 169 kD), 另外还有未被完全剪接的预期大小的 HC 与 Int-N 融合蛋白(H-I, 103 kD)和 Int-C 与 LC 融合蛋白(I-L, 85 kD)条带, 以及剪切下来的 Int-N 蛋白(12 kD), 而剪切下来的 Int-C 由于分子量较小电泳过程中已经出胶故不能显示, 凝胶成像系统扫描显示剪接蛋白的比率占总融合表达蛋白的 61%(图 4)。应用 FVIII 的 HC 和

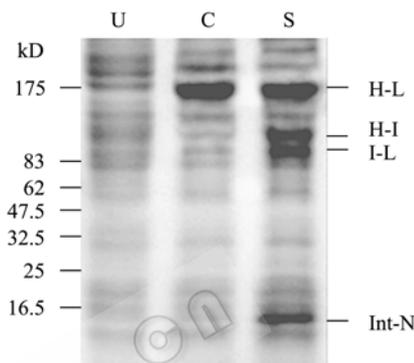


图 4 重组融合蛋白表达、剪接的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expression and splicing of recombinant fusion proteins. U: uninduced cell lysate; C: cell lysate of pBV-F8 transformed *E. coli* showing expressed standard BDD-FVIII protein; S: cell lysate of pBV-IF8 transformed *E. coli* showing spliced BDD-FVIII (H-L), unspliced fusion proteins of heavy chain-intein (H-I) and intein-light chain I-L) and excised N-part of intein (Int-N), respectively.

LC 特异性单克隆抗体的 Western blotting 进一步证明了上述结果, 剪接下来的 intein 蛋白由于不被抗体识别未见该蛋白条带(图 5)。

3 讨论

作为主要发现于原核生物和低等真核生物中某些宿主蛋白中具有蛋白质剪接作用的 intein, 基于对其分子水平剪接机理的认识及其所具有的对于非天然宿主蛋白质的剪接作用, 近年来在蛋白质纯化<sup>[6]</sup>、多肽环化<sup>[7]</sup>以及蛋白质相互作用<sup>[8]</sup>等研究中得到应用。本研究运用 split mini *Ssp* DnaB intein 的蛋白质反式剪接功能, 在原核表达系统中表现出对 BDD-FVIII 的高效剪接作用。所采用的 pBV220 原核表达载体是我国学者构建的一种原核高效表达载体, 具有很多优点, 如便于操作的强启动子和强转

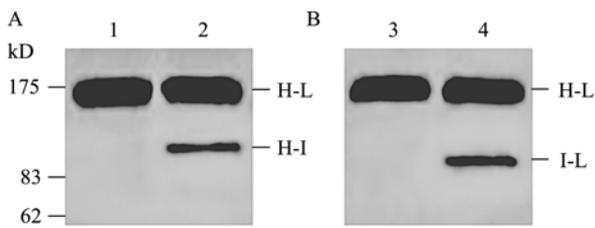


图5 观察 BDD-FVIII 反式剪接的 Western blotting 分析  
Fig. 5 Observation of *trans*-spliced BDD-FVIII by Western blotting. (A) With the monoclonal antibody against the heavy chain of factor VIII (ESH5). (B) With the monoclonal antibody against the light chain of factor VIII (ESH4). 1, 3: expressed BDD-FVIII protein from the control plasmid pBV-F8; 2, 4: spliced BDD-FVIII (H-L), unspliced intein-containing fusion proteins of heavy and light chains (H-I and I-L) from the pBV-IF8 transformed *E. coli* cells.

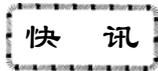
录终止子控制下的温度诱导重组基因的表达,高拷贝数,大容量以及可在任何宿主菌中表达重组蛋白等<sup>[5]</sup>,在原核表达实验中多有应用。本研究小组曾用该载体在大肠杆菌中表达了具有溶栓和抗血小板聚集活性的人尿激酶和 Arg-Gly-Asp(RGD)肽融合蛋白<sup>[9]</sup>。研究表明, intein 对其天然宿主蛋白的剪接十分迅速而且完全,甚至难以检测到未剪接的前体蛋白。尽管已阐明的剪接机理所涉及的只有 intein 分子本身两侧和其下游 C-extein 首个保守性氨基酸残基,而且所发现的 intein 之间分子同源性较低,但 intein 对非天然宿主蛋白的剪接效率高低不一,说明 intein 两侧的宿主蛋白的组成和结构对剪接反应有一定影响,但影响的分子机制未明。本研究试验了 split mini *Ssp DnaB* intein 对在不同点断裂的 BDD-FVIII 的剪接作用,包括与该 intein 的天然宿主蛋白首个 C-extein 氨基酸残基 Ser 相同的 Ser<sup>741</sup>、Ser<sup>743</sup>、Ser<sup>746</sup>、Ser<sup>750</sup>、Ser<sup>1657</sup> 位点,其中只有本试验中的 Ser<sup>1657</sup> 断裂点显示较高的剪接效率(达到 61%),可观察到未被完全剪接的前体融合蛋白(图 3 和图 4),而其他点的剪接效率都很低甚至观察不到(结果未显示),进一步说明剪接位点附近目的蛋白的残基组成尽管不直接参与剪接反应,但对剪接效率的影响显而易见,因此运用 intein 对特定目的蛋白剪接研究均需试验来确定最有效的融合方式,特别是反式剪接,由于涉及 intein 蛋白 2 部分之间的相互识别和作用,尽管满足剪接的保守性氨基酸,但目的蛋白氨基酸形成的某些不利于 intein 识别和作用的局部

结构势必影响剪接的效率,甚至使 intein 不能相互作用而不能产生剪接反应。一个典型的证据是,首个发现的天然反式剪接 *Ssp DnaE* intein 在一些不同的外源目的蛋白剪接试验中,其剪接效率甚至不及其他人工断开的顺式作用 intein,说明 intein 和其天然宿主蛋白的搭配组成是分子进化中自然选择的结果,最有利于剪接功能的发挥。为了研究 FVIII 轻链对于重链和整个蛋白分泌的影响,最近本研究小组采用 intein 剪接策略,基于提高剪接效率的考虑,甚至将 3 个与 *Ssp DnaB* intein 两侧紧邻的天然宿主蛋白相同的氨基酸残基分别添加于重链的 C 端和轻链的 N 端,仍然只有有限的剪接发生,而且由于剪接后这 6 个额外氨基酸残基的保留带来的对目的蛋白生物学功能的影响甚或抗原性的改变都是潜在的不利因素<sup>[10]</sup>。考虑到作为分泌性蛋白的 FVIII 在后续的真核细胞和动物体内剪接实验研究,在本研究原核表达系统试验中,将 FVIII 的信号肽序列引入到 Int-C 的 N 端,观察其对剪接的影响,从实验结果来看,信号肽序列对剪接的影响即使有也不显著。另外,尽管真核细胞与原核细胞的大肠杆菌存在很大差异,由于 intein 的剪接作用不需要细胞机制的参与和能量的消耗,属于自催化反应,原核剪接的结果为进一步的真核细胞转 FVIII 基因研究以及甲型血友病基因治疗研究中运用蛋白质反式剪接的双载体转移 FVIII 基因策略提供了科学依据。

## REFERENCES

- [1] Saleh L, Perler FB. Protein splicing in cis and in trans. *Chem Rec*, 2006, 6(4): 183-193.
  - [2] Wu H, Xu MQ, Liu XQ. Protein trans-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial dnaB intein. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1387(1-2): 422-432.
  - [3] Pietrokovski S. A new intein in cyanobacteria and its significance for the spread of inteins. *Trends Genet*, 1996, 12(8): 287-288.
  - [4] Wu H, Hu Z, Liu XQ. Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(16): 9226-9231.
  - [5] Zhang ZQ, Yao LH, Hou YD. Construction and application of a high level expression vector containing P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> promoter. *J Virol*, 1990, 6(2): 111-116.
- 张智清,姚立红,侯云德.含 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 启动子的原核高效表达

- 载体的组建及其应用. 病毒学报, 1990, 6(2): 111-116.
- [6] Sharma SS, Chong S, Harcum SW. Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in *E. coli*. *J Biotechnol*, 2006, 125(1): 48-56.
- [7] Williams NK, Prosselkov P, Liepinsh E, *et al.* *In vivo* protein cyclization promoted by a circularly permuted *Synechocystis* sp. PCC6803 DnaB mini-intein. *J Biol Chem*, 2002, 277(10): 7790-7798.
- [8] Ludwig C, Schwarzer D, Mootz HD. Interaction studies and alanine scanning analysis of a semi-synthetic split intein reveal thiazoline ring formation from an intermediate of the protein splicing reaction. *J Biol Chem*, 2008, 283(37): 25264-25272.
- [9] Zhu FX, Xing GC, He FC. Construction of fusion recombinant plasmid coding for RGD peptide and urokinase B chain, its expression in *Escherichia coli* and preliminary characterization of its biological activity. *Chin J Biotech*, 2000, 16(5): 582-586.
- 朱甫祥, 邢桂春, 贺福初. RGD 肽与尿激酶 B 链融合蛋白原核重组表达质粒的构建、表达和功能的初步分析. 生物工程学报, 2000, 16(5): 582-586.
- [10] Chen LX, Zhu FX, Li J, *et al.* The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene. *Mol Ther*, 2007, 15(10): 1856-1862.



### 中国首批甲型 H1N1 流感疫苗下线

由华兰生物生产的中国首批甲型 H1N1 流感疫苗 6 月 22 日正式下线, 华兰生物工程股份有限公司常务副总经理范蓓表示, 下线后的疫苗仍需经过约 14 d 的生物、生化实验, 在确保疫苗的安全性和有效性后, 于 7 月进入临床观察。在获得国家食品药品监督管理局的药品批准文号后, 这批疫苗有望于 9 月正式上市。

据范蓓透露, 为确保疫苗的安全有效, 6 月 17 日华兰生物向国家食品药品监督管理局递交了临床实验方案, 经与会专家讨论, 目前已确定了最终的临床方案。

华兰生物于 6 月 3 日从世界卫生组织认可的英国实验室取得中国第一支甲型 H1N1 流感疫苗生产用毒株。6 月 13 日初步完成了毒株筛选工作, 并建立了中国第一个甲型 H1N1 流感疫苗生产种子库, 正式进入生产阶段。

华兰生物目前具备日连续处理 20 万枚鸡胚的能力, 其甲型 H1N1 流感疫苗的日产量可达 60 万剂, 月产量可达 1500 万剂, 年产量可达 1.6 亿剂。

来源: 新华网

2009-06-22