

生物反应器中 PRRSV TJM 株在 Marc - 145 细胞上最佳增殖条件研究

于竞杰^{1,2},冯二凯²,尹茉莉²,任飞²,盛程程^{1,2},胡桂学^{1*},陈立志^{2*}

(1. 吉林农业大学动物科学技术学院,长春 130118;2. 吉林特研生物技术有限责任公司,长春 130112)

[收稿日期] 2016 - 06 - 29 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2016) 09 - 0001 - 05 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为了在 Marc - 145 细胞上获得更高滴度的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) TJM 株,对细胞培养条件、细胞接种量、微载体的用量以及病毒培养时间等条件进行了优化。结果表明,利用生物反应器悬浮培养 Marc - 145 细胞在血清为金源康且含量为 10%、培养基为 DMEM、细胞接种密度为 20 ~ 30 细胞/球、微载体为 5 g 等条件下生长状态最好;病毒最佳培养时间为 27 ~ 36 h,病毒增殖效果好且能够达到最高的病毒滴度。本试验为微载体培养条件下大规模生产 PRRSV - TJM 株疫苗奠定了一定理论基础。

[关键词] PRRSV; Marc - 145 细胞;微载体;生物反应器

Best Propagation Conditions of PRRSV TJM Strain on Marc - 145 Cells in Bioreactor

YU Jing - jie^{1,2}, FENG Er - kai², YIN Mo - li², REN Fei²,
SHENG Cheng - cheng^{1,2}, HU Gui - xue^{1*}, CHEN Li - zhi^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, JiLin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. JL Teyan Biological Technology Limited Liability Company, Changchun 130112, China)

Abstract: In order to obtain higher titers of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) TJM strain on Marc - 145 cells, cell culture conditions, cell inoculation, the amount of microcarrier and time of virus culture, etc. were optimized. The results showed that the growth status of Marc - 145 cells was the best by using suspension culture in the bioreactor under followed conditions: serum was Jin Yuan Kang and content was 10%; medium was DMEM; cell concentration was 20 ~ 30 cells per microcarrier; weight of microcarriers were 5 grams. Besides, when the culture time of virus was 27 ~ 36 h, the effect of virus reproduction was best and the titer was highest. This study provided a theoretical basis for large - scale production of PRRSV TJM strain vaccine.

Key words: PRRSV; Marc - 145 cell; microcarrier; bioreactor

基金项目: 国家科技攻关计划横向课题 (201500001); 吉林省科技攻关计划 (20150204073NY)

作者简介: 于竞杰, 硕士研究生, 从事动物分子病毒学研究。

通讯作者: 胡桂学, E - mail: Huguixue901103@163.com; 陈立志, E - mail: tcslcz@126.com

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的一种严重危害养猪业的二类传染病^[1]。在20世纪80年代美国首次报道了该病^[2]。1991年荷兰成功分离到该病毒并命名为Lelystad病毒^[3-4]。1996年郭宝清等人在国内某猪场首次分离出PRRSV,并命名为CH-1 α 株^[5]。直到2006年我国首次爆发了高致病性呼吸与繁殖综合征,给养猪业带来巨大的经济损失^[6]。由于病毒经过周期性扩张,出现基因交换^[7],导致新亚型病毒出现。随后许多高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定被相继报道^[8]。培养PRRSV常用的细胞系有猪肺泡巨噬细胞(PAM)、MA-104细胞以及Marc-145细胞等。伴随着国家第1708号公告的颁布,血清价格不断上涨的压力以及市场对于高质量疫苗需求,国内外越来越多的企业和研究机构都着手进行PRRSV工艺革新,目前国内外还没有关于PRRSV TJM株的报道。本研究采用Marc-145细胞在生物反应器中不同培养条件下对PRRSV增殖的培养条件进行了优化,为疫苗的生产提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、毒株、血清和培养基 Marc-145细胞由吉林特研生物技术有限责任公司保存,并经过传代培养至第10代进行试验;PRRSV TJM毒株(第78代)由吉林特研生物技术有限责任公司保存;金源康血清(批号20150629)购自内蒙古金源康生物工程有限公司;草原绿野血清(批号140101001)购自呼和浩特市草原绿野生物工程材料有限公司;MEM与DMEM培养基均购自Gibco公司(批号160110400PM);微载体cytodex-1(批号17044803)购自GE公司。

1.1.2 仪器 生物反应器购自广州奇志公司(型号BC-7L);细胞计数仪Countstar购自上海乐纯生物技术有限公司(型号IC1000)。

1.2 方法

1.2.1 Marc-145细胞的复苏 从液氮罐取出冻

存的细胞,放入到37℃水浴锅中,轻轻摇晃使之融化,在超净台内吸出细胞悬液加入细胞培养瓶中并补加培养液置于37℃5%CO₂恒温箱中,细胞贴壁后换液1次,继续培养细胞直至细胞长满单层。

1.2.2 Marc-145细胞传代及转瓶培养 将长满单层的Marc-145细胞培养瓶中的培养液弃掉,用PBS进行冲洗1~2遍,加入0.25%的胰酶1mL轻轻摇晃细胞培养瓶使细胞充分接触胰酶后弃掉,放入温箱待细胞培养瓶“发雾”并有针状空隙后加入含8%血清的MEM培养液终止消化,用移液器反复吹打细胞平均分成4个瓶并补加培养液。待每个细胞培养瓶形成Marc-145细胞单层,按照上述方法进行消化及终止,准备好一个1L含8%血清DMEM细胞培养液,将这4个T125细胞瓶的细胞用移液枪吸取7~8mL分别加入反应体系中充分混匀,最后将1L的细胞液倒入10L转瓶中,盖上瓶塞放入转瓶机进行培养。

1.2.3 转瓶Marc-145细胞上生物反应器培养 待转瓶Marc-145细胞在显微镜下观察其长满致密单层细胞,按照方瓶消化细胞的方法进行消化,然后将细胞用移液器进行反复吹打混匀并将细胞悬液加入到1L含8%DMEM中混匀后吸取1mL进行细胞计数,最后将该1L细胞液利用管道打入生物反应器内,调节好四气(CO₂、O₂、N₂、Air)并调至自动,7.5%的碳酸氢钠溶液调至自动添加,转速调至60r/min进行悬浮培养。

1.2.4 病毒的复壮 取总体积为10L转瓶培养的长满单层的Marc-145细胞弃去营养液,加入1mL稀释好的病毒液,37℃吸附60min,期间每20min摇晃1次以使病毒与细胞充分接触,60min后补加维持液置于CO₂温箱中并每天观察细胞病变情况,当CPE达到80%,反复冻融3次后置于-20℃保存。

1.2.5 TCID₅₀的测定 方瓶细胞长满单层时,按10⁶/mL细胞浓度向96孔板中每孔加入150 μ L的细胞悬液,然后轻轻震荡96孔板,使细胞分散均匀然后置于37℃的CO₂温箱中培养,将待测病毒进行10倍系列稀释至10⁻⁷,同时设立未接毒的

细胞作为阴性对照,对 96 孔板细胞进行滴定,参照 Reed - Muench 法来计算 $TCID_{50}$ 。

1.2.6 最佳血清及培养基试验 在保证微载体量和接种细胞一定的条件下,采用分批式培养 Marc - 145 细胞微载体悬浮培养 PRRSV,分别做不同批次的 10% 草原绿野血清 + MEM 培养基、10% 金源康血清 + MEM 培养基、10% 金源康血清 + DMEM 培养基,并在不同批次不同的时间段进行取样后进行病毒的滴定,测出这 3 组的 $TCID_{50}$,算出不同批次同一时间点的 $TCID_{50}$ 的平均值,试验进行了 3 次重复性试验,取最接近平均值的数据进行分析并绘制折线图,通过比较可以得出该工艺的最佳血清和培养基。

1.2.7 最佳细胞接种量试验 采用 3 个细胞接种量梯度进行试验: 10 ~ 20 cells/球 ($2.15 \times 10^5 \sim 4.3 \times 10^5$)、20 ~ 30 cells/球 ($4.3 \times 10^5 \sim 6.45 \times 10^5$)、30 ~ 40 cells/球 ($6.45 \times 10^5 \sim 8.6 \times 10^5$)。在确定最优培养基和血清的条件下,保证微载体量一定时按照不同的初始上罐细胞浓度进行微载体悬浮培养,通过比较他们在 24 h、48 h 和 72 h 显微镜下观察细胞生长状态差异情况以及在接毒后不同时间段取样并测量病毒的 $TCID_{50}$ 来综合考虑得出该最佳细胞接种量。

1.2.8 最佳微载体量试验 在血清、培养基和细胞接种量为最佳的条件下,分别做不同批次的 3 g、5 g 和 8 g 微载体进行试验,通过比较空球率的大小及接毒后病毒的 $TCID_{50}$ 来确定最佳微载体的含量。

1.2.9 病毒最佳培养时间试验 分别做不同批次及不同条件微载体悬浮试验,经过了五次的重复性试验,选取了最具有代表性的三个批次结果进行简要分析,通过比较不同批次接毒后的 $TCID_{50}$,以其中 $TCID_{50}$ 最高者所对应的取样时间为最佳病毒培养时间。

2 结果

2.1 病毒复壮后病毒滴度 病毒复壮后其病毒滴度为 $10^{7.2} TCID_{50}/mL$ 。

2.2 血清和培养基的选择 结果见图 1。

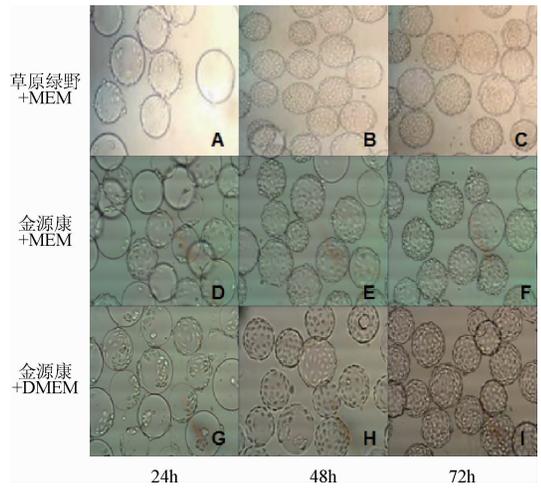


图 1 不同血清及培养基条件下培养 Marc - 145 细胞在不同时间点微载体显微形态观察

通过观察图 1 中三组细胞显微镜下的生长形态可以看出: A 组中细胞大部分没有长到载体上,而 D 组空球较少,因此可以得出血清应该选用金源康; G 组和 D 组在 24 h 细胞生长差异不大,但到 72 h 可以看出 G 组细胞轮廓清晰且每个球都长满细胞而 F 组仍然有没长满的球。

为了进一步验证所选血清和培养基,我们对培养 72 h 后的细胞进行病毒的滴定,测得 $TCID_{50}$ 结果如图 2 所示。经过比较可以看出,图 2 - C 中的 $TCID_{50}$ 数值明显高于另外 2 组,所以最佳血清和培养基的选择为金源康血清和 DMEM 培养基。

2.3 最佳细胞接种量试验 Marc - 145 细胞在载体上生长结果见图 3。10 ~ 20 cells/球上罐经过 24 h 取样,显微镜下观察出现大量空载体,极少数细胞能够长到载体上,直到培养至 72 h,载体上的细胞仍然没有长到致密球体。20 ~ 30 cells/球和 30 ~ 40 cells/球的试验,接种后 72 h 内都能获得足够数量的细胞,病毒的滴度达到 $10^{8.5} TCID_{50}/mL$ 。但以 40 cells/球的接种,培养 48 h 后载体上的细胞过多导致细胞有脱落,72 h 有细胞老死脱落现象和大量的细胞碎片,接毒后病毒的滴度最高也只能达到 $10^{7.75} TCID_{50}/mL$ 。本梯度试验进行了大量重复性试验,如 10 ~ 20 cells/球这一梯度,进行了 (10、13、15 和 18 cells/球) 试验,同理 20 ~ 30 cells/球和

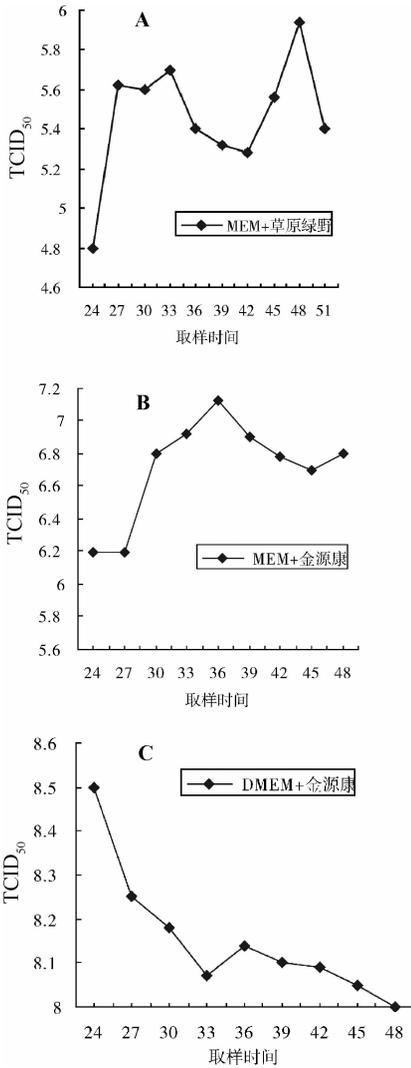


图2 不同血清和培养基条件下的 TCID₅₀ 取样分布图

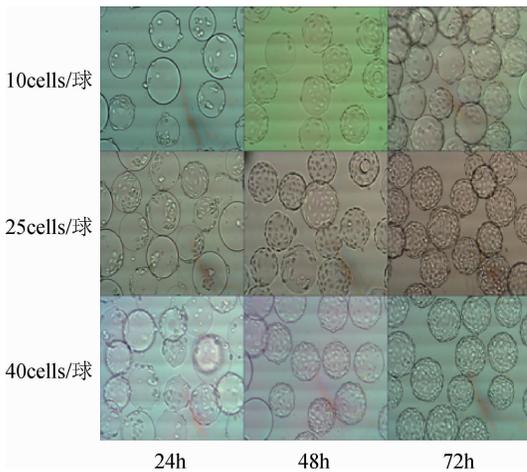


图3 不同梯度的细胞接种量微载体显微镜下的形态观察

30~40 cells/球也进行了多次试验,选取各个梯度细胞生长差异明显的一组为 10 cells/球、25 cells/球和 40 cells/球进行了分析和说明。

2.4 最佳微载体量试验 我们在保证一定细胞接种量,一定血清和培养基的条件下,微载体量按 3 g/L、5 g/L 和 8 g/L 进行试验。经过多个批次的大量重复性试验,取样观察,结果发现:微载体为 3 g/L 时,每个载体上的细胞过多,当培养到 72 h,细胞生长过密,导致细胞从载体上脱落,致使细胞悬液中出现大量死细胞及细胞碎片;微载体为 5 g/L 时,每个载体都有细胞,没有空球出现而且细胞量适中,接种后的不同时间段内取样,病毒的滴度都能在 10⁸ TCID₅₀/mL 以上;微载体为 8 g/L 时,取样显微镜下观察出现大量的空球,极少数细胞长在载体上,培养至 72 h 也没有长满致密球体,不满足接种条件。

2.5 病毒最佳培养时间试验 Marc-145 细胞在生物反应器内培养至致密球体后进行接种(MOI=0.05),在不同时间段内进行取样观察细胞病变情况并进行病毒的滴定及 TCID₅₀ 的测定,所做的三个批次是基于不同条件(草原绿野血清+MEM培养基、金源康血清+MEM培养基、金源康血清+DMEM培养基)进行试验,TCID₅₀ 最高者为最佳病毒培养时间,结果见图4。在不同条件下生物反应器培养 PRRSV,其最佳病毒培养时间确定为 27~36 h。

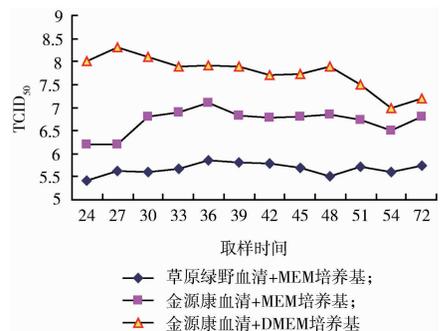


图4 不同培养条件及不同取样时间的 TCID₅₀ 分布图

3 讨论

细胞的微载体技术是动物细胞培养中最先进的技术之一,为细胞的大量生产提供了可能,即从

小培养体积得到高产量的细胞。本研究 10 ~ 20、20 ~ 30 和 30 ~ 40 cells/球的细胞接种密度对细胞在微载体上生长的影响,结果表明细胞接种量少则会出现大量空球,也会影响病毒的滴度,细胞接种量过高,培养至 72 h 出现脱落现象以及伴有大量细胞碎片,对细胞有毒性作用,从而降低细胞活性,导致病毒滴度不高于 $10^{7.75}$ TCID₅₀/mL。在研究 3、5 和 8 g/L 的最佳微载体量试验时,消化所得到的细胞密度不能完全相同,我们只能让细胞接种密度保持在一个相对一致的范围内进行试验,对所得结论的影响不大。使用的生物反应器为半自动系统,营养液与维持液的更换需要人为控制;如果换成全自动生物反应器能够替换细胞生长耗尽的营养物质并能去除抑制细胞生长产生的代谢废物,那样细胞的产量也能继续扩大,一定程度上微载体培养的病毒滴度还能有很大的提升空间^[9]。国外疫苗生产企业的微载体培养技术水平已经达到能够连续放大至 6 t 反应器自动控制的规模(企业交流信息),生产效能呈几何级数放大,而国内微载体技术应用于人用或兽用疫苗的生产才刚刚起步,培养工艺、培养规模均远远落后于国外。我国学者冯磊等^[10]所用的 PRRSV 为国家兽用生物制品工程技术研究中心保藏毒种,利用 3 g/L 的微载体量以及用不同培养方式对 Marc - 145 细胞悬浮培养 PRRSV 工艺进行优化,病毒的效价能达到 $10^{7.92}$ TCID₅₀/mL。区别在于我们对微载体的量做进一步摸索,即分 3 个梯度进行摸索,结果微载体的量在 5 g/L 细胞状态最好,滴定结果均能达到 10^8 TCID₅₀/mL 以上,最高达到 $10^{8.5}$ TCID₅₀/mL。目前我国微载体培养技术还处于起步阶段,未来必将跻身于我国动物疫苗生产的主流技术之中。

本研究摸索建立了 PRRSV TJM 株在生物反应器微载体培养 Marc - 145 细胞上的增殖条件(血清和培养基、细胞接种量、微载体用量及病毒培养时间等),为建立规模化猪繁殖与呼吸综合征疫苗生物反应器工艺奠定了基础。

参考文献:

- [1] Meulenber J J. PRRSV, the virus[J]. *Vet Res*, 2000, 31(1): 11 - 21.
- [2] Keffaber K K. Reproductive failure of unknown etiology[J]. *Am Assoc Swine Pract Newsletter*, 1989, (1): 1 - 10.
- [3] Terpstra C, Wensvoort G, Pol J M A. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus; Koch's postulates fulfilled[J]. *Vet Q*, 1991, (13): 131 - 136.
- [4] Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M A, *et al.* Mystery swine disease in the Netherlands; the isolation of Lelystad virus[J]. *Vet Q*, 1991, (13): 121 - 130.
- [5] 郭宝清,陈章水,刘文兴,等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离猪繁殖与呼吸综合征病毒的研究[J]. *中国畜禽传染病*, 1996, 2(2): 1 - 5.
- [6] Yan - Jun Zhou, Hai Yu, Zhi - Jun Tian, *et al.* Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in China from 2006 to 2008 [J]. *Virus Research*, 2009, (144): 136 - 144.
- [7] Shi M, Holmes E C, Brar M S, *et al.* Recombination is associated with an outbreak of novel highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in China[J]. *J Virol*, 2013, 87: 10904 - 10907.
- [8] Zhou Z, Ni J, Cao Z, *et al.* The epidemic status and genetic diversity of 14 highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP - PRRSV) isolate from China in 2009[J]. *Vet Microbiol*, 2011, 150: 257 - 269.
- [9] 穆光慧,李嘉爱,齐冬梅. 猪繁殖与呼吸综合征病毒在 Marc - 145 细胞微载体上培养条件的研究[J]. *广东畜牧兽医科技*, 2010, 35(4): 37 - 40.
- [10] 冯磊,褚轩,吴培培,等. Marc - 145 细胞微载体悬浮培养及 PRRSV 增殖工艺的建立[J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(3): 598 - 603.

(编辑:李文平)