doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.01.01

重组禽流感病毒 H5 亚型 Re-7 株在 MDCK 细胞上增殖条件的研究

陈　宏[1],王　博[1],赵海源[1*],李金祥[2*],赵　博[1],李　莉[1],王玉红[1],崔　凯[1],朱长动[1]

(1.吉林冠界生物技术有限公司,吉林梅河口 135000;2. 中国农业科学院,北京 100081)

[收稿日期] 2017-12-04　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280 (2018) 01-0001-06　[中图分类号]S852.65

[摘　要]　为了探索重组禽流感病毒 H5 亚型 Re-7 株在 MDCK 细胞上的增值规律,确定最适的接毒量与最佳收获时间。将重组禽流感病毒 H5 亚型 Re-7 株接种至 100 L 生物反应器全悬浮无血清培养的 MDCK 细胞进行增殖试验,检测不同病毒感染量,接种后不同时间病毒的 HA、$TCID_{50}$ 以及 EID_{50}。根据确定的最佳增值条件将病毒接种到 MDCK 细胞中进行大规模增殖培养。确定最适接毒量 MOI 为 10^{-2},最佳收获时间为 60 h。在 100 L 生物反应器中进行重复验证,获得稳定的试验结果,病毒 HA 达到 1∶1024,每 1 mL 病毒含量达到 $10^{7.33}TCID_{50}$,每 0.1 mL 病毒含量达到 $10^{6.83}EID_{50}$。研究为重组禽流感病毒 H5 亚型 Re-7 株的全悬浮规模化生产提供了相对稳定的参数指标。

[关键词]　重组禽流感病毒;MDCK 细胞;全悬浮培养;接毒量;收获时间

Research on Multiplication of H5 Subtype Re-7 Recombinant Avian Influenza Virus in MDCK Cell Culture System

CHEN Hong[1], WANG Bo[1], ZHAO Hai-yuan[1*], LI Jing-xiang[2*], ZHAO Bo[1], LI Li[1], WANG Yu-hong[1], CUI Kai[1], ZHU Chang-dong[1]

(1.*Jilin guanjie biotechnology co. LTD*, *Meihekou*, *Jilin* 135000, *China*; 2.*Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100081, *China*)

Corresponding author: *ZHAO Hai-yuan*, *E-mail*: *zhy86626@163.com*; *LI Jing-xiang*, *E-mail*: *lijinxiang@caas.cn*

Abstract: In order to explore the value increment law of the H5 subtype Re-7 strains in MDCK cells, the optimal dose and the optimal harvest time were determined. To restructure the H5 virus subtype Re-7 strains inoculation to 100 L of bioreactor full suspension MDCK cells proliferation of serum-free culture experiment, testing several different virus infection, virus HA, $TCID_{50}$ and different time after inoculation EID_{50}. The virus was inoculated into MDCK cells with the best value added conditions. Determine the optimum dose MOI for 10^{-2}, and the best harvest time is 60 h. In the 100 L bioreactor, repeated verification was conducted to obtain stable test results. The virus HA reached 1∶1024, and the content of every 1mL virus reached $10^{7.33}$ $TCID_{50}$, and the content of every 0.1 mL virus reached $10^{6.83}$ EID_{50}. This study provides a relatively stable parameter index for the recombinant avian

作者简介:陈 宏,从事兽用疫苗的生产研发工作。

通讯作者:赵海源,E-mail:zhy86626@163.com;李金祥,E-mail:lijinxiang@caas.cn

influenza virus H5 subtype Re-7.

Key words: recombinant avian influenza virus; Madin-Darbin canine kidney (MDCK); suspension culture; inoculum concentration; harvest time

在禽流感病毒中,部分 H5 和 H7 亚型毒株可引起高致病性禽流感。我国是世界上禽类养殖量最大的国家,也是高致病性禽流感的爆发区,2015 年中国大陆 10 个省发生 16 起 H5 高致病性禽流感疫情,造成的直接经济损失高达数十亿元[1]。这就需要大量安全、高效、低成本的禽流感疫苗。目前市场上大部分疫苗仍为鸡胚制备[2],这种疫苗生产需要消耗大量的 SPF 鸡胚,且劳动强度大、产量不稳定,不利于应对大规模的禽流感疫情爆发。与传统鸡胚生产方法相比,动物细胞培养生产禽流感疫苗具有很多优势,如抗原匹配性好,可以进行大规模生产和缩短生产周期,自动化控制程度高,批间差异小等。通过我们的研究证明,禽流感病毒在 MDCK 传代细胞上具有良好的适应性,用其培养的禽流感病毒获得的病毒滴度较高。试验对 H5 亚型 Re-7 株病毒在 MDCK 细胞中的增殖条件进行探索,以期筛选出最适接毒量和最佳收获时间,为动物细胞生产禽流感疫苗提供了相对稳定的参数指标。

1　材料与方法

1.1　细胞和病毒　MDCK 悬浮细胞系是由吉林冠界生物技术公司自行驯化;重组禽流感病毒 H5 亚型 Re-7 株购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

1.2　主要试剂及耗材　选用培养基为国产无血清全悬浮细胞培养基;1% 鸡红细胞悬液由吉林冠界生物技术公司自行制备;检验用 SPF 鸡胚购自梅里亚公司。

1.3　方法

1.3.1　最适接毒量 MOI 以及最佳收毒时间的确定　将重组禽流感病毒 H5 亚型 Re-7 株种毒以不同的 MOI(10^{-3}、10^{-2}、10^{-1})分别接种于 3 台 100 L 生物反应器(分别命名为 1#、2#、3#反应器)相同数量的细胞中,从接毒后的 24 h 开始,每隔 12 h 取样测其毒价(HA 滴度、$TCID_{50}$以及 EID_{50})直至收毒并测其毒价(HA 滴度、$TCID_{50}$以及 EID_{50})。

1.3.2　禽流感病毒在反应器中的接种及增殖过程　接种前将 3 台 100 L 反应器的细胞密度都控制在 4×10^6cells/mL 左右,细胞活力控制在 95%左右,然后通过无菌的方法将 MOI 为 10^{-3}、10^{-2}、10^{-1}的种毒分别接种至 1#、2#、3#反应器的细胞悬液中。从接毒后 24 h 开始,每隔 12 h 取样监测活细胞数以及细胞活率,并使用显微镜观察细胞病变情况。

2　结　果

2.1　最适接毒量 MOI 以及最佳收获时间

2.1.1　不同的感染复数(最适接毒量)对病毒增殖的影响　当种毒接入量 MOI 为 10^{-3}时,由于病毒感染量低而使增殖速度降低,无法达到较高的血凝价和毒价。当种毒接入量 MOI 为 10^{-1}时,由于病毒的感染量过高而使感染过快,造成细胞在感染的初期过早的死亡,此时也无法获得较高的血凝价和毒价。而当种毒接入量 MOI 为 10^{-2}时病毒的增殖比较稳定,病毒的血凝价和毒价较高,血凝价最高值为 1∶1024[3],每 1 mL 病毒含量最高达到 $10^{7.33}$ $TCID_{50}$,每 0.1 mL 病毒含量最高达到 $10^{6.83}EID_{50}$[4],结果见表 1。

2.2.2　最佳收获时间的确定　通过对不同感染复数对病毒增殖的研究,确定最适接毒量 MOI 为 10^{-2},在此接毒量的条件下对最佳收获时间进行试验分析,当接毒后 60 h 血凝价达到 1∶1024,每 1 mL病毒含量最高达到 $10^{7.33}TCID_{50}$,每 0.1 mL 病毒含量最高达到 $10^{6.83}EID_{50}$,并且在接毒后 72 h 毒价稳定在此水平无明显变化,说明在接毒后 60 h 为最佳收获时间,结果见图 1。

表 1　不同的 MOI 对病毒增殖的影响(HA、$TCID_{50}$/mL;EID_{50}/0.1mL)

Tab 1　Effects of different MOI on viral proliferation(HA、$TCID_{50}$/mL, EID_{50}/0.1mL)

时间	10^{-3}			10^{-2}			10^{-1}		
	HA	$TCID_{50}$	EID_{50}	HA	$TCID_{50}$	EID_{50}	HA	$TCID_{50}$	EID_{50}
24 h	1∶64	$10^{6.0}$	$10^{5.5}$	1∶256	$10^{6.5}$	$10^{5.5}$	1∶256	$10^{6.5}$	$10^{6.17}$
36 h	1∶128	$10^{6.86}$	$10^{5.83}$	1∶512	$10^{6.67}$	$10^{6.5}$	1∶512	$10^{7.0}$	$10^{6.5}$
48 h	1∶256	$10^{7.0}$	$10^{6.17}$	1∶512	$10^{7.33}$	$10^{6.5}$	1∶512	$10^{7.0}$	$10^{6.5}$
60 h	1∶512	$10^{7.0}$	$10^{6.83}$	1∶1024	$10^{7.5}$	$10^{6.83}$	1∶256	$10^{7.0}$	$10^{6.17}$
72 h	1∶512	$10^{6.5}$	$10^{6.625}$	1∶1024	$10^{7.5}$	$10^{6.83}$	1∶256	$10^{7.0}$	$10^{6.17}$

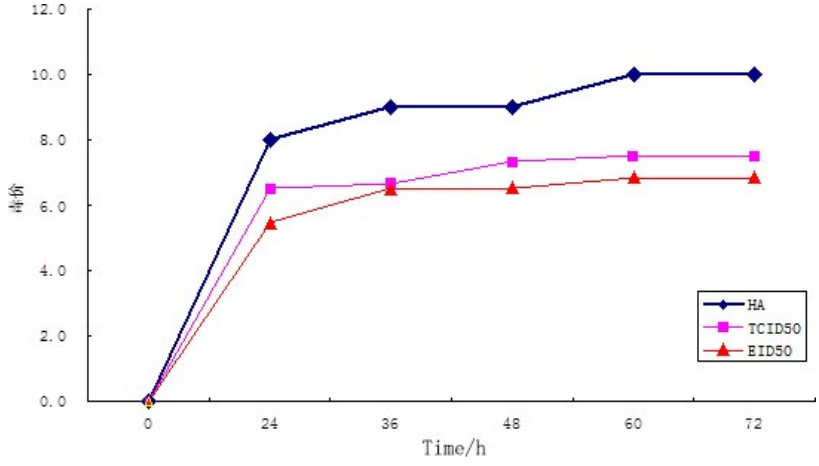


图 1　最佳收获时间曲线

Fig 1　The best harvest time curve

2.2　禽流感病毒在反应器中的接种及增殖过程

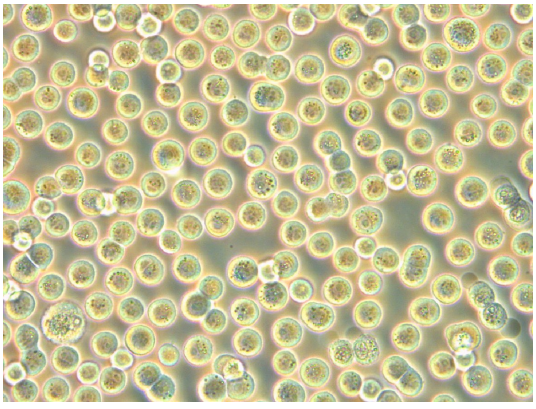
2.2.1　*接毒后的活细胞数以及细胞活力*　接毒后随着时间的推移,病毒的感染逐步增强,活细胞数会随之减少,细胞活率逐渐下降。当种毒接入量 MOI 为 10^{-3}时,由于病毒感染量低细胞活率下降较慢,病毒的增殖会受影响。当种毒接入量 MOI 为 10^{-1}时,由于病毒的感染量过高而使感染过快造成细胞快速死亡,细胞活率下降较快,病毒的增殖也会受到影响。而当种毒接入量 MOI 为 10^{-2}时病毒的增殖比较稳定,细胞活率下降的趋势也较为正常,后期收毒时也能保持较高的毒价[5],结果见表 2。

表 2　不同接毒量对接毒后的活细胞数和细胞活力的影响(cells/mL;%)

Tab 2　Effects of the number of living cells and cell viability of different venomous antivirus (cells/mL, %)

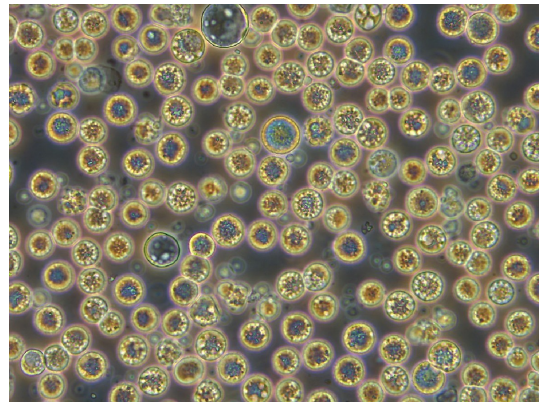
时间	10^{-3}		10^{-2}		10^{-1}	
	活细胞数	细胞活力	活细胞数	细胞活力	活细胞数	细胞活力
0 h	3.94×10^{6}	94.8%	4.06×10^{6}	95.7%	4.14×10^{6}	95.9%
24 h	4.39×10^{6}	85.2%	4.43×10^{6}	89.7%	3.90×10^{6}	88.1%
36 h	4.69×10^{6}	84.5%	4.31×10^{6}	83.6%	3.85×10^{6}	77.1%
48 h	4.85×10^{6}	77.9%	3.30×10^{6}	75.6%	3.60×10^{6}	69.4%
60 h	4.90×10^{6}	70.6%	3.31×10^{6}	73.5%	3.63×10^{6}	65.8%
72 h	3.94×10^{6}	70.3%	2.96×10^{6}	64.1%	2.40×10^{6}	53.0%

2.2.2　接毒后病毒的增殖以及在细胞上的病变情况　当种毒接入量 MOI 为 10^{-2}时病毒的增殖比较稳定,细胞活率下降的趋势也较为正常,通过接毒后取样镜检观察细胞病变情况可以看出,24 h 细胞病变开始出现,有部分细胞表面变得粗糙并伴有裂痕。48 h 病变十分明显,部分细胞破裂,说明此时病毒出芽释放比较明显。72 h 细胞破碎严重,病毒出芽释放相对完全。结合接毒后 48 h~72 h 的测毒情况,设定在接毒后 60 h 的收获时间是合理的[6],结果见图 2。



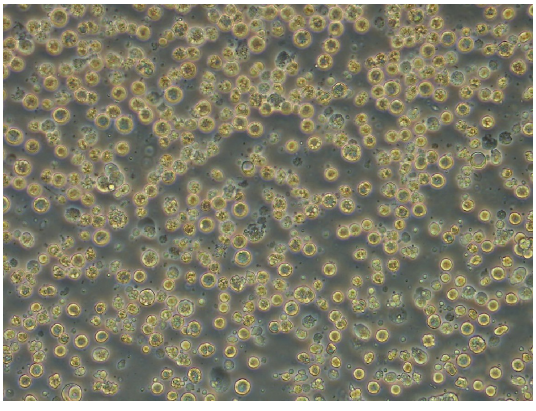
A. 健康细胞(400×)

A. healthy cells (400×)



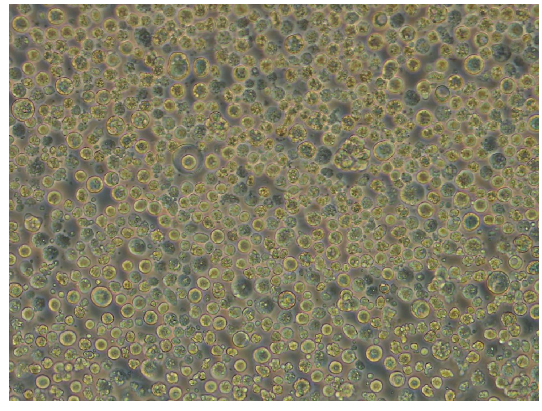
B. 24h 细胞病变(400×)

B. 24h cell lesion (400×)



C. 48h 细胞病变(200×)

C. 48h cell lesion (200×)



D. 72h 细胞病变(200×)

D. 72h cell lesion (200×)

图 2　接毒后细胞的病变情况

Fig 2　The pathological changes of cells after being infected

3　讨　论

利用动物传代细胞生产禽流感疫苗与使用鸡胚苗相比,在产量及疫苗的稳定性上都有较为明显的优势,也在很大程度上降低了由于流感病毒在鸡胚上连续传代而引起 HA 基因发生突变的几率[7],使免疫效果更为可靠。随着 MDCK 细胞生产禽流感疫苗推向市场,此疫苗的可靠性也在全国范围内得到了更多的认可。

本试验中重组禽流感病毒 H5 亚型 Re-7 株接种 MDCK 细胞,选取了三种不同的接毒量并在接毒后不同时间取样监测毒价,从而最终确定最适接毒量和最佳收毒时间。在病毒感染复数 MOI 为 10^{-2}

时收获时毒价最高,适当的病毒接种量可以更好的实现病毒的增殖[8]。当接种量过低和细胞数量不匹配,病毒需要经过多次循环复制,达到血凝滴度的峰值的时间延长,病毒生产过程减慢,最终的毒价也不高[9]。当病毒接种量过多时,细胞在病毒的感染下很快死亡,同时会产生大量不具有感染性的不完全病毒颗粒,限制病毒的多循环感染[10]。

收毒时间对于病毒培养过程来说也是一个关键性的参数,试验在确定接毒量的同时对于收毒时间也进行了研究,在接毒后 60 h 毒价达到峰值,并且在接毒后 72 h 毒价仍稳定在此峰值水平,没有明显的升高或降低,出于对整个工艺流程中时间成本的考虑,收获的最佳时间应为接毒后 60 h 左右。

利用生物反应器培养动物细胞进行禽流感疫苗生产的技术已日趋成熟,此种技术在国内外动保行业正在被广泛推广[11]。目前我们的生物反应器规模化培养技术水平已经达到能够放大至 6000 L 自动控制的规模。试验对重组禽流感病毒 H5 亚型 Re-7 株的最适接毒量和最佳收毒时间进行了研究,确定最适接毒量 MOI 为 10^{-2}、最佳收获时间为 60 h,在 100 L 生物反应器中重复验证,获得稳定的试验结果,病毒血凝价达到 1∶1024,每 1 mL 病毒含量达到 $10^{7.33}$ $TCID_{50}$,每 0.1 mL 病毒含量达到 $10^{6.83}$ EID_{50}。研究为禽流感疫苗的生物反应器的规模化生产提供了可靠的理论依据。

参考文献:

[1] 王念晨,曲楠楠,欧阳国文,等.当前我国 H5 亚型高致病性禽流感流行情况分析[J].中国动物传染病学报,2016,24(4):77-81.

Wang C C, Qu N N, Ouyang G W, *et al*. The Current situation of H5 subtype highly pathogenic avian influenza in China [J]. Chinese Journal of Veterinary Parasitology, 2014, 24 (4) : 77-81.

[2] 施建忠,田国彬,李雁冰,等.重组高繁殖力疫苗株 H5N2(H5/PR8)病毒的制备和鉴定[J].中国预防兽医学报,2005,27(6):530-534.

Shi J Z,Tian G B,Li Y B, *et al*. Generation and identification of a high-growth reassortant H5/PR8 influenza A virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2005,27(6):530-534.

[3] 牛学锋,罗琴芳,郭宵峰.H9N2 亚型流感病毒细胞适应株细胞致病性和 HA、NA 基因序列分析[J].武汉大学学报,2005,51(S2):245-248.

Ni X F,Luo Q F,Guo X F. The pathogenicity of H9N2 subtype influenza virus cell adaptable strain cell and HA, NA gene sequence analysis [J]. Journal of Wuhan University: Natural Science Edition, 2005,51(S2):245-248.

[4] 刘 鹏,李佳林,马 超,等.H1N1 流感病毒在微载体培养 MDCK 细胞上增殖的研究[J].微生物学免疫学进展,2013,41(1):12-14.

Liu P,Li J L,Ma C, *et al*. Research on multiplication of H1N1 subtype influenza virus in large-scale micro-carrier-based MDCK cells culture system, [J]. Progress In Microbiology and Immunology, 2013,41(1):12-14.

[5] 史爱华,姜北宇,沈 佳.3 株 H9 亚型禽流感病毒在 3 种传代细胞系上增殖效果研究[J].黑龙江畜牧兽医,2013,11:111-113.

Shi A H,Jiang B Y,Shen J. Research on multiplication of 3 H9 subtype avian influenza viruses on 3 subcellular lines [J]. Heilongjiang Animal Science And veterinary Medicine, 2013,11:111-113.

[6] 吴培培,唐应华,褚 轩,等.适应 H9 亚型禽流感病毒增殖的 MDCK 悬浮细胞株的驯化及生物学特性[J].江苏农业学报,2016,32(6):1377-1383.

Wu P P,Tang Y H,Chu X, *et al*. Domestication of MDCK suspension cell lines for the H9 subtype of avian influenza virus proliferation and its biological characteristics evaluation[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences.

[7] 杨 涛,刘 明,张 云,等.重组 H5N3 禽流感疫苗株在 MDCK 细胞中大规模增殖条件研究[J].中国预防兽医学报,2007,29(3):199-203.

Yang T, Liu M, Zhang Y, *et al*. Multiplication of the recombinant H5N3 influenza vaccine candidate strain in large-scale MDCK cell culture systems [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29 (3) : 199-203.

[8] 张俊君,张燕丽,秦 龙,等.利用狗肾传代细胞分离流感病毒及分离条件的研究[J].实用医学杂志,2014,30(5):687-690.

Zhang J J, Zhang Y L, Qin L, *et al*. Study on isolating iufluenza viruses from MDCK cell [J]. Journal of practical medicine, 2014, 30 (5): 687-690.

[9] 余钧池,陈柳军,等.流感病毒在 MDCK 细胞中培养的条件优化[J].国际检验医学杂志,2014,35(1):92-94.

Yu J C, Chen L J, *et al*. Optimization of conditions of influenza virus in MDCK cells [J]. International journal of test medicine, 2014, 35 (1): 92-94.

[10] 孙德君,梁婉楠,丁国杰,等.H5N1 亚型禽流感病毒在 MDCK 细胞中增殖条件的研究[J].中国动物保健,2014,16(3):17-19.

Sun D J, Liang W W, Ding G J, *et al*. Research on Multiplication of H5N1 Subtype Avian Influenza Virus in MDCK Cell Culture System[J]. China animal health, 2014, 16 (3): 17-19.

[11] 李 群,钱 钟,范 娟,等.动物细胞悬浮培养技术在兽用疫苗生产领域中的应用[J].中国畜牧兽医,2013,40(6):236-239.

Li Q,Qian Z,Fan J, *et al*. Application of animal cell suspension culture in the field of veterinary vaccine production [J]. Chinese animal husbandry and veterinary medicine, 2013, 40 (6): 236-239.

(编 辑:陈 希)