

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2019.09.03

PK15 细胞的无血清全悬浮驯化研究

刘天伦¹, 郎洪彬¹, 孔 飒²

(1. 北京民海生物科技有限公司, 北京 102609; 2. 北京大北农科技集团股份有限公司, 北京 102609)

[收稿日期] 2019-07-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 09-0012-07 [中图分类号] Q813.11

[摘要] 目前 PK15 细胞主要用于生产猪圆环病毒 2 型, 传统的培养工艺为滚瓶系统或微载体系统, 该两种培养系统都存在各自的劣势。驯化一株全悬浮的 PK15 细胞可推进工艺的进一步升级, 降低成本的同时也简化了培养工艺且更易于产业化。经贴壁降血清培养、低血清悬浮优化传代、无血清悬浮传代培养, 对一株贴壁的 PK15 细胞进行了无血清的全悬浮驯化。传代 23 次后, 该株细胞无血清全悬浮培养初始密度为 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$, 在 72 h 密度可增殖到 $4.0 \times 10^6/\text{mL}$ 左右, 形态良好, 倍增时间稳定, 且细胞活率达到 95% 以上, 命名为 PK15-S, 为大规模培养 PK15 细胞提供了理论依据。

[关键词] PK15 细胞; 细胞驯化; 无血清; 全悬浮;

Domestication of a PK15 Cell Line to Suspension Culture by Serum-Free Medium

LIU Tian-lun¹, LANG Hong-bin¹, KONG Sa²

(1. Beijing Minhai Biological Technology Co., Ltd, Beijing 102609, China;

2. Beijing Dabeinong Technology Group Co., Ltd, Beijing 102609, China)

Abstract: Currently, PK15 cells are mainly used to culture porcine circovirus type 2. The traditional method for the cultivation of PCV-2 was using the rolling bottle system or micro carrier system. However, both of those systems have their own disadvantages. Hence, domesticate a suspension PK15 cell line can promote the upgrading of the traditional methods, and also can reduce costs. Meanwhile, it can also simplify the culture process to be easier to industrialization. In this study, an adherent PK15 cell line was domesticated as a suspension cell line in serum-free medium. After 23 passages, the density of the domesticated cell line could increase from the initial density ($0.5 \times 10^6/\text{mL}$) to $4.0 \times 10^6/\text{mL}$ in 72 h. Furthermore, the cell morphology is good, the cell proliferation time is stable, and the cell survival rate is above 95%. In conclusion, this study provides a theoretical basis for large-scale culture of PK15 cells.

Key words: PK15 cells; domestication; serum free; suspension

猪圆环病毒病是由猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 引起的病毒性传染病。研究表明,PCV2 感染除了造成断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS), 同时还与猪呼吸道综合症 (PRDC)、猪皮炎和肾病综合征 (PNDS)、先天性震颤、繁殖障碍、胎儿心肌炎和扩张性坏死性肺炎等猪圆环病毒病 (PCDAD) 密切相关^[1], 给养猪业造成巨大损失。王贵华等^[2] 已经用 PK15 细胞成功分离了猪圆环病毒 2 型。PK15 为猪肾上皮细胞, 对猪圆环病毒 (PCV)、猪细小病毒 (PPV) 和猪瘟病毒 (CSFV) 等多种病毒比较敏感^[3]。PK15 细胞现已用于 PCV2 的生产, 但由于 PCV2 体外增殖能力较差, 致使 PCV2 效价不高。因此, PCV2 的滴度问题一直是 PCV2 培养过程中的关键^[4]。生物反应器大规模培养技术是提升细胞密度的核心技术, 其中微载体技术是目前较为成熟的技术之一。何锡忠等^[5] 利用微载体技术培养 PK15 细胞生产猪圆环病毒 2 型, 任丽^[6] 用生物反应器对 PCV2 的微载体悬浮培养进行了系统研究。但由于微载体培养系统不适合于对剪切力较敏感的细胞, 且存在微载体价格昂贵, 重复利用效果不好, 细胞制备需求量过大等缺点, 驯化一株可适应大规模生物反应器培养的全悬浮 PK15 细胞可推进工艺的进一步升级。全悬浮细胞培养具有细胞密度大、放大倍数大、传代方便等优势, 但是对搅拌和气体的剪切力非常敏感, 对反应器的结构有较高的要求。无血清培养是通过用已知的人源或者动物源的蛋白或生长因子、激素来代替动物血清的一种培养方式, 可减少后期纯化工作的难度, 提高产品质量^[7]。本研究对一株贴壁的 PK15 进行了无血清的全悬浮驯化, 以期大规模培养猪圆环 2 型病毒提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和毒株 PK15 细胞 (猪圆环病毒 1 型阴性、猪肺炎支原体阴性) 由大北农动物医学研究中心保存。

1.1.2 主要试剂和耗材 DMEM - F12 (12500 - 096)、0.25% 胰蛋白酶 (27250 - 018)、optiPRO™ - sfm

(12309019) 购自 Gibco 公司, 无血清悬浮培养基 PK15 - H (M20317) 购自上海源培生物有限公司, 新生牛血清 (04 - 102 - 1A) 购自 BI 公司, 台盼蓝 (T8154) 购自美国 Sigma 公司, 细胞方瓶、摇瓶、96 孔板购自美国康宁公司。

1.1.3 主要仪器和设备 CO₂ 培养箱购自 Thermo 公司, 轨道式振荡器购自杭州奥盛仪器有限公司, 倒置显微镜购自 Olympus 公司, Countstar 细胞计数仪购自上海睿钰生物科技有限公司, SBA 生物传感器购自山东省科学院生物研究所, 低速冷冻离心机购自美国 Beckman 公司。

1.2 方法

1.2.1 PK15 细胞无血清全悬浮驯化

1.2.1.1 PK15 贴壁细胞降血清 复苏一支 PK15 细胞, 用含 8% 新生牛血清 (NBS) 的 DMEM - F12 按照常规传代方法传代, 在 75 cm² 方瓶中传 3 代至细胞密度稳定后, 按初始密度 0.25 × 10⁶/mL 分别接种至 2 个 75 cm² 方瓶中, 其中一瓶用含有 1/4 体积的 optiPRO™ - sfm 和 3/4 体积的加入 8% NBS 的 DMEM - F12 的混合培养基培养, 用于降血清; 另外一瓶用全体积的加入 8% NBS 的 DMEM - F12 培养基培养, 作对照细胞, 培养体积均为 30 mL。

表 1 降血清方法和代次

Tab 1 Method and Generation of reduced serum

代次	实验组	对照组
F1	1/4optiPRO™ - sfm 和 3/4DMEM - F12	全 DMEM - F12
F2	1/2optiPRO™ - sfm 和 1/2DMEM - F12	全 DMEM - F12
F3	3/4optiPRO™ - sfm 和 1/4DMEM - F12	全 DMEM - F12
F4	9/10optiPRO™ - sfm 和 1/10DMEM - F12	全 DMEM - F12
F5	全 optiPRO™ - sfm	全 DMEM - F12

1.2.1.2 PK15 贴壁细胞低血清的悬浮驯化 细胞适应低血清贴壁培养至密度稳定 3 代后, 消化后将细胞悬液离心去除胰酶, 移至 125 mL 摇瓶中。培养体积根据初始密度一般在 20 ~ 40 mL 之间, 初始密度 1.0 × 10⁶/mL, 培养基比例由 1/2optiPRO™ - sfm 和 1/2 PK15 - H 过渡到 1/3optiPRO™ - sfm 和 2/3PK15 - H 再过渡到全 PK15 - H, 血清含量为

2%。传代时间根据细胞密度决定,一般保证传代前细胞密度大于 $2.0 \times 10^6/\text{mL}$,继续消化连续传代,至细胞密度稳定。

1.2.1.3 PK15 悬浮无血清的驯化 含 2% NBS 的全悬浮 PK15 细胞传代时,成团现象较为严重,需去除大团并连续消化传代。降血清由 2% 降到 1%,再由 1% 降至 0.5%,再降至无血清,降血清过程中细胞密度稳定 2~3 代后方可进行下一步传代。传代时间根据细胞密度而定,传代前密度一般大于 $2.0 \times 10^6/\text{mL}$,传代后初始密度一般在 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ 左右。

1.2.2 PK15-S 增值的稳定性 取驯化后细胞进行初始密度为 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$ 的连续传代,每 24 h 取样观察计数,72 h 开始传代。细胞悬液离心后取上清液,按照 SBA 生物传感器操作规程,10 倍稀释上清液后,测定糖和乳酸含量,并记录。

1.2.3 细胞密度测定方法 采用台盼蓝(TB)染色法计算细胞密度,具体操作如下:先用无菌 PBS 稀释台盼蓝,稀释比例 1:1,再用稀释过的台盼蓝稀

释细胞悬液,稀释比例 1:1,最终稀释后,吹打均匀,取 40 μL 加入细胞计数板中,放入 Countstar 细胞计数器中计数,一个样品取 3 个视野,取平均值,即为细胞密度。

1.2.4 PK15-S 倍增时间的测定 取驯化传代稳定的细胞,每天取样计数,绘制细胞生长曲线,计算细胞倍增时间。取驯化传代稳定细胞峰值前一天的细胞计数(Y)、接种细胞数(X)及生长时间(T)计算细胞倍增时间 Δt ,计算公式如下:

$$\Delta t = T/A \quad A = \log 2Y/X$$

2 结果与分析

2.1 无血清悬浮 PK15 细胞生长情况分析

2.1.1 PK15 贴壁细胞降血清 逐步降血清与高血清对照最高密度的对比结果见表 2。在含有 9/10 体积的 optiPROTM-sfm 和 1/10 体积的加入 8% NBS 的 DMEM-F12 的混合培养基时细胞密度也高于高血清密度,即 0.8% 血清量。当全用 optiPROTM-sfm 养时,细胞密度低于高血清的密度,由此可初步将驯化前期血清量控制在 1%~2%。

表 2 PK15 贴壁细胞降血清密度情况

Tab 2 Reduction of serum density by PK15 adherent cells

代次	实验组	时间	密度	对照组	时间	密度
F1	1/4optiPRO TM -sfm 和 3/4DMEM-F12	0 h	0.25	全 DMEM-F12	0 h	0.25
		48 h	2.85		48 h	2.27
F2	1/2optiPRO TM -sfm 和 1/2DMEM-F12	0 h	0.25	全 DMEM-F12	0 h	0.25
		48 h	2.95		48 h	2.91
F3	3/4optiPRO TM -sfm 和 1/4DMEM-F12	0 h	0.25	全 DMEM-F12	0 h	0.25
		72 h	3.92		72 h	3.7
F4	9/10optiPRO TM -sfm 和 1/10DMEM-F12	0 h	0.25	全 DMEM-F12	0 h	0.25
		48 h	2.28		48 h	2.17
F5	全 optiPRO TM -sfm	0 h	0.25	全 DMEM-F12	0 h	0.25
		48 h	2.5		48 h	3.4

48 h 或 72 h 取样为消化后体积,细胞悬液为 10 mL;表格中 DMEM-F12 均加入 8% NBS

2.1.2 PK15 贴壁低血清的悬浮驯化 由于细胞直接由贴壁状态转至全悬浮状态,细胞成团现象较为严重,以致于每次传代必须经过消化才能传代,传代需经过离心去上清、胰酶震荡消化、离心去胰酶、培养基吹打均匀继续培养 4 个步骤,密度情况

见表 3。团块较大时,可配制高浓度胰酶进行消化,期间操作时间较长且步骤多,对细胞造成损伤较为严重并且易污染,前期细胞活率不是很高但可以接受,后期转为正常。

表 3 PK15 贴壁低血清的悬浮驯化密度情况

Tab 3 Suspension acclimation density of PK15 adherent low serum

2% NBS 混料实验组	F1			F2			F3		
	时间	密度	活率	时间	密度	活率	时间	密度	活率
1/2optiPRO™ - sfm 和 1/2PK15 - H	0 h	1	/	0 h	1	/	0 h	1	/
	48 h	4.7	93%	48 h	3.68	93%	48 h	3.76	97%
1/3optiPRO™ - sfm 和 2/3PK15 - H	0 h	1	/	0 h	1	/	0 h	1	/
	48 h	3.72	98%	72 h	2.8	96%	72 h	4.73	98%
全 PK15 - H	0 h	1	/	0 h	1	/	0 h	1	/
	72 h	5.75	97%	72 h	3.31	96%	72 h	3.79	96%

细胞经过 9 个代次, 3 种组合培养基的过渡传代, 细胞涨势较好, 但存在较大团块, 消化后分散

均匀(图 1), 且活率保持在 95% 以上, 需进一步降血清驯化。

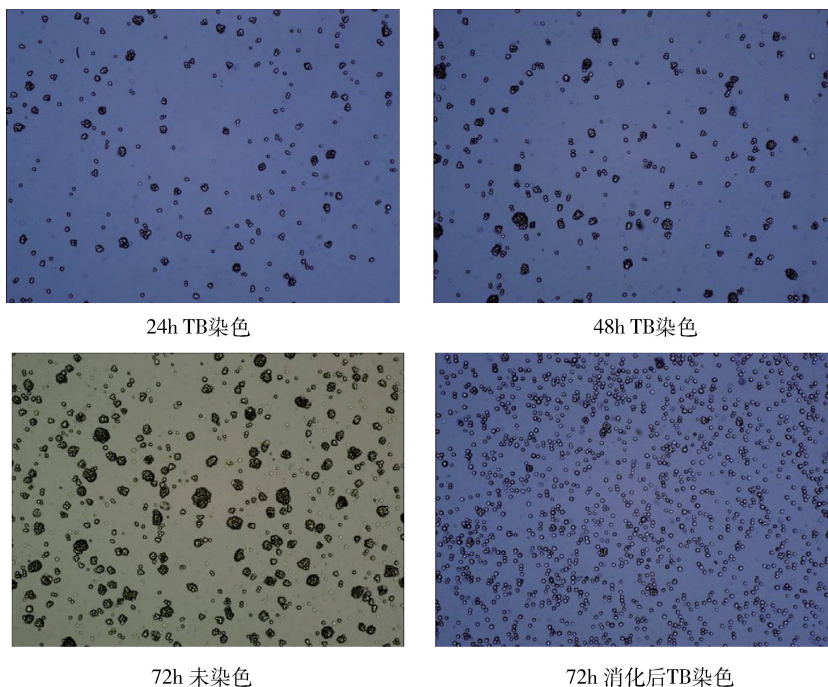


图 1 PK15 贴壁低血清的悬浮驯化细胞状态

Fig 1 Suspension domesticated cell state of PK15 adherent low serum

2.1.3 PK15 悬浮无血清的驯化 血清的存在也是细胞成团的主要因素之一, 血清浓度由 2% 降到 1%, 再由 1% 降至 0.5%, 再降至无血清, 细胞密度波动较为明显, 消化后计数, 活率都能有 95% 以上, 若细胞团块过大还仍用合适浓度的胰酶进行消化后再计数, 否则计数误差会很大。

PK15 悬浮细胞经过 9 个代次的降血清实验(表 4), 细胞在无血清条件下轮廓清晰, 分散均匀, 大小均一性良好(图 2), 密度稳定。该株贴壁 PK15 细胞, 从复苏到最终驯化成全悬浮 PK15 - S 细胞, 经过 3 种培养方法的过渡(表 5), 共 23 次传代(图 3、图 4), 细胞状态良好, 活率较高, 可冻存保种。

表 4 PK15 悬浮无血清的驯化密度情况

Tab 4 Domestication density of PK15 suspension without serum

降血清实验组	F1			F2			F3		
	时间	密度	活率	时间	密度	活率	时间	密度	活率
1% NBS + PK15 - H	0 h	1	/	0 h	1	/	0 h	1	/
	72 h	3.63	98%	72 h	2.1	95%	72 h	5.28	98%
0.5% NBS + PK15 - H	0 h	1	/	0 h	1	/	0 h	1	/
	72 h	3.93	98%	72 h	2.15	95%	72 h	5.8	96%
全 PK15 - H	0 h	1	/	0 h	1	/	0 h	1	/
	72 h	6.7	96%	72 h	4.1	99%	72 h	3.89	97%

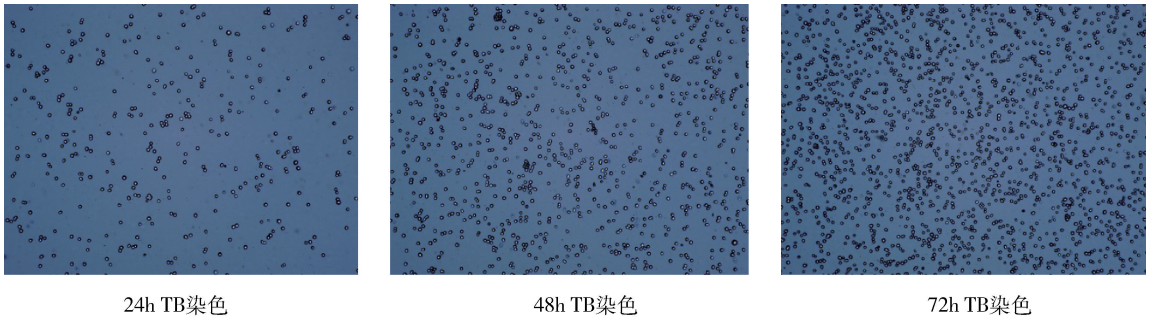


图 2 PK15 悬浮无血清的驯化细胞状态

Fig 2 State of domesticated cells in PK15 suspension without serum

表 5 各种培养方法细胞情况

Tab 5 Cell conditions of various methods of culture

培养方法	血清含量	传代次数	培养容器	接种密度 /mL	培养时间	细胞数量 /mL	细胞活率	结团情况
低血清贴壁	8% ~2%	5	T75	0.25×10^6	48 h	0.97×10^6	/	少量
低血清悬浮	2%	9	摇瓶	1×10^6	48 h	3.79×10^6	96%	多且大
无血清悬浮	2% ~0%	9	摇瓶	1×10^6	48 h	3.89×10^6	97%	无

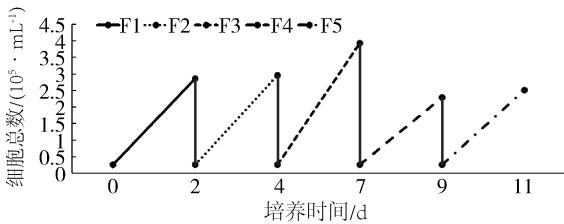


图 3 贴壁培养阶段 PK15 细胞密度情况

Fig 3 The density of PK15 cells in the adherent culture stage

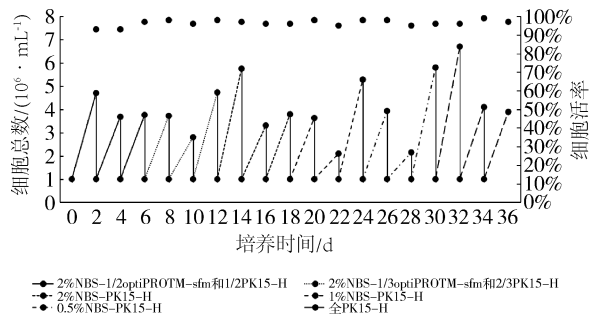


图 4 悬浮培养阶段 PK15 细胞密度及活率情况

Fig 4 Density and survival rate of PK15 cells in suspension culture stage

2.2 PK15 - S 增值的稳定性 为了验证该驯化细胞的稳定性,本实验又将驯化后冻存细胞再次复苏,并按初始密度 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$ 连续传 11 代,同时对糖和乳酸含量进行检测,结果见表 6。

2.3 PK15 - S 倍增时间的测定 取驯化稳定细胞,培养至 144 h,每 24 h 取样计数,绘制细胞生长曲线(图 5);根据该曲线计算细胞倍增时间为 22.7 h。

表 6 PK15 - S 细胞生长情况

Tab 6 PK15 - S Cells growth situation

参数	时间	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
密度/ ($10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)	0 h	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	24 h	1	1.02	0.9	0.96	1.01	1.02	0.92	1.04	1.06	1.21	0.92
	48 h	2.2	2.43	2.13	2.64	2.47	2.33	2.27	2.36	2.1	2.33	2.67
	72 h	4.43	3.89	4.48	4.27	3.43	3.95	3.8	4.05	3.81	4.18	4.69
Glu/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	72 h	0.0	0.3	0.2	0.9	1.7	1.6	2.0	1.3	1.5	1.6	1.6
Lac/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	72 h	0.9	1.4	1.7	2.5	2.4	2.3	2.1	2.6	2.3	2.5	2.9

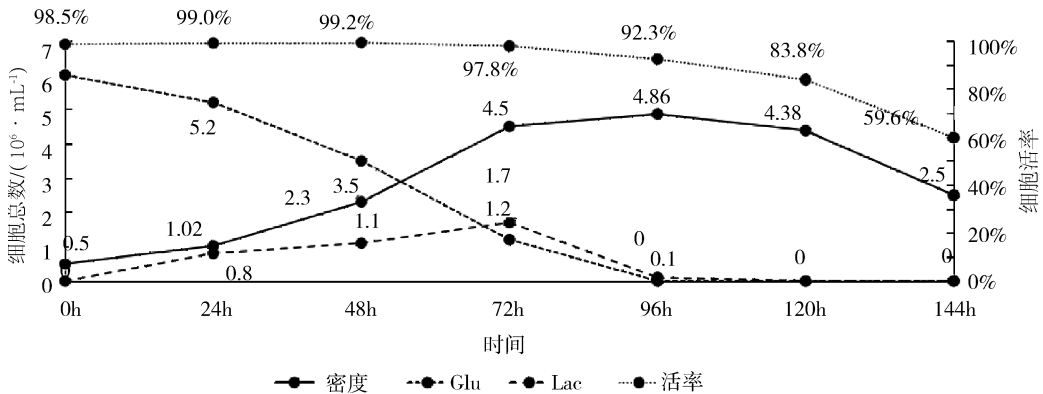


图 5 PK15 - S 细胞生长趋势图

Fig 5 PK15 - S cell growth trend graph

3 讨论与结论

PK15 细胞主要用于生产 PCV2 型和猪细小病毒,近年来,培养方式也逐渐由滚瓶系统提升为微载体系统,但目前仍有少部分生产厂家沿用滚瓶系统进行培养,滚瓶培养的主要缺点是劳动强度大,比表面积小,占用空间大,培养条件难以检测和控制^[7]。通过生物反应器运用微载体系统进行大规模培养改进了滚瓶培养模式的不足。张立等^[8]运用球转球的方法成功将 Vero 细胞由 5 L 生物反应器放大培养至 50 L 生物反应器。但是,大部分微载体放大培养需要用胰酶进行消化,消化后的细胞存在贴壁时间不同的现象,消化后的微载体与新加

入的微载体表面存在差异,两种因素均会造成细胞再次贴壁的不均匀,从而影响产毒结果;并且微载体存在价格昂贵,重复利用效果不好,贴壁条件苛刻,暴露环节多等劣势。两种培养方式均需要有牛血清的添加,增加成本的同时也给下游纯化工作带来一定的麻烦,所以驯化一株无血清全悬浮 PK15 细胞可以提升培养工艺,也使培养方法更简单,操作性更高。

该株 PK15 细胞,从复苏到最终驯化成全悬浮 PK15 - S 细胞,经过 3 种培养方法的驯化,共 23 个代次的传代,细胞状态良好,驯化过程中偶有接团现象,细胞活率较高,最高密度可达 $4.0 \times 10^6/\text{mL}$

左右,倍增时间在 24 h 左右。

驯化过程中,由于细胞生长方式的改变,细胞会以相互聚集即成团的现象生长,消化传代可以改善成团问题,也可以添加一些除团的组分来除团。同一种病毒对同一细胞的不同克隆株的敏感性不同,同一细胞所处外环境不同,同一病毒的敏感性也会有所差异^[9],为了避免做无用功,定期的检测细胞对毒的敏感性是很关键的。另外,在细胞驯化过程中及时的冻存细胞也是很重要的,因为驯化过程中操作步骤多,污染风险大,及时保种可以避免重复工作。

无血清全悬浮的培养工艺优势在于细胞密度大,操作方便,对于非 CPE 病毒可采用半连续培养连续收获病毒,提高了产量降低了成本,血清的去除减轻了下游工艺的工作压力,但全悬浮细胞对培养基的成分和搅拌式生物反应器的结构要求较高,对剪切力也非常敏感,常添加 PF-68 等表面活性剂来保护细胞达到所需密度,在今后的大规模生产中仍需对培养条件进行更深入的研究。

参考文献:

[1] Chae C. A review of porcine circovirus 2 - associated syndromes and diseases[J]. Veterinary Journal, 2005, 169(3):326 - 336.

[2] 王贵华,陈义锋,汤波,等. 猪圆环病毒 2 型毒株分离鉴定和体外增殖特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(1): 17 - 22.

Wang G H, Chen Y F, Tang B, et al. Research on isolation, identification and characteristic of vitro propagation of isolates of porcine circovirus type 2 [J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012, 39(1):17 - 22.

[3] 魏园园,马忠仁,王家敏,等. PK15 细胞的生物学特性和质量评价研究[J]. 黑龙江农业科学, 2015(5): 61 - 65.

Wei Y Y, Ma Z R, Wang J M, et al. Research on biological char-

acteristic and quality evaluation for PK15 cell [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2015(5):61 - 65.

[4] Chae C. Post - weaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology [J]. Vet J, 2004, 168:41 - 49.

[5] 何锡忠,李春华,倪建平,等. 用微载体系统培养 PK15 细胞生产猪圆环病毒 2 型 [J]. 上海农业学报, 2010, 26(4): 149 - 151.

He X Z, Li C H, Ni J P, et al. Production of PCV2 via PK15 cells cultured on microcarriers [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2010, 26(4):149 - 151.

[6] 任丽. 猪圆环病毒 2 型悬浮培养规模化生产工艺初探 [D]. 安徽:安徽农业大学, 2017:1 - 37.

Ren L. The Research of PCV2 suspension culture for scale production technology [D]. Anhui: Anhui Agricultural University, 2017:1 - 37.

[7] 张元兴,易小萍,张立,等. 动物细胞培养工程 [M]. 第 1 版. 北京:化学工业出版社, 2007:63,71.

Zhang Y X, Yi X P, Zhang L, et al. Animal cell culture engineering [M]. Rev. 1. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2007: 63,71.

[8] 张立,严春,范卫民,等. Vero 细胞的微载体培养 - 放大过程中的接种工艺 [J]. 华东理工大学学报, 1998, 12(24): 659 - 663.

Zhang L, Yan C, Fan W M, et al. Inoculum technology in large - scale cell culture on microcarriers [J]. Journal of East China University of Science and Technology, 1998, 12(24): 659 - 663.

[9] 张妍,张文俊,赵坤坤,等. 细胞悬浮培养技术生产疫苗的研究进展 [J]. 中国家禽, 2011, 33(13):45 - 47.

Zhang Y, Zhang W J, Zhao K K, et al. Research progress of vaccine production by cell suspension culture technology [J]. China Poultry, 2011, 33(13):45 - 47.

(编辑:李文平)