doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2021.3.10

微载体悬浮培养 ST 细胞增殖猪瘟兔化弱毒的工艺研究

漆世华,秦红刚,韩 兴,李晶梅,熊 亮,石宝兰,谢红玲*

(国药集团动物保健股份有限公司,武汉 430075)

[收稿日期] 2020 - 09 - 11　[文献标识码] A　[文章编号] 1002 - 1280 (2021) 03 - 0064 - 05　[中图分类号] S852.65

[摘　要]　从细胞接种密度、病毒接毒量、培养基三个方面进行研究和优化,并进行放大培养,建立了猪瘟病毒的微载体悬浮培养工艺:细胞接种密度为每个微载体 15 个细胞,病毒接毒量 0.05 MOI,采用 DMEM/F12 培养基进行培养和细胞消化瓶批式消化分散细胞,培养的细胞可以完成生物反应器 10 L 到 50 L 的放大,培养的病毒含量达到 7.6 $lgTCID_{50}$/mL、不低于 400 万 RID/mL,工艺稳定可靠,为猪瘟疫苗工业化大规模微载体悬浮培养奠定了基础。

[关键词]　猪瘟兔化弱毒;微载体悬浮培养;ST 细胞

Propagation of Classical Swine Fever Virus HCLV Strain by Microcarrier Suspension Culture of ST Cell

QI Shi - hua, QIN Hong - gang, HAN Xing, LI Jing - mei, XIONG Liang, SHI Bao - lan, XIE Hong - ling*

(*China National Pharmaceutical Group Animal Health Co. Ltd*, *Wuhan* 430075, *China*)

Corresponding author: *XIE Hong - ling*, *E - mail*:13419546263@163.*com*

Abstract: In order to develop the technology for microcarrier suspension culture of ST cells and propagation of classical swine fever virus HCLV strain in bioreactor, the cell density, amount of virus inoculation, the culture medium and scale - up process were studied and optimized. Results showed that the virus titer of HCLV could reached to 7.6 $lgTCID_{50}$/mL and more than four million RID/mL, when using the initial seeding density of 15 cells per microcarrier ,DMEM/F12 medium and infected with 0.05 multiple of infection (MOI) of HCLV. Flask batch digestion could scale - up the cultures from 10 L to 50 L. All together this suspension culture process was stable and reliable, which laid the foundation for large scale microcarrier suspension culture of swine fever vaccine.

Key words: HCLV; microcarrier suspension culture; ST cells

作者简介:漆世华,高级兽医师,从事动物疫苗研发及管理工作。

通讯作者:谢红玲。E - mail:13419546263@163.com

猪瘟是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起的一种高度接触性传染病,对全世界的养猪业构成巨大威胁。不同年龄、性别和品种的猪均能感染,死亡率高达 80% ~90%。世界动物卫生组织将其列为必须通报的动物疫病之一,我国将其列为一类动物传染病[1]。猪瘟兔化弱毒疫苗是国际上公认的、安全有效的预防猪瘟的弱毒疫苗,也是在我国应用最广泛的猪瘟疫苗。该疫苗推出至今其生产工艺经历了升级换代过程,从组织毒疫苗、原代细胞毒疫苗到传代细胞毒疫苗等[2]。目前,传代细胞苗主要采用转瓶培养工艺,每个转瓶均是独立的细胞培养单元,每瓶细胞的质量、病毒含量都有差异,导致疫苗批间差异大,而且操作劳动强度大,生产效率低,有必要尽早转型为生产规模更大、集约程度更高的生物反应器培养工艺。

1967 年 Wezel[3] 首先应用微载体系统培养贴壁依赖性细胞,此后这一技术得到迅速发展。生物反应器微载体悬浮培养系统由于具有较大表面积、细胞产量高、培养环境便于检测和控制等优点,已应用于狂犬病、脊髓灰质炎等疫苗[4-5]的生产。本研究以 ST 细胞为宿主细胞,采用微载体细胞悬浮培养技术进行猪瘟抗原的培养工艺进行了研究,为进一步利用生物反应器工业化大规模生产猪瘟疫苗提供基础性数据。

1　材料和方法

1.1　细胞、病毒和培养基　ST 细胞、猪瘟兔化弱毒(简称“猪瘟病毒”)为国药集团动物保健股份有限公司保存;MEM、DMEM/F12、DMEM 培养基为 Hyclone 公司产品;新生牛血清为内蒙古金源康公司产品。

1.2　微载体　cytodex1,GE 公司产品。

1.3　主要仪器设备　NBS BioFlo310 型生物反应器,培养体积 10 L,购于 NBS 公司;一控四平行生物反应器,培养体积 2 L,50 L 生物反应器,购于广州齐志生物工程设备有限公司。

1.4　抗体　猪瘟单抗为 JBT 公司产品;羊抗鼠 IgG - FITC为 Thermo 公司产品。

1.5　细胞悬液的准备　从液氮罐中取出冻存的 ST 细胞,复苏后在 T25 方瓶中静止培养,待细胞长满后,用 0.25% 胰酶消化分散细胞,按 1∶4 ~1∶5 的比例传代,如此连续扩繁细胞至所需数量,用 0.25% 胰酶消化分散细胞为 ST 细胞悬液,用于后续实验。

1.6　细胞最佳接种密度的确定　按照 3 g/L 的使用浓度称取 cytodex1 微载体,加入 PBS 水化 8 h,121 ℃ 30 min 高压灭菌。用 DMEM/F12 培养基置换掉 PBS,补充新生牛血清至终浓度 10%,加入到 2 L生物反应器。分别以每个 cytodex1 微载体 5、15、30 个细胞的密度接种 ST 细胞悬液,进行生物反应器悬浮培养。生物反应培养参数设定为:搅拌速度 50 r/min、pH7.2、溶氧 50%、温度 37 ℃。每天取样观察细胞的生长情况,计数细胞的密度,绘制细胞的生长曲线,以确定 ST 细胞的最佳接种密度。

1.7　细胞消化放大工艺参数的确定　待 2 L 生物反应器细胞的密度达到 2.0×10^6/mL,将长满细胞的微载体收集到细胞消化瓶中。用 pH7.2 0.01 mol/L的 PBS 洗涤细胞 2 次。每克微载体加入 100 mL 37 ℃预热的 0.25% 胰酶消化液进行消化,并于消化后 3 min、6 min、9 min、12 min 取样观察细胞分散、变圆的情况。待细胞变圆但尚未与微载体脱离时,排出细胞消化瓶中的胰酶溶液,加入含 10% 新生牛血清的 DMEM/F12 培养基。震动细胞消化瓶,使细胞充分分散、脱离微载体,成为细胞悬液和微载体的混合物。将混合物接种到 10 L 生物反应器,每日取样确定细胞生长情况。

1.8　病毒增殖最佳培养基的确定　采用 3 g/L 微载体,每个 cytodex1 微载体 15 个细胞的密度接种 ST 细胞悬液,分别用含 10% 新生牛血清的 DMEM、MEM 和 DMEM/F12 培养基进行 ST 细胞悬浮培养,待细胞密度达到 1.5×10^6/mL 时,分别更换为含 2% 新生牛血清的 DMEM、MEM 和 DMEM/F12 培养基的病毒维持液,按照 0.05 MOI 接种猪瘟病毒,培养 4 d,进行病毒第一次收获,以后每隔 3 d 收获并更换相应的病毒维持液,共收获 6 次。测定各收次猪瘟病毒的细胞半数感染量[6],判定病毒增殖的最佳培养基。

1.9　病毒最佳接毒量的确定　采用 3 g/L 微载体和 DMEM/F12 培养基，每个 cytodex1 微载体 15 个细胞的密度接种 ST 细胞悬液，进行 ST 细胞悬浮培养，待细胞密度达到 1.5×10^6/mL 时，分别按照 0.01、0.05、0.15MOI 接种猪瘟病毒，培养 4 d，进行病毒第一次收获，以后每隔 3 d 收获换液一次，共收获 6 次。测定各收次猪瘟病毒的细胞半数感染量[6]，确定病毒增殖的最佳接毒量。

1.10　病毒最佳培养条件的验证和稳定性研究　用 1.6 项确定细胞最佳接种密度、1.8 项确定的细胞最佳培养基，在 10 L 生物反应器中培养 ST 细胞，待细胞长满微载体后，按 1.7 项确定的消化工艺参数将 ST 细胞消化放大至 50 L 生物反应器中，按 1.9 项确定的接毒量接种猪瘟病毒，培养 4 d，进行病毒第一次收获，以后每隔 3 d 收获并更换相应的病毒维持液，共收获 6 次。取样检测猪瘟病毒含量[6]，并选取部分样品测定家兔感染量（RID）。将本工艺再重复验证 2 次。

2　结果与分析

2.1　细胞最佳接种密度的确定　将 ST 细胞分别以每个 cytodex1 微载体 5、15、30 个细胞的密度接种，进行生物反应器悬浮培养，发现在各接种密度的细胞在接种后 3 h，95% 细胞贴附上微载体，并开始伸展（图 1）。每个 cytodex1 微载体接种 15 个细胞，在培养第 4 天细胞密度达 2.4×10^6/mL（图 2），细胞状态稳定，维持时间长；每个 cytodex1 微载体接种 5 个细胞，培养第 6 天细胞密度才能达到高峰，由于有 20% 的空球，细胞密度也相对较低；每个 cytodex1 微载体接种 30 个细胞培养 3 d 细胞密度即达高峰，但细胞老化快，部分提前脱落。因此确定细胞的最佳接种密度每个 cytodex1 微载体接种 15 个细胞。

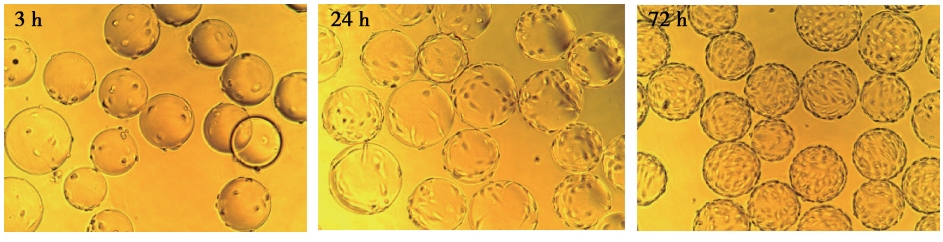


图 1　细胞在微载体上的生长情况

Fig 1　Cell growth on microcarriers

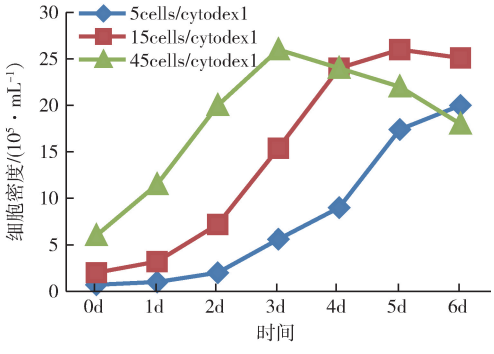
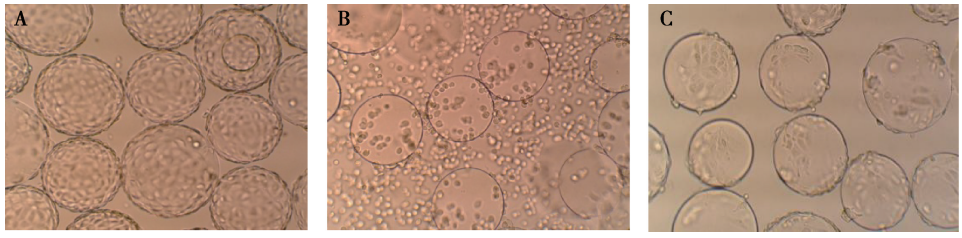


图 2　不同细胞密度接种细胞增殖曲线

Fig 2　Growth curve of ST cells with different cell densitys inoculated

2.2　细胞消化放大工艺参数的确定　采用细胞消化瓶，消化 6 min，细胞完全分散（图 3），将 2 L 生物反应器消化分散的细胞悬液接种到 10 L 生物反应器，24 h 95% 以上的细胞贴于微载体上，培养 4 d，细胞密度可达 2.8×10^6/mL，表明此消化放大参数合适、操作可行。

2.3　病毒增殖最佳培养基的确定　分别采用 DMEM、MEM 和 DMEM/F12 三种培养基进行猪瘟病毒培养，确定培养基对病毒增殖的影响，培养 4 d（1 收）细胞生长状况良好，形成致密的单层，第 2 收细胞更加致密，但从第 3 收开始，DMEM 和 MEM 培养基培养的细胞逐渐有老化脱落的细胞，至第 4 收细胞脱落明显，出现约 30% 的微载体空球，后续死亡细胞增多，pH 升高，耗氧量降低，未完成 5 收、6 收；DMEM/F12 培养的细胞全程均维持较好的状态，收获的抗原病毒含量也能达到较高的水平（表 1）。因此确定病毒增殖最佳培养基为 DMEM/F12。



A:胰酶消化前;B:胰酶消化 6 min 振摇分散后;C:放大培养 24 h

图 3　微载体悬浮培养 ST 细胞消化放大图片

Fig 3　Digestion and scale up the microcarrier suspension Culture of ST cell

表 1　不同培养基对猪瘟病毒增殖的影响

Tab 1　Effects of different media on the proliferation of swine fever virus

病毒收次	病毒含量/($lgTCID_{50}\cdot mL^{-1}$)		
	DMEM/F12	MEM	DMEM
1 收	6.3	5.75	6.4
2 收	7.0	6.25	7.4
3 收	7.5	5.75	6.5
4 收	7.25	5.5	6.0
5 收	7.25	/	/
6 收	7.75	/	/

2.4　病毒最佳接毒量的确定　0.01、0.05、0.15 MOI 三个接种量接种猪瘟病毒,取样检测猪瘟病毒含量(图 4)。0.05 MOI 和 0.15 MOI 接毒,收获的抗原病毒含量相当,可以达到 7.5 $lgTCID_{50}$/mL,考虑到 0.05 MOI 用毒量较少,生产中可以节约种毒,确定最佳接毒量为 0.05 MOI。

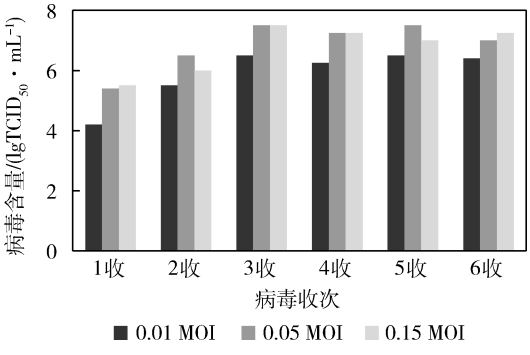


图 4　不同接毒量对病毒增殖的影响

Fig 4　Effects of inoculated with different dose on virus proliferation

2.5　病毒最佳培养条件的验证和稳定性研究　采用优化的工艺参数,即 cytodex1 微载体浓度为 3 g/L,每个 cytodex1 微载体 15 个细胞的密度接种 ST 细胞悬液于 10 L 生物反应器,采用 DMED/F12 培养基进行培养,待细胞密度达到 2.0×10^6/mL,按上述确定的消化工艺参数将 ST 细胞消化放大至 50 L 生物反应器中,培养 3 d,细胞密度达到 1.5×10^6/mL,并接种猪瘟病毒。先后培养 3 批,验证工艺条件的可靠性和稳定性。3 批病毒增殖差异不明显(图 5),从第 2 收开始,病毒的含量不低于 7.0 $lgTCID_{50}$/mL,最高可达 7.6 $lgTCID_{50}$/mL;选取了第一批的 1 ~ 4 收样品进行了兔体感染量的测定,2 ~ 4 收样品均不低于 400 万 RID/mL,说明确定的工艺参数使用效果好且稳定。

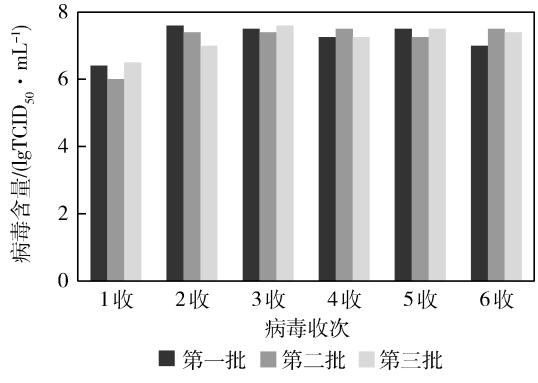


图 5　工艺稳定性验证

Fig 5　Verification of process stability

3　讨论与结论

微载体培养具有较高的比表面积,培养条件可控等显著优点,悬浮培养工艺已经成为当前生物制品研发、生产的首选工艺[7]。本研究采用 cytodex1 微载体,每克表面积为 4400 cm^2,相当于 1 个 15 L

转瓶的表面积,同时这种固体实心的微载体有利于细胞贴壁、伸展和病毒的感染[8],应用前景广阔。

对于大多数微载体培养来说,一般适宜的细胞接种密度是每个微载体 8 ~ 12 个细胞。本研究中发现 ST 细胞采用高密度接种时,细胞贴壁后能够很快的伸展,并快速进入到对数生长期;而低密度接种,细胞要经历一个较长的生长期才能达到最高的密度,其细胞的最高密度和生理状态明显要低于高密度接种,这可能与 ST 细胞的平板效率有关。

对于猪瘟病毒来说,病毒的产量主要取决于培养系统中细胞的密度和细胞状态,而细胞贴壁、细胞接种密度、微载体浓度、营养的供应、搅拌速度等培养参数和培养环境对细胞的生理状态和最终的细胞密度均有直接影响,从而影响病毒的产量。本研究采用 3 g/L 的微载体浓度,发现 DMEM/F12 相比 DMEM 和 MEM,能够长时间维持细胞较好的生长状态,至少可以进行病毒的 6 次收获,说明在生物反应器悬浮培养过程中,选择合适的培养基,为细胞提供充足均衡的营养至关重要。

生物反应器微载体悬浮培养放大是目前公认的技术难点,目前国内大多数企业在培养中采用的种子细胞主要是通过转瓶培养,一次接种需要多个转瓶的细胞,每个转瓶都是一个独立的单元,很容易造成培养的污染,无法满足更大单位体积培养的需要。本研究对微载体的胰酶消化放大培养作了探索,完成了 10 L 到 50 L 的放大,并且工艺条件稳定,培养三批,从第二收开始病毒含量均不低于 7.0 $lgTCID_{50}$/mL,同时也进行了部分样品的兔体感染量的测定,不低于 400 万 RID/mL,为工业化大规模培养奠定了基础。

参考文献:

[1] 扈荣良. 现代动物病毒学[M]. 中国农业出版社, 2014: 1335 – 1337.
Hu R L. Modern animal virology [M]. China Agricultural Publishing House, 2014:1335 – 1337.

[2] 韩玉莹, 李永锋, 仇华吉, 等. 猪瘟兔化弱毒疫苗(C 株)—10 年回眸[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(6): 654 – 659.
Han Y Y, Li Y F, Qiu H J, *et al*. The lapinized Chinese strain (C – strain): an updated review for the last decade[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2019,41(6):654 – 659.

[3] van Wezel A I. Growth of cell strains and primary cells on microearrier in homogene—OUS culture [J]. Nature, 1967, 216: 64 – 65.

[4] 查 力, 高 军, 侯剑英, 等. 生物反应器细胞培养制备人用狂犬病疫苗[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 5(19): 288 – 290.
Zha L, Gao J, Hou J Y, *et al*. Preparation of rabies vaccine for human use by cell culture in bioreactor[J]. Chinese Journal of Biological Products, 2006, 5(19): 288 – 290.

[5] Neuza M, Frazatti – Gallina, Regina M, *et al*. Vero – cell rabies vaccine produced using serum – free medium [J]. Vaccine, 2004, 23: 511 – 517.

[6] 李晶梅,朱 薇,秦红刚, 等. IFA 和 IPMA 方法测定猪瘟兔化弱毒病毒含量[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(10): 35 – 38.
Li J M, Zhu W, Qin H G, *et al*. IFA and IPMA for HCLV titer detection[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 47 (10): 35 – 38.

[7] Reisinger K S, Block S L, Izu A, *et al*. Subunit influenza vaccines produced from cell culture or in embryonated chicken eggs: comparison of safety, reactogenicity, and immunogenicity [J]. J Infect Dis, 2009, 200(6): 849 – 857.

[8] Ng Y C, Berry J M, Butler M. Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriors[J]. Biotechnol Bioeng, 1996,50(6): 627 – 635.

(编 辑:李文平)