

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.02.02

胎牛血清不同组分对昆虫杆状病毒复制的影响

李长路

(广州蕊特生物科技有限公司, 广州 510000)

[收稿日期] 2018-10-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 02-0011-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为探讨胎牛血清(FBS)中的不同组分对昆虫杆状病毒(BAC)复制的影响,找到血清中能提高病毒复制效果的有效组分,对亲和凝胶层析柱法分离获得血清中的四个混合组分(S1、S2、S3和S4)进行了病毒培养实验。在6孔板上接种SF9细胞,培养24 h,接种0.01MOI的BAC-GFP病毒,按照0、0.3%、0.6%、1.3%、2.5%、5%的浓度梯度加入6孔板中进行病毒培养。分别在24 h、48 h、72 h、96 h进行荧光拍照、观察。96 h收集病毒上清,进行空斑形成实验测定病毒滴度。用收集的病毒感染SF9细胞,72 h流式检测病毒的复制情况。结果显示:血清样本S1在浓度1.3%以上时,对于BAC的复制有促进作用;S2没有促进效果,反而随着S2的浓度上升而出现抑制的情况;S3在浓度2.5%以上时,同样有着明显促进作用;S4的促进作用不显著。试验表明,与原胎牛血清相比,添加单一血清组分S1对提高BAC病毒的复制效果更显著。

[关键词] FBS;血清;昆虫杆状病毒;SF9细胞

The Effect of Different Components of FBS on BAC Virus Replication

LI Chang-lu

(Guangzhou RuiTe Biotechnology Company Limited, Guangzhou 510000, China)

Abstract: To study the effect of different components of FBS on BAC virus replication, four components of FBS were obtained by affinity chromatography. SF9 cells were seeded into six well cell culture plates. SF9 cells were infected by 0.01MOI BAC virus in different concentrations (0、0.3%、0.6%、1.3%、2.5%、5% of FBS) at 24 hours. And The photos of cells were taken by Fluorescence microscope at 24、48、72、96 hours, respectively. Virus titer was detected at 96 hours. SF9 cells were infected by BAC virus, and virus replication was determined at 72 h. Results: S1 can significantly promote the BAC virus replication at concentration which is higher than 1.3%; S2 has no effect on BAC virus replication, but can inhibit its replication as the concentration goes down; S3 can also promote the BAC virus replication at a concentration which is higher than 2.5%; S4 has no influence on the BAC virus replication. In conclusion: In contrast to the original serum, S1 can significantly contribute to BAC virus replication.

Key words: FBS; Serum; BAC; SF9 cell

目前,在动物疫苗生产中,为了降低生产成本,减少生物制品纯化损失,减少由于不确定蛋白或血清组分带来干扰或差异的风险,提高生物制品的安全性,大多数采用无血清培养基^[1-2]。但在使用过程中,有些病毒,如口蹄疫病毒有时会出现细胞生长良好,但病毒产量不高的问题。为了克服这一问题,许多厂家在病毒生产过程中,还是要加入 1%~3%的低浓度血清。为了研究胎牛血清中的哪些组分对病毒复制起促进作用,我们采用亲和凝胶层析方法分离出四个血清组分,分别配制成培养基,培养 SF9 细胞,接种昆虫杆状病毒,进行空斑测定病毒滴度、流式检测等实验^[3]。如果能把血清中不同组分对病毒复制的影响分析清楚,即哪些组分对病毒复制起促进作用,哪些组分起抑制作用,从而在疫苗生产中,加入对病毒复制起促进作用的血清组分,去除那些对病毒复制有抑制作用的组分,可以有效提高疫苗产量。目前,提高病毒复制的方法主要集中在细胞驯化和病毒自身改造,血清中不同组分对病毒复制的影响,还未有报道。本实验从胎牛血清中分离出五个混合组分,培养昆虫杆状病毒,观察不同组分对病毒复制效率的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 胎牛血清 FBS:广州蕊特生物科技有限

公司,批号 20180318;胎牛血清样本 S1、S2、S3、S4;用 welchrom 4B 填料,分别从上述同一批号胎牛血清 FBS 中分离获得的混合组分,广州蕊特生物科技有限公司提供;培养基:Grace's 培养液,批号 20150709;细胞:ATCCSF-9,批号 20180810,代次 41;病毒:BAC-GFP V6,滴度 1.08×10^7 PFU/mL,由广东华南疫苗股份有限公司提供;流式细胞仪:C6、BD Bioscience。

1.2 方法 在 6 孔板上接种 SF9 细胞,培养 24 h,接种 0.01MOI 的 BAC-GFP 病毒;按照 0、0.3%、0.6%、1.3%、2.5%、5%的 FBS 组分的浓度梯度加入 6 孔板中进行病毒培养,原胎牛血清 FBS 做对照;分别在 24 h、48 h、72 h、96 h 进行荧光拍照(40×),观察病毒复制情况;96 h 收集病毒上清,进行空斑形成实验测定病毒滴度(稀释度 = 10^{-4}),收集的病毒感染 SF9 细胞,72 h 流式细胞术检测病毒的复制情况。

2 实验结果

2.1 空斑实验观察病毒复制结果 通过空斑测定实验发现,与 FBS 对比,S1 样本浓度在 1.3%以上时,空斑数显著增加。S2 样本的空斑数没有增加,反而降低。S3 样本浓度在 2.5%以上时,空斑数显著增加,没有 S1 显著。S4 样本的空斑数变化无显著差异。结果见表 1、图 1-图 5。

表 1 不同浓度血清样本的空斑数

Tab 1 Plaque assay of different concentration

样本	不同浓度血清样本的空斑数					
	0	0.3%	0.6%	1.3%	2.5%	5%
S1	30	44	56	68	100	182
S2	40	51	60	98	145	213
S3	39	50	32	24	28	18
S4	38	52	45	52	92	145
FBS	41	42	35	43	56	61

2.2 荧光强度观察病毒复制结果 通过肉眼观察荧光强度发现,与 FBS 对比,S1 样本随着浓度升高,荧光强度显著增强。S2 样本的荧光强度没有

增加。S3 样本浓度在 2.5%以上时,荧光强度显著增强。S4 样本的荧光强度没有明显变化。结果见图 6-图 10。

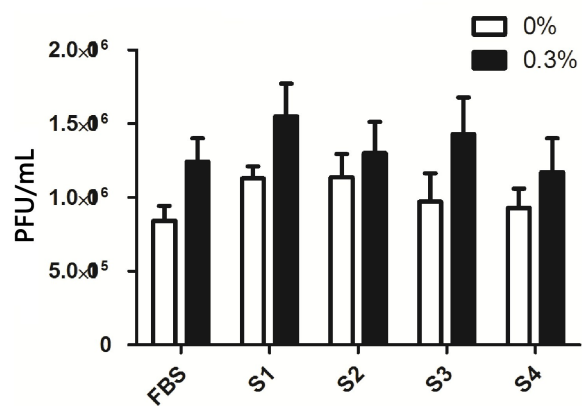


图 1 空斑数比较图 (0.3%)

Fig 1 BAC Plaque (0.3%)

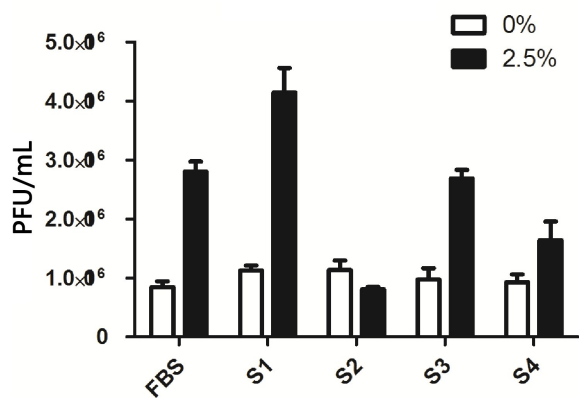


图 4 空斑数比较图 (2.5%)

Fig 4 BAC Plaque (2.5%)

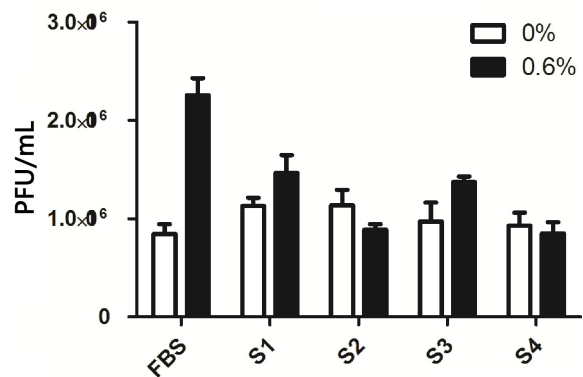


图 2 空斑数比较图 (0.6%)

Fig 2 BAC Plaque (0.6%)

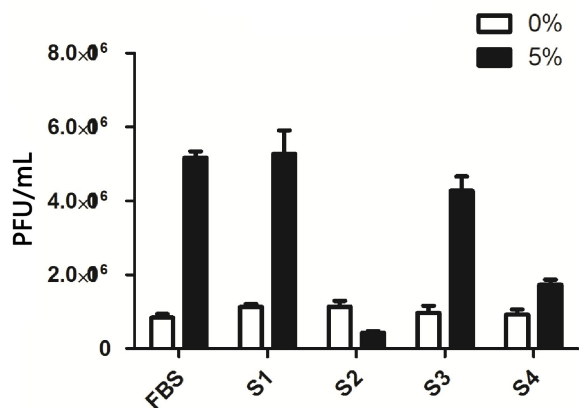


图 5 空斑数比较图 (5%)

Fig 5 BAC Plaque (5%)

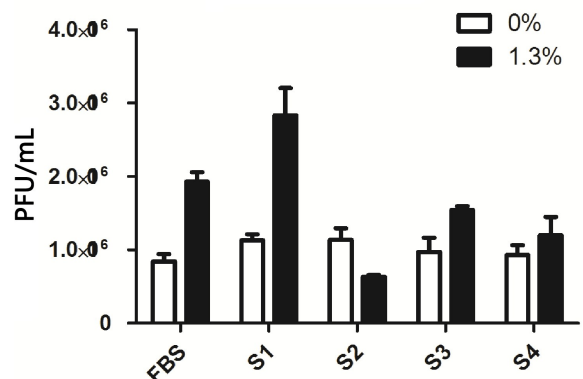


图 3 空斑数比较图 (1.3%)

Fig 3 BAC Plaque (1.3%)

2.3 流式细胞术检测结果病毒复制结果 通过流式细胞术检测发现,与 FBS 对比,S1 样本浓度在 1.3%以上时,病毒数量显著增多。S2 样本的病毒数量没有显著增加。S3 样本浓度在 2.5%以上时,荧光强度显著增多。上述实验证实 S4 对病毒复制没有明显促进作用,故没有进行流式检测。结果见图 11-图 13。

3 讨论

昆虫杆状病毒是一种共价闭合环状双链 DNA 病毒,其特有的 Bac-to-Bac 表达系统具有翻译后加工修饰功能和高效表达外源蛋白的功能。本文选择病毒培养 96 h,滴度达到最大值,可以收集病毒上清,感染细胞后,72 h 病毒滴度达到最大值,进

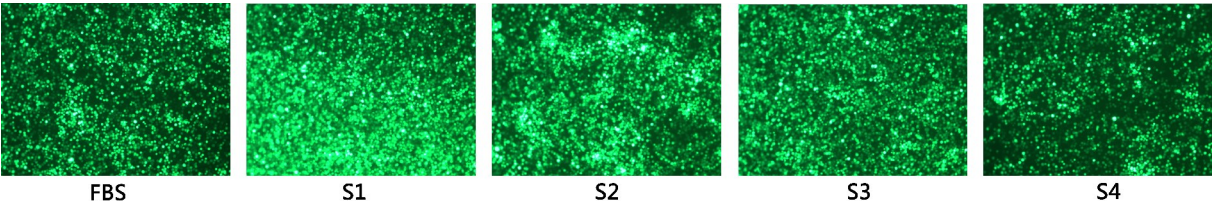


图 6 添加血清或组分浓度为 0.3%,培养病毒 96 h 的荧光强度

Fig 6 The fluorescence intensity of Five samples with serum or components at 0.3%,at 96 h

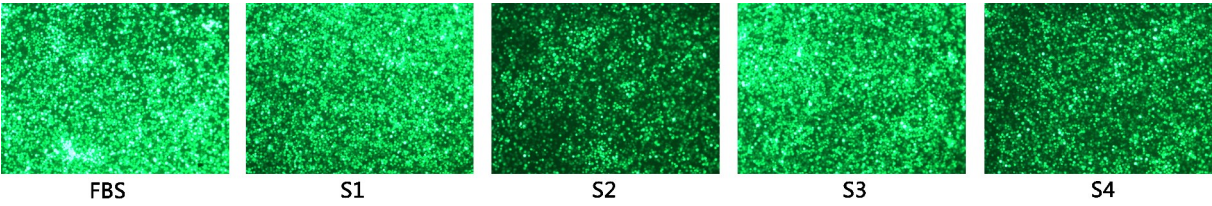


图 7 添加血清或组分浓度为 0.6%,培养病毒 96 h 的荧光强度

Fig 7 The fluorescence intensity of Five samples with serum or components at 0.6%,at 96 h

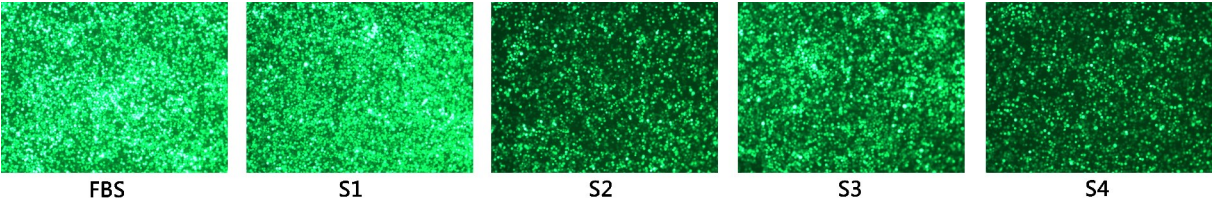


图 8 添加血清或组分浓度为 1.3%,培养病毒 96 h 的荧光强度

Fig 8 The fluorescence intensity of Five samples with serum or components at 1.3%,at 96 h

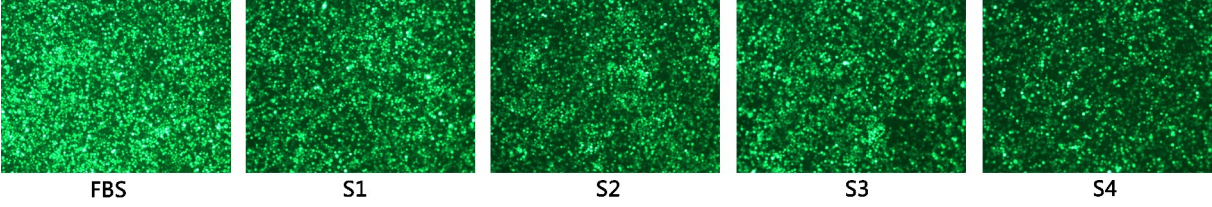


图 9 添加血清或组分浓度为 2.5%,培养病毒 96 h 的荧光强度

Fig 9 The fluorescence intensity of Five samples with serum or components at 2.5%,at 96 h

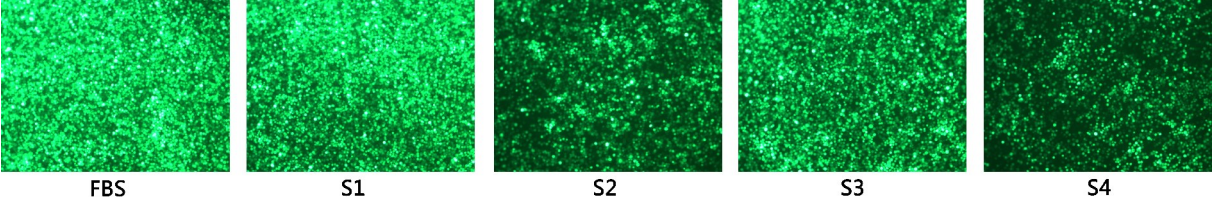


图 10 添加血清或组分浓度为 5%,培养病毒 96h 的荧光强度

Fig 10 The fluorescence intensity of Five samples with serum or components at 5%,at 96 h

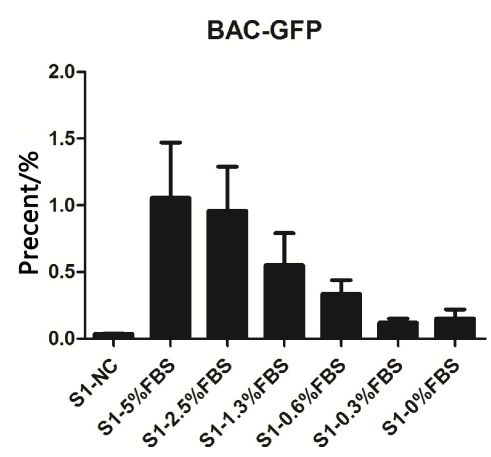


图 11 S1 的流式检测

Fig 11 The FC of S1

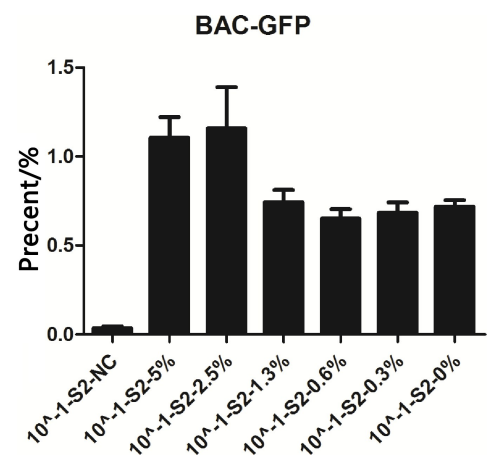


图 12 S2 的流式检测

Fig 12 The FC of S2

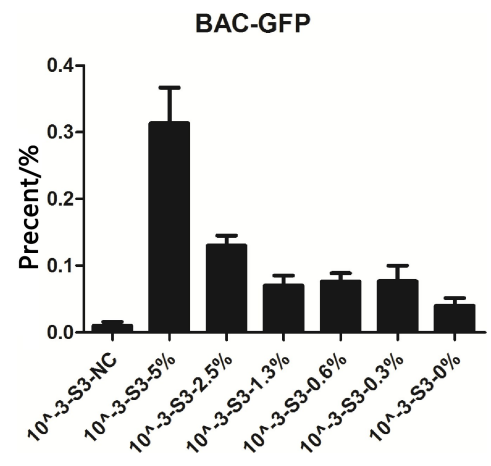


图 13 S3 的流式检测

Fig 13 The FC of S3

行流式细胞术检测。

综合蚀斑实验、荧光拍照以及流式检测结果,血清样本 S1、S2、S3、S4 中,S1 与 S3 对 BAC 增殖的促进作用最为明显,而 S2 对 BAC 增殖存在抑制,S4 存在微弱的促进效果。结果表明,血清中的有些组分对病毒复制起促进作用,有些组分反而抑制病毒复制。在病毒培养过程中,添加 S1 组分,同时去除血清中的 S2 组分,可以有效提高病毒复制效率,提高病毒产量,这对疫苗生产有帮助。

在生物制品中,使用无血清培养基,可提高生物制品的质量、纯度,方便产物的分离纯化,减少由血清带来的污染机会,减少过敏原,同时也减少了成本,也便于在生物反应器中进行代谢流分析,实现在线监控,精准投料。对于生产抗体用的 CHO 细胞、vero 细胞和杂交瘤细胞,确实有优势^[4-5]。但是对于多数病毒性疫苗来说,会出现病毒产量低的情况。

对于如何在减少或不用血清的情况下,细胞生长良好,病毒产量高,是目前研究的热点,主要集中在对细胞进行驯化和对病毒自身进行改造两方面。通过对贴壁细胞进行低血清或无血清驯化,获得可以稳定传代的悬浮细胞,用于细胞反应罐生产。田波等^[6]对 BHK21 细胞悬浮驯化,筛选出驯化的参数条件。张良艳等^[7]对 MDCK 细胞进行驯化,用于流感病毒发酵罐培养。通过对病毒的启动子进行改造,提高病毒复制能力。刘言等^[8]用 HBV 病毒启动子内的基因片段替换土拨鼠肝炎病毒的同源序列,来提高病毒复制能力。袁天罡^[9]把口蹄疫病毒的 2C 蛋白的 T135I 突变,从而提高 O/YS/CHA/05 的复制。魏南南、徐守兴等^[10]利用分子生物学技术研究了内源性 TPL2 基因对口蹄疫病毒复制的影响,发现 FMDV 感染 BHK-21 细胞后,TPL2 转录水平显著上调;过表达 TPL2 能够促进 FMDV 在 BHK-21 细胞中复制,而下调表达内源性 TPL2 后 FMDV 的复制受到抑制,表明 TPL2 促进 FMDV 在 BHK-21 细胞中进行复制。谢佳汛^[11]使用 p53 特异性抑制剂 PFTα 提前处理 PK-15 细胞,抑制 p53 的表达,然后用 PRV 分别感染 p53 抑制表达细胞

与对照细胞,收集不同时间点细胞培养物,检测 PRVgB 基因和 PRV 滴度,结果表明 p53 抑制表达细胞内的 PRVgB 基因及病毒 TCID₅₀ 均显著低于对照组,说明抑制 p53 的表达对 PRV 在细胞内的复制具有抑制作用。王涛^[12]通过实验证实,COP II 蛋白复合体促进 CSFV 复制的过程,COP II 介导的蛋白运输途径促进 CSFV 的组装或释放,为进一步探索 COP II 在 CSFV 复制中的作用奠定了基础,为全面了解 CSFV 复制机制和生命周期提供了新的科学依据。本文研究从胎牛血清中分离不同组分对病毒复制的影响,初步证实分离出的组分 S1 对昆虫杆状病毒复制有明显的促进作用。至于该组分是否对其它病毒复制有同等的促进作用,后续会进一步去验证。

参考文献:

- [1] 李 荣. 悬浮培养在口蹄疫疫苗中的应用[J]. 中国兽药杂志, 2011,45(7): 14-16.
Li Rong. Application of suspension culture in foot and mouth disease vaccine [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2011,45(7): 14-16.
- [2] 梅建国,庄金秋,沈志强. 动物细胞无血清培养技术研究进展 [J]. 生物技术,2010,20(3): 87-89.
Mei J G, Zhuang J Q, Shen Z Q. Progress in serum-free culture of animal cells [J]. Biotechnology, 2010,20(3): 87-89.
- [3] Van der Valk J, Mellor D Brands R. The humane collection of fetal bovine serum and possibility for serum-free cell and tissue culture [J]. Toxicology in Vitro, 2004,18(1): 1-12.
- [4] 黄亚杰,朱光凯,刘 珊. 混合培养基模式培养杂交瘤细胞表达单克隆抗体[J]. 生物学杂志, 2016,33(6): 104-109.
Huang Y J, Zhu G K, Liu S. Hybridoma cells cultured in mixed media express monoclonal antibodies [J]. Journal of Biology, 2016,33(6): 104-109.
- [5] Vanov D P, Parker T L, Walker D A. In vitro co-culture model of medulloblastoma and human neural stem cells for drug delivery

assessment [J]. Journal of Biotechnology, 2015,205: 3.

- [6] 田 波,尚勇良,郭 立. BHK21 细胞的悬浮驯化及悬浮培养参数研究 [J]. 安徽农业科学, 2014,42(31): 10855-10857.
Tian B, Shang Y L, Guo L. Study on suspension domestication and suspension culture parameters of BHK21 cells [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2014,42(31): 10855-10857.
- [7] 张良艳,姚志东,黄 艳. MDCK 细胞的悬浮驯化及初步应用 [J]. 生物技术通讯, 2013,24(3): 10-13.
Zhang L Y, Yao Z D, Huang Y. Suspension domestication and preliminary application of MDCK cells [J]. Biotechnology Communication, 2013,24(3): 10-13.
- [8] 刘 言. 提高土拨鼠肝炎病毒复制能力的研究 [J]. 华中农业大学学报, 2015,3(2): 15-19.
Liu Y. Study on improving the reproduction ability of groundhog hepatitis virus [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2015,3(2): 15-19.
- [9] 袁天罡. 2C 蛋白 T135I 替换对口蹄疫病毒复制的促进作用及其分子基础 [D]. 中国农业科学院, 2017.
Yuan T G. 2C protein T135I replacement promotes the replication of foot-and-mouth disease virus and its molecular basis [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.
- [10] 魏南南,徐守兴,史喜娟,等. TPL2 促进口蹄疫病毒在 BHK-21 细胞复制 [J]. 畜牧兽医学报, 2018,49(6): 1204-1211.
Wei N N, Xue S Y, Shi X J, et al. TPL 2 promotes the replication of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells [J]. Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018,49(6): 1204-1211.
- [11] 谢佳汛. p53 影响伪狂犬病毒在 PK-15 细胞中复制的研究 [D]. 广西大学, 2018.
Xie J X. Study on the Effect of P53 on Pseudorabies Virus Replication in PK-15 Cells [D]. Guangxi University, 2018.
- [12] 王 涛. 外被体蛋白 II 对猪瘟疫病毒复制的影响 [D]. 西北农林科技大学, 2018.
Wang Tao. The effect of exosomes protein II on the replication of classical swine fever virus [D]. Northwest Agriculture and Forestry University, 2018.

(编辑:李文平)