doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.4.07

ST 细胞全悬浮培养的驯化及其培养伪狂犬病毒的工艺研究

漆世华,韩　兴,秦红刚,李晶梅,熊　亮,秦　伟,谢红玲*,
郑良益,石宝兰,冯　钊,徐新星
(国药集团动物保健股份有限公司,武汉 430075)

[收稿日期] 2020-11-30　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280 (2021) 04-0051-06　[中图分类号]S852.65

[摘　要]　将 Siat7e 基因转染 ST 细胞,筛选,驯化得到一株可悬浮培养的 ST 细胞株,此株细胞能够稳定连续传代,适应无血清、高密度培养,最高密度可达 6×10^6/mL,从摇瓶放大至生物反应器,生长稳定;采用驯化的全悬浮 ST 细胞培养伪狂犬病毒,从接毒时细胞密度、接毒量、收获时间三个方面优化了伪狂犬病毒的培养参数,确定接毒时细胞密度为 2.0×10^6/mL ~ 3.0×10^6/mL,接毒量为 0.1 MOI ~ 1 MOI,收毒时间为接毒后 24 h ~ 36 h。经过 50 L 生物反应器 3 个批次的工艺验证,培养的病毒含量均不低于 $10^{9.0}$ $TCID_{50}$/mL,说明驯化的 ST 全悬浮细胞适合伪狂犬病毒的培养。

[关键词]　ST 细胞;悬浮培养;伪狂犬病毒

Generation of ST Cells to Suspension Culture and Its Process of Culturing Pseudorabies Virus

QI Shi-hua, HAN Xing, QIN Hong-gang, LI Jing-mei, XIONG Liang, QIN Wei, XIE Hong-ling*,
ZHENG Liang-yi, SHI Bao-lan, FENG Zhao, XU Xin-xing
(*China National Pharmaceutical Group Animal Health Co. Ltd, Wuhan* 430075, *China*)
Corresponding author: XIE Hong-ling, E-mail: 13419546263@163.com

Abstract: Siat7e gene was transfected into ST cells, through screening, successfully conversioned the ST cell to suspension culture. This cell is stable and subcultured, can adapt to high density culture within serum-free medium, the maximum density of cell growth was 6×10^6/mL. The cells grew steadily when scale up from the shaking flask to the bioreactor. In order to study the culturing procedure of Pseudorabies virus using this suspended ST cells, the cell density, amount of virus inoculation, and harvest time were optimized, which displayed that the best results could get when using the initial seeding density of 2.0×10^6/mL ~ 3.0×10^6/mL, infected with 0.1 MOI ~ 1 MOI, and harvested between post- infection 24 h ~ 36 h. After three batches of 50 L

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

bioreactor suspension cultures, the virus titers was not less than $10^{9.0}$ $TCID_{50}$/mL, indicating that this ST suspended cells were suitable for Pseudorabies virus culture.

Key words: ST cell; suspension culture; Pseudorabies virus

伪狂犬病是由伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起多种家畜和野生动物以发热、奇痒(猪除外)及脑脊髓炎为主要症状的一种重要传染病[1]。其中猪伪狂犬病在我国普遍流行,疫苗接种是预防和控制该病的有效手段。目前均采用转瓶工艺生产猪伪狂犬病疫苗[2],劳动强度大,生产效率低。生物反应器悬浮培养工艺具有生产效率高、操作简单、可自动化控制等优点,正在成为当前生物制品研发生产的主流技术[3]。

ST 细胞为猪睾丸传代细胞系,对多种病毒敏感,如猪瘟病毒(CSFV)、猪细小病毒(PPV)和伪狂犬病毒(PRV)等,已经应用于猪瘟疫苗的生产[4]。但 ST 细胞是贴壁依赖性细胞,悬浮培养需要采用微载体悬浮技术[5],工业化放大受到了其贴壁性能的限制,操作繁琐。为利用生物反应器大规模生产伪狂犬病疫苗,本研究驯化建立了全悬浮培养的 ST 细胞系,并优化了全悬浮培养的 ST 细胞培养伪狂犬病毒的工艺参数。

1 材料和方法

1.1 细胞、病毒和培养基 ST 细胞、伪狂犬病毒 C 株为国药集团动物保健股份有限公司保存;DMEM/F12 培养基为 Hyclone 公司产品;STP 无血清培养基为深圳壹生科生物科技公司的产品;新生牛血清为内蒙古金源康公司产品。

1.2 质粒和转染试剂 Siat7e 基因真核表达质粒为 Genecopoeia 公司产品,货号:EX - V1581 - M98;转染试剂 Lipofectamine 3000 和 G418 为 Invitrogen 公司产品。

1.3 主要仪器设备 摇床为美国精骐公司产品;7 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 ST 细胞全悬浮培养的驯化

1.4.1 表达 Siat7e 基因的稳定 ST 细胞系的转染与筛选 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,接种至 6 孔细胞培养板。待细胞形成约 80% 的单层时,按 Lipofectamine 3000 试剂说明书,向 6 孔细胞培养板的 ST 细胞中转染 Siat7e基因真核表达质粒。转染后 48 h,更换含有 10% 牛血清、0.5 μg/mL G418 的 DMEM/F12 培养基,此后每 3 d 更换一次培养基。在 G418 筛选压力下培养,荧光显微镜下观察,待细胞全部表达绿色荧光蛋白,将细胞用胰酶消化扩大培养,冻存细胞。

1.4.2 细胞驯化 将 1.4.1 获得的细胞采用逐步更换 STP 培养基培养和降低牛血清的方式,让其适应 STP 无血清培养基。具体操作为采用 T25 克氏瓶,用 75% 的 DMEM/F12 培养基(含 10% 牛血清)和 25% 的 STP 培养基培养细胞 3 代;50% 的 DMEM/F12 培养基(含 10% 牛血清)和 50% 的 STP 培养基培养细胞 3 代;25% 的 DMEM/F12 培养基(含 10% 牛血清)和 75% 的 STP 培养基培养细胞 3 代;直至完全适应 STP 无血清培养基后,将 ST 细胞悬液按照初始密度 1.0×10^6/mL 接种到 125 mL 摇瓶,置 37 ℃、5% CO_2、110 r/min 的摇床悬浮培养,每天取样观察细胞形态,计数细胞密度与活性,根据细胞的生长情况更换培养基。待细胞完全适应悬浮培养后,扩大培养并冻存细胞,将其命名为 STS。将 STS 连续传 20 代,研究 STS 细胞生长稳定性。

1.5 STS 细胞最佳接种密度确定及生物反应器培养 将 STS 细胞分别以 0.2×10^6/mL、0.5×10^6/mL 和 1.0×10^6/mL 三个初始密度接种于 125 mL 摇瓶进行悬浮培养,每天取样计密度与活性,确定细胞的最佳接种密度。将摇瓶培养的细胞逐步扩大培养后,按摇瓶确定的最优细胞接种密度接种 7 L 生物反应器,设置生物反应器培养参数为:温度 37 ℃、pH7.2、搅拌转速 75 r/min 和溶氧(DO)50%,每天

取样计密度与活性,确定生物反应器悬浮培养的可行性。

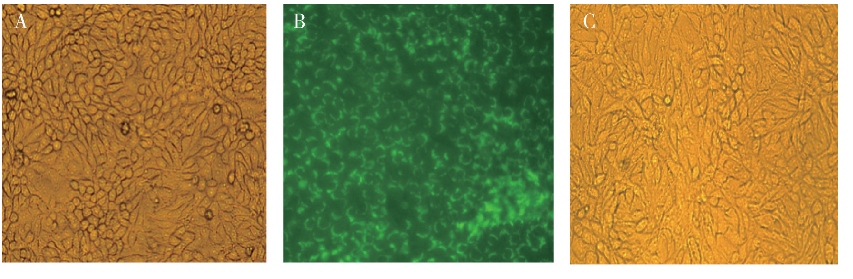
1.6　STS 细胞培养伪狂犬病毒工艺研究

1.6.1　细胞最佳接毒密度、最佳接毒量和收获时间的确定　取对数生长期 STS 细胞,用培养基稀释成 1.0×10^6/mL、2.0×10^6/mL 和 3.0×10^6/mL 三个密度,每个细胞密度分别接种至 3 个 125 mL 摇瓶,每瓶 20 mL,同时每个细胞密度分别按照接毒量为 0.01 MOI、0.1 MOI、1 MOI 接种伪狂犬病毒 C 株,置 37 ℃、5% CO_2、110 r/min 的摇床培养,在接毒后 12 h 开始每隔 12 h 取样,测定病毒含量,确定接毒时细胞最佳密度、最佳接毒量和最优收获时间。

1.6.2　生物反应器培养伪狂犬病毒工艺验证　采用上述优化的工艺参数,用 50 L 生物反应器验证工艺参数的可靠性。取摇瓶培养的种子细胞,按 0.5×10^6/mL 接种到 7 L 生物反应器,培养体积为 5 L,生物反应器培养参数为:温度 37 ℃、pH 7.2、搅拌转速 75 r/min 和 DO 为 50%。待细胞密度达到 4.5×10^6/mL 时,扩大培养至 50 L 生物反应器,培养体积 40 L,待细胞密度达到 2.0×10^6/mL、2.5×10^6/mL 和 3.0×10^6/mL 时,分别按 0.1 MOI、0.5 MOI 和 1 MOI 接种伪狂犬病毒,每隔 12 h 取样测定病毒含量,确定病毒的增殖情况。

2　结果与分析

2.1　ST 细胞全悬浮培养的驯化　将 ST 细胞转染 Siat7e 基因真核表达质粒,G418 筛选压力下培养细胞 3 周,荧光显微镜下观察,细胞全部表达绿色荧光蛋白(图 1),表明获得一株稳定表达 Siat7e 基因 ST 细胞系。采用逐步更换 STP 培养基培养和降低牛血清的方式,细胞能够完全适应无血清培养。借此进行了悬浮培养的驯化,获得了适应悬浮培养的 STS 细胞;按照初始密度 1.0×10^6/mL,培养 72 h,密度达到 6.0×10^6/mL(图 2);连续传代 20 代,细胞均正常生长,稳定在 5.1×10^6 ~ 6.6×10^6/mL 之间,细胞传代稳定性良好(图 3)。



A:正常 ST 细胞;B:荧光显微镜下稳定表达 Siat7e 基因的细胞;C:无血清培养的 ST 细胞

A: Normal ST cells; B: Cells stably expressing Siat7e genes under fluorescence microscope; C: ST cells culture of serum - free

图 1　稳定表达 Siat7e 基因的细胞图片

Fig 1　Cell images of stable expression of Siat7e genes

2.2　STS 细胞最佳接种密度确定及生物反应器培养　将 STS 细胞分别以 0.2×10^6/mL、0.5×10^6/mL 和 1.0×10^6/mL 三种密度接种于细胞培养瓶中进行悬浮培养。从图 4 可以看出,以 0.2×10^6/mL 细胞密度接种时,生产较缓慢,活率下降较快;以 0.5×10^6/mL 和 1×10^6/mL 密度接种,细胞最高密度差异不大,为 5×10^6 ~ 6×10^6/mL。确定细胞的最佳接种密度为 0.5×10^6/mL ~ 1.0×10^6/mL,培养传代时间为 72 h ~ 96 h。按 0.5×10^6/mL 细胞接种密度接种 7 L 生物反应器,培养 96 h,密度达到 6.1×10^6/mL,活率达 95%,说明细胞能够适应生物反应器悬浮培养。

2.3　伪狂犬病毒悬浮培养工艺优化　接毒时采用 1.0×10^6/mL、2.0×10^6/mL、3.0×10^6/mL 三种细胞密度和 0.01 MOI、0.1 MOI、1 MOI 三种接毒量,用正交实验确定最佳细胞接毒密度、最佳接毒量和收获时间(表 1)。无论那个细胞密度接种,0.1 MOI 和 1 MOI 接毒,病毒的增殖均优于 0.01 MOI

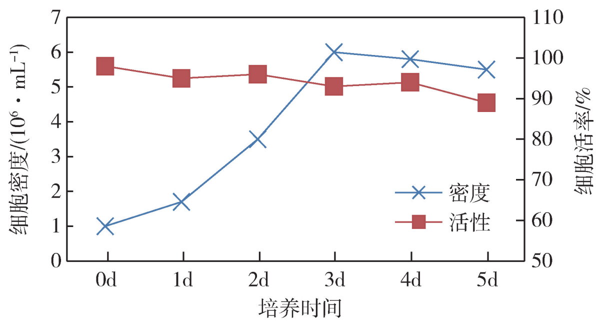


图 2　STS 细胞增殖曲线

Fig 2　Proliferation curve of STS Cells

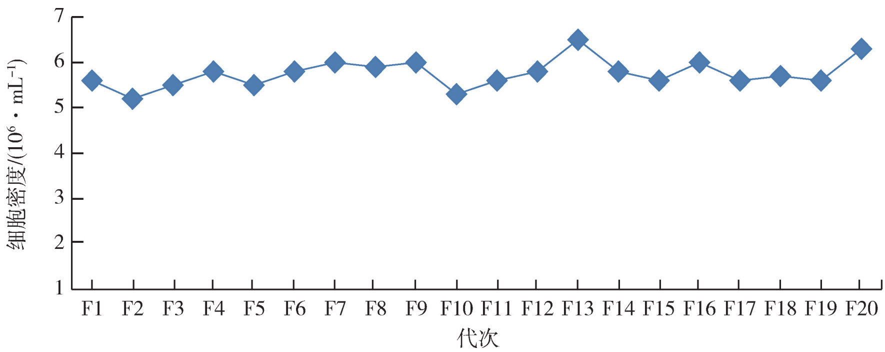


图 3　STS 细胞传代生长稳定性

Fig 3　STS cells growth stability of passage

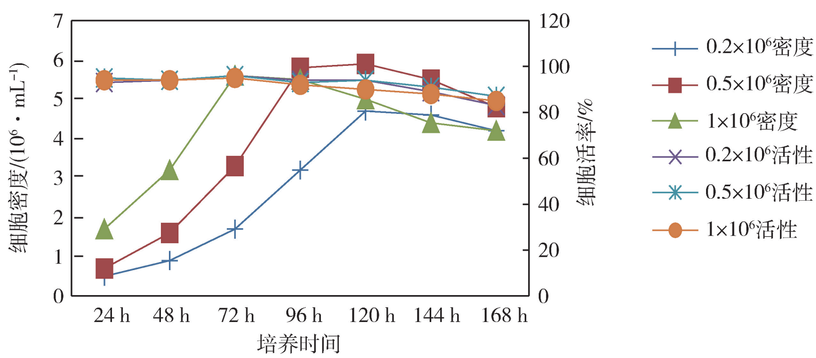


图 4　不同细胞密度接种 STS 细胞的生长曲线

Fig 4　Growth curves of STS cells inoculated with different cell densities

接毒,而且接毒量越大,病毒增殖达到高峰的时间越短,1 MOI 接毒后病毒含量 24 h 最高,0.1 MOI 接毒后病毒含量 36 h 最高;关于接毒时细胞密度,2.0×10^6/mL 和 3.0×10^6/mL 接毒,病毒增殖的高峰均不低于 $10^{9.0}$$TCID_{50}$/mL,尤其是采用 2.0×10^6/mL 密度接种 0.1 MOI 病毒和采用 3.0×10^6/mL 密度接种 1 MOI 病毒时,病毒含量最高可以达到 $10^{9.4}$$TCID_{50}$/mL。因此病毒的最佳培养工艺为 2.0×10^6/mL 密度,接种 0.1 MOI 病毒,接毒后36 h 收获;或者 3.0×10^6/mL 密度,接种 1 MOI 病毒,接毒后 24 h 收获。考虑到生产实际控制准确性,确定细胞的接毒量为 0.1 MOI ~ 1 MOI,接毒时细胞密度为 2.0×10^6/mL ~ 3.0×10^6/mL,收毒时间为接毒后 24 h ~ 36 h。

表 1　接毒时不同细胞密度和接毒量对病毒增殖的影响

Tab 1　Effects of different cell density and amount of virus inoculation on virus proliferation

密度/mL	接毒量/MOI	毒价(lgTCID$_{50}$/mL)					
		12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
1.0×10^6	0.01	6.7	7.75	8.0	7.75	7.6	7.5
	0.1	7.6	8.75	8.75	8.75	8.6	8.5
	1	7.8	8.75	8.6	8.75	8.4	8.5
2.0×10^6	0.01	6.6	8.0	8.4	8.75	8.5	7.5
	0.1	7.6	8.5	9.4	9.0	9.0	8.5
	1	7.6	9.0	8.75	8.75	8.6	8.5
3.0×10^6	0.01	6.4	7.5	7.8	8.0	7.75	7.6
	0.1	7.4	8.0	9.25	8.75	8.75	8.6
	1	7.8	9.4	9.25	9.0	8.5	8.6

2.4　生物反应器培养伪狂犬病毒工艺验证　采用摇瓶优化的接毒工艺参数,用 50 L 生物反应器验证了工艺参数的可靠性。从 7 L 生物反应器放大到 50 L 生物反应器,待细胞密度达到 2.0×10^6/mL,2.5×10^6/mL 和 3.0×10^6/mL 时,分别按 0.1 MOI、0.5 MOI 和 1 MOI 接种伪狂犬病毒,病毒的增殖曲线如图 5,三批病毒含量均不低于 $10^{9.0}$TCID$_{50}$/mL,最高达到 $10^{9.5}$TCID$_{50}$/mL。

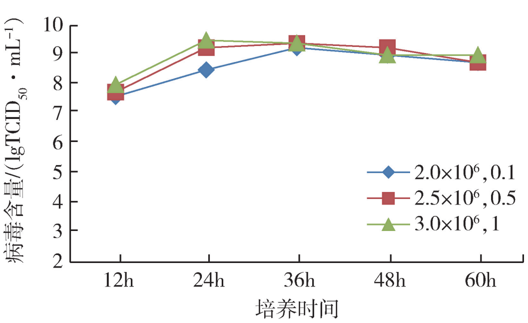


图 5　生物反应器培养病毒增殖曲线

Fig 5　Growth curve of virus in bioreactor culture

3　讨论与结论

悬浮培养分为微载体悬浮培养和单细胞全悬浮培养,其中单细胞全悬浮培养以其无需载体、操作简单、易于放大,成为当前悬浮培养的主流技术。但目前疫苗生产采用的哺乳动物细胞多为贴壁依赖性细胞,需要经过全悬浮培养的驯化。常用的细胞驯化方法一般先将细胞适应无血清培养,在此基础上进行悬浮培养驯化,同时通过培养基的不断优化,使细胞能够无血清高密度生长[6],但整个过程耗时较长。Siat7e 基因编码 α-2,6 唾液酸转移酶,与细胞的贴壁性有关,其表达水平的提高可降低细胞的黏附性[7]。目前采用 Siat7e 基因转染细胞已经成功驯化了 MDCK 悬浮细胞,用于流感疫苗的生产[8]。本研究将 Siat7e 基因转染 ST 细胞,经过筛选,获得了稳定表达 Siat7e 基因的 ST 细胞系,进而驯化得到一株可悬浮培养的 STS 细胞株,此株细胞能够稳定连续传代,连续培养 20 代细胞生长稳定;适应高密度生长,在无血清条件下培养,细胞最高密度可达 6×10^6/mL,从摇瓶放大至 7 L 反应器,生长稳定。

在细胞培养过程中,通常会添加血清,但由于血清成分复杂,同时存在如 Ca^{2+}、Mg^{2+} 等成分会促进细胞贴壁,因此,在得到稳定表达 Siat7e 基因的 ST 细胞系后,通过逐步降低血清的方法实现了无血清培养,进一步改善了细胞的贴壁性能,从而实现了细胞从贴壁培养到悬浮培养的驯化。同时无血清培养消除了培养基中血清成分,降低了疫苗生产制造下游的纯化负荷,也为疫苗的质量提升奠定了基础。

接毒时细胞密度、接毒量和收获时间是影响病毒增殖培养的三个关键因素,本研究采用 STS 细胞培养伪狂犬病毒,从接毒时细胞密度、接毒量、收获

时间三个方面进行工艺优化,病毒的最佳培养工艺为 2.0×10^6/mL 密度,接种 0.1 MOI 病毒,接毒后 36 h 收获;或者 3.0×10^6/mL 密度,接种 1 MOI 病毒,接毒后 24 h 收获。考虑到生产实际控制准确性,确定细胞的接毒量为 0.1 MOI ~ 1 MOI,接毒时细胞密度为 2.0×10^6/mL ~ 3.0×10^6/mL,收毒时间为接毒后 24 h ~ 36 h。经过 50 L 生物反应器 3 个批次的工艺验证,培养的病毒含量均不低于 $10^{9.0}$ $TCID_{50}$/ml,说明 STS 全悬浮细胞适合伪狂犬病毒的培养,为生物反应器大规模生产猪伪狂犬病疫苗提供了技术支撑。

参考文献:

[1] 扈荣良. 现代动物病毒学[M]. 中国农业出版社, 2014: 618 - 620.
Hu R L. Modern animal virology [M]. China Agricultural Publishing House, 2014: 618 - 620.

[2] 宁宜宝. 兽用疫苗学[M]. 中国农业出版社, 2008: 245 - 252.
Nine Y B. Veterinary vaccine [M]. China Agricultural Publishing House, 2008: 245 - 252.

[3] Perdue M L, Arnold F, Li S, *et al*. The future of cell culture - based in fluenza vaccine production [J]. Expert Review of Vaccines, 2011, 10(8): 1183 - 1194.

[4] 平 玲, 魏园园, 王家敏, 等. 猪瘟疫苗的研究进展及 ST 细胞的研究现状[J]. 当代畜牧养殖业, 2014, 3(5): 3 - 5.
Ping L, Wei Y Y, Wang J M, *et al*. Research progress of swine fever vaccine and research status of ST cell[J]. Contemporary Livestock Farming, 2014, 3(5): 3 - 5.

[5] 余彬辉, 贾布拖, 贾志平, 等. 猪瘟病毒生物反应器低血清培养及其免疫效力检测[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 4(32): 412 - 414.
Yu B H, Jia B T, Jia Z P, *et al*. Low serum culture of swine fever virus in a bioreactor and test for immune potency[J]. Chin J Biologicals, 2019, 4(32): 412 - 414.

[6] 刘 萍, 崔 燕. MDCK 细胞悬浮培养驯化及其在增殖禽流感病毒H9 亚型中的初步应用[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(1): 184 - 190.
Liu P, Cui Y. Conversion of MDCK cells to suspension culture and preliminary application in the proliferation of avian influenza virus H9 subtype[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 28(1): 184 - 190.

[7] Chia Chu, Vladimir Lugovtsev, Hana Golding, *et al*. Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human siat7e gene and its application for influenza virus production[J]. Proc Natl Acad Sci, 2009, 106(35): 14802 - 14807.

[8] Chia Chu, Vladimir Lugovtsev, Andrew Lewis, *et al*. Production and antigenic properties of influenza virus from suspension MDCK - siat7e cells in a bench - scale bioreactor[J] Vaccine, 2010, 28(44): 7193 - 7201.

(编 辑:李文平)