

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.01.01

无血清全悬浮 PK15 细胞培养 猪圆环病毒 2 型的研究

刘天伦

(北京民海生物科技有限公司,北京 102609)

[收稿日期] 2021-08-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 01-0001-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为改进猪圆环病毒 2 型的培养工艺,驯化了一株可无血清培养的全悬浮 PK15 细胞用于培养猪圆环病毒 2 型,并对病毒的敏感性、接毒时间、接毒量、收获方法进行了试验。结果表明,用该细胞培养猪圆环病毒 2 型,如果采用批次收获,接毒时细胞密度为 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$,接毒量为 0.1 MOI,接毒 72 h 后收毒,病毒滴度能达到 $10^{6.4}$ TCID₅₀/mL;如果采用连续收获,接毒和带毒传代时均使细胞密度为 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$,接毒量为 0.04 MOI,收毒时间为接毒后 72 h,连续收获三次,病毒滴度分别为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL、 $10^{6.25}$ TCID₅₀/mL、 $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL,病毒滴度和收获液体积较为理想,可为大规模培养猪圆环病毒 2 型提供参考。

[关键词] 猪圆环病毒 2 型;PK15 细胞;全悬浮;无血清;连续收获

Study on Suspended PK15 Cells Culturing Porcine Circovirus Type 2 with Serum - free Medium

LIU Tian - lun

(Beijing Minhai Biological Technology Co., Ltd, Beijing 102609, China)

Abstract: In order to improve the culture of porcine circovirus type 2 (PCV2), a suspension PK15 cell line that could be cultured by serum - free medium was domesticated to culture PCV2. The virus sensitivity, the infection time, multiplicity of infection (MOI) and harvest methods were investigated. Results showed that when using 0.1 MOI of PCV2 to infect the domesticated suspension PK15 cell in the cell density of $0.5 \times 10^6/\text{mL}$, the titer of virus could reach to $10^{6.4}$ TCID₅₀/mL 72 hours after infection. In addition, when using 0.04 MOI of PCV2 to infect the domesticated suspension PK15, and continuous harvested three times, the virus titer 72 hours after infection could reach to $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL, $10^{6.25}$ TCID₅₀/mL, $10^{6.4}$ TCID₅₀/mL. In conclusion, this study could provide a reference for large - scale culture of PCV2.

Key words: porcine circovirus type 2; PK15 cells; suspension; serum free; continuous harvest

猪圆环病毒病是由猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 引起的病毒性传染病, 给养猪业造成巨大损失。研究表明, PCV2 仅在 PK15 等少数哺乳动物细胞上增殖, 且由于 PCV2 感染后细胞不破裂, 想要获得高病毒滴度难度较大^[1]。PCV2 体外培养特性适于在具有旺盛增殖能力并处于有丝分裂过程中的细胞上复制, 并且 PCV2 的复制依赖于细胞周期 S 期表达的各种细胞蛋白及酶^[1]。D-氨基葡萄糖一方面可以增强细胞 S 期蛋白的表达, 另一方面可以促进病毒 DNA 进入细胞核, 因此, D-氨基葡萄糖处理细胞可显著增强病毒的增殖能力^[2]。

目前, 应用 PK15 细胞进行 PCV2 的生产主要是采用转瓶和微载体工艺。转瓶存在占地空间大、劳动强度大等缺点。何锡忠等^[3]利用微载体技术培养 PK15 细胞生产 PCV2, 许冬等^[4]对片状载体培养 PCV2 也进行了工艺的研究, 但微载体工艺存在价格昂贵, 球状载体重复利用效果差, 放大培养繁琐等劣势。驯化一株可适应大规模培养且无血清全悬浮培养 PCV2 的 PK15 细胞, 势必可推进工艺的进一步升级。本研究对一株贴壁的 PK15 细胞进行了无血清全悬浮驯化, 然后进行了驯化后细胞对 PCV2 敏感性试验, 对接毒时间、接毒量以及收获方式进行了试验分析, 以期为大规模培养 PCV2 提供数据支撑。

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, PCV2 (DBN-SX07) 由大北农动物医学研究中心提供。

1.1.2 主要试剂和耗材 无血清悬浮培养基 PK15-H (M20317), 上海源培生物有限公司; D-氨基葡萄糖 (D-G), Sigma 公司; DMEM-F12 (12500-096), Gibco 公司; 新生牛血清 (04-102-1A), BI 公司; Anti-PCV2-MAB 12c.48 (圆环单克隆抗体), 韩国 JBT 公司; 羊抗鼠荧光抗体购自美

国 KPL 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, 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, Olympus 公司; Countstar 细胞计数仪, 上海睿钰生物科技有限公司; 低速冷冻离心机, 美国 Beckman 公司。

1.2 方法

1.2.1 PK15 细胞无血清全悬浮驯化 对一株贴壁的 PK15 细胞进行了无血清的全悬浮驯化, 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, 累计传代 23 次后, 该株细胞可在无血清全悬浮培养条件下, 初始密度为 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$ 时, 经 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^[5]。

1.2.2 PK15-S 细胞对 PCV2 敏感性实验 参考平面 PK15 细胞接毒工艺, 将驯化后的 PK15-S 细胞按 0.04 MOI 接毒, 接毒密度为 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$, 同时加入 2% D-G (V/V), 48 h、72 h 收获病毒, 收获后用间接免疫荧光法测定病毒滴度。

1.2.3 不同接毒时间对病毒滴度的影响 细胞初始密度 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$, 分别采用 0 h 接毒和 24 h 接毒的方式进行接毒实验的摸索, 按照 0.04 MOI 接毒的同时加入 2% D-G (V/V), 两种方法收获时间分别为病毒培养的 48 h 和 72 h, 收获后用间接免疫荧光法测定病毒滴度。

1.2.4 不同 MOI 对病毒滴度的影响 分别按 0.02 MOI、0.04 MOI、0.1 MOI 进行 0 h 接毒实验, 接毒细胞密度 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$, 接毒的同时加入 2% D-G (V/V), 收获时间均为 72 h, 收获后用间接免疫荧光法测定病毒滴度。

1.2.5 带毒传代连续收获产毒情况 由于感染 PCV2 的 PK15 细胞可带毒传代, 所以该驯化细胞也进行带毒传代, 接毒细胞密度 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$, 按照 0.04 MOI 接毒, 同时加入 2% D-G (V/V), 培养 72 h 后, 按传代比例收获病毒并带毒继续传代的方

法,连续收获三次,收获后用间接免疫荧光法测定病毒滴度。

1.2.6 病毒滴度的测定

1.2.6.1 收获液的处理 将摇瓶中收获的 PCV2 病毒液反复冻融 3 次后,1000 r/min 离心 5 min 后取上清液待检测。

1.2.6.2 检测 在 96 孔培养板中每孔加入 100 μ L 用含 8% 新生牛血清的 DMEM - F12 生长液制成的浓度为 2×10^5 /mL 的 PK15 细胞悬液,待细胞长至 24 h 左右,弃掉板内培养液,把待测的 PCV2 病毒悬液作 10 倍系列稀释,稀释液为加入含 2% D - G 的 2% 新生牛血清的 DMEM - F12,每个稀释度接种 6 个孔,每个孔 100 μ L;阴性对照 6 孔,加入制备好的细胞悬液 100 μ L;在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 96 h 后,取出孔板,弃掉孔内培养基,在通风橱内加入 200 μ L 80% 丙酮,放在 4 $^{\circ}$ C 固

定 1 h 后取出孔板,吸去孔内丙酮,用 PBS 洗涤 3 次/min,加入圆环单克隆抗体(工作浓度稀释倍数),每孔 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,取出用 PBS 洗涤 3 次/min,加入羊抗鼠荧光抗体(工作浓度稀释倍数)50 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,取出用 PBS 洗涤后镜检观察,待检样品出现绿色荧光为阳性,阴性对照无绿色荧光,按照 Reed - Muench 法计算病毒滴度。

2 结果与分析

2.1 PK15 细胞无血清全悬浮驯化 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 1),共 23 次传代,细胞状态良好,活率较高,可冻存保种。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 0.5×10^6 /mL 连续传 11 代,细胞长势良好,倍增时间稳定,结果见表 2。

表 1 驯化过程中的细胞情况

Tab 1 Cell conditions during domestication

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/h	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	0.97×10^6	/	少量
低血清悬浮	2%	9	摇瓶	1×10^6	48	3.79×10^6	96	多且大
无血清悬浮	2% ~ 0%	9	摇瓶	1×10^6	48	3.89×10^6	97	无

表 2 PK15 - S 细胞复苏后传代生长情况

Tab 2 PK15 - S Cells growth situation after recovered

培养时间/h	不同代次细胞密度/($10^6 \cdot mL^{-1}$)										
	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
24	1	1.02	0.9	0.96	1.01	1.02	0.92	1.04	1.06	1.21	0.92
48	2.2	2.43	2.13	2.64	2.47	2.33	2.27	2.36	2.1	2.33	2.67
72	4.43	3.89	4.48	4.27	3.43	3.95	3.8	4.05	3.81	4.18	4.69

2.2 PCV2 对 PK15 - S 细胞敏感性试验 细胞驯化完成后,需及时进行毒的敏感性试验,取复苏后传代 3 次的 PK15 - S 细胞进行接毒试验,毒种滴度为 $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL,细胞初始密度为 0.5×10^6 /mL,0 h 接毒,经过 72 h 的带毒培养,细胞仍可增殖至

4.24×10^6 /mL,收获时细胞活率为 94.6%,取 48 h、72 h 收获液用间接免疫荧光法测定病毒滴度分别为 $10^{4.5}$ TCID₅₀/mL、 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL,证实此 PCV2 对该驯化株 PK15 - S 仍有较好的敏感性,结果见表 3。

表 3 PCV2 对 PK15 - S 细胞敏感性情况

Tab 3 Sensitivity of PCV2 to PK15 - S Cells

初始密度/mL	MOI	接毒时间/h	接毒密度/mL	培养时间/h	细胞数量/mL	收获时 细胞活率/%	病毒滴度/(TCID ₅₀ · mL ⁻¹)	
							48 h	72 h
0.5 × 10 ⁶	0.04	0	0.5 × 10 ⁶	72	4.24 × 10 ⁶	94.60	10 ^{4.5}	10 ^{6.0}

2.3 不同接毒时间对病毒滴度的影响 为验证接毒的最佳时间,取两组复苏后传代三次的 PK15 - S 细胞,初始密度都为 0.5 × 10⁶/mL,分别在 0 h 和 24 h 进行接毒,分别培养 72 h 和 96 h,两组试验在 48 h 和 72 h 进行取样检测,0 h 接毒组病毒滴度分别为 10^{4.5} TCID₅₀/mL、10^{6.0} TCID₅₀/mL,24 h 接毒组

病毒滴度分别为 10⁴ TCID₅₀/mL、10^{4.5} TCID₅₀/mL, 试验最终收获时,两组细胞都有较高的活率,分别为 94.6%、97.0%。通过以上数据可以得出,该驯化株 PK15 - S 细胞 0 h 接毒培养滴度优于 24 h 接毒培养滴度,结果见表 4。

表 4 接毒时间对病毒滴度的影响

Tab 4 Effect of infection time on virus titer

初始密度 /mL	MOI	接毒时间/h	接毒密度/mL	培养时间/h	细胞数量 /mL	收获时 细胞活率/%	病毒滴度/(TCID ₅₀ · mL ⁻¹)	
							48 h	72 h
0.5 × 10 ⁶	0.04	0	0.5 × 10 ⁶	72	4.24 × 10 ⁶	94.60	10 ^{4.5}	10 ^{6.0}
0.5 × 10 ⁶	0.04	24	1.18 × 10 ⁶	96	4.97 × 10 ⁶	97.00	10 ^{4.0}	10 ^{4.5}

2.4 不同 MOI 对病毒滴度的影响 三组试验按不同 MOI 接毒后,培养 72 h,分别在 48 h 和 72 h 取样检测,0.02 MOI 组病毒滴度分别为 10^{4.4} TCID₅₀/mL、10^{5.4} TCID₅₀/mL,0.04 MOI 组病毒滴度分别为 10^{4.5} TCID₅₀/mL、10^{6.0} TCID₅₀/mL,0.1 MOI 组病毒滴度分别为 10^{5.4} TCID₅₀/mL、10^{6.4} TCID₅₀/mL。由表 5

可见,细胞培养至 72 h 后,前两组细胞密度都超过了 4.0 × 10⁶/mL,细胞活率都在 95% 左右,最后一组细胞密度和细胞活率都略低于前两组,密度为 3.45 × 10⁶/mL,活率为 90.5%。仅就滴度而言,MOI 为 0.1 时病毒滴度最高,可达 10^{6.4} TCID₅₀/mL。

表 5 MOI 对病毒滴度的影响

Tab 5 Effect of MOI on virus titer

初始密度/mL	MOI	接毒时间/h	接毒密度/mL	培养时间/h	细胞数量 /mL	收获时 细胞活率/%	病毒滴度/(TCID ₅₀ · mL ⁻¹)	
							48 h	72 h
0.5 × 10 ⁶	0.02	0	0.5 × 10 ⁶	72	4.22 × 10 ⁶	95.20	10 ^{4.4}	10 ^{5.4}
0.5 × 10 ⁶	0.04	0	0.5 × 10 ⁶	72	4.24 × 10 ⁶	94.60	10 ^{4.5}	10 ^{6.0}
0.5 × 10 ⁶	0.1	0	0.5 × 10 ⁶	72	3.45 × 10 ⁶	90.50	10 ^{5.4}	10 ^{6.4}

2.5 带毒传代连续收获产毒情况 当 MOI 为 0.1 时,72 h 细胞数和细胞活率均没有 MOI 为 0.04 的理想,故连续收获按照 0.04 MOI 接毒,接毒时细胞密度为 0.5 × 10⁶/mL,培养 72 h 后,按传代比例收获病毒并带毒继续传代的方法,在显微镜下观察带毒传代细胞,

细胞状态良好,轮廓清晰可见,结果见图 1;连续收获三次,收获样品用间接免疫荧光法测定病毒滴度分别为 10^{6.0} TCID₅₀/mL、10^{6.25} TCID₅₀/mL、10^{6.5} TCID₅₀/mL,三个代次收获的病毒液滴度均达到预期,结果见表 6,可采用连续收获方式进行病毒的收获。

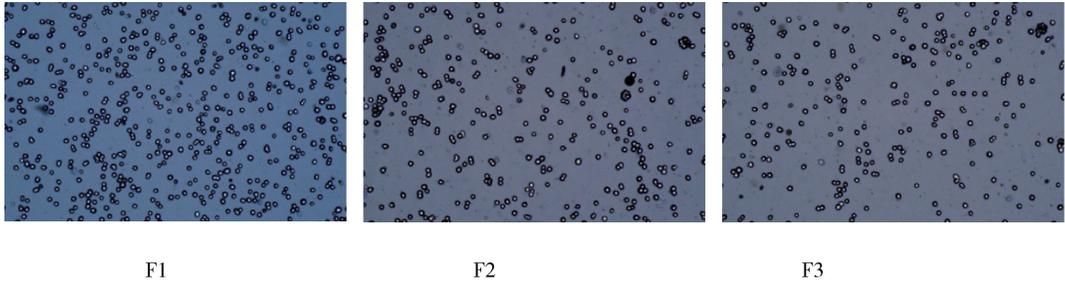


图 1 带毒传代细胞状态显微观察 (TB 染色, 40 ×)

Fig 1 State of the passaged cells with virus under a microscope (TB tyed, 40 times)

表 6 带毒传代连续收获产毒情况

Tab 6 Conditions of continuous harvest of passage with virus

带毒代次	MOI	接毒时间 /h	细胞数量/(10 ⁶ · mL ⁻¹)				72 h 病毒滴度 / (TCID ₅₀ · mL ⁻¹)
			0 h	24 h	48 h	72 h	
F1	0.04	0	0.5	1	2.27	4.24	10 ^{6.0}
F2	0.04	0	0.5	1.2	1.6	2.93	10 ^{6.25}
F3	0.04	0	0.5	0.88	1.38	2.41	10 ^{6.5}

3 讨论与结论

目前大规模培养 PCV2 的方法主要有转瓶和生物反应器微载体培养。转瓶工艺存在劳动强度大,需要温室配合,单位面积细胞可用率低等缺点,随着工艺的提升,滚瓶工艺也将逐渐被淘汰;微载体工艺虽说提升了细胞密度,也增加了培养基的使用效率,批间差异小,培养条件可控,但仍存在成本控制、放大传代消化等问题,且两种工艺均需要血清的添加,血清的添加不但使成本增加又存在血清的批间差异大、外源病毒引入、下游纯化去除等问题。因此,驯化一株可无血清全悬浮培养的 PK15 细胞用于培养 PCV2 可以将工艺进一步提升。

本文将一株贴壁 PK15 细胞经过 3 种培养方法的驯化,将其驯化为可全悬浮无血清培养的 PK15 细胞并命名为 PK15 - S,然后进行了 PCV2 接毒条件的摸索,对接毒时间、MOI、收获时间以及收获方式进行了试验分析。试验结果表明,该细胞培养 PCV2,采用批次收获时,接毒时细胞密度为 0.5 × 10⁶/mL,添加 2% D - G,接毒量为 0.1 MOI,收毒时间为接毒后 72 h,病毒滴度为 10^{6.4}TCID₅₀/mL;但如果采用连续收获,接毒和传代时均使细胞密度为

0.5 × 10⁶/mL,添加 2% D - G,接毒量为 0.04 MOI,收毒时间为接毒后 72 h,连续收获 3 代,病毒滴度分别为 10^{6.0} TCID₅₀/mL、10^{6.25} TCID₅₀/mL、10^{6.5} TCID₅₀/mL,病毒滴度和收获液体积较为理想。

通过本试验可知,带毒传代的细胞在需要传代的 72 h,细胞密度分别为 4.24 × 10⁶/mL、2.93 × 10⁶/mL、2.41 × 10⁶/mL,细胞密度呈降低趋势,除了第一代带毒细胞外,第二代、第三代均并未达到预期传代密度,虽说 PK15 感染 PCV2 后并不引起细胞的病变,但在本试验中随着带毒传代的次数增加,病毒对细胞的生长的确造成了一定的影响,说明仍需对带毒传代细胞的培养环境进行优化和改良,这也意味着第二代、第三代的病毒收获液体积的减少,在实际生产中将会造成产量下降问题。但就整体工艺而言,该株驯化 PK15 细胞培养 PCV2 的接毒培养条件和收获方式存在一定可操作性,可为大规模培养 PCV2 提供数据支撑。

参考文献:

[1] 刘鑫莹,李建华,李睿.微载体规模化培养 PK - 15 细胞增殖猪圆环病毒 2 型 LG 株的研究[J].兽医导刊,2018(15): 67 - 69.

- Liu X Y, Li J H, Li R. Study on PK15 scale culture porcine circovirus type 2 LG strains by Micro - carrier [J]. *Veterinary Orientation*, 2018(15): 67 - 69.
- [2] 严伟东, 李文洁, 李文涛, 等. 猪圆环病毒 2 型 WH 株的优化培养[C]//中国畜牧兽医学学会 2010 年学术年会——第二届中国兽医临床大会论文集(下册). 2010.
- Yan W D, Li W J, Li W T, *et al.* Optimal culture of porcine circovirus type 2 WH strains[C]//Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, 2010.
- [3] 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 Agricultural Shanghai*, 2010, 26(4): 149 - 151.
- [4] 许冬, 曹锋, 魏磊, 等. 猪圆环病毒 2 型片状载体悬浮培养生产工艺研究[J]. *中国兽医杂志*, 2019, 55(7): 98 - 101.
- Xu D, Cao F, Wei L, *et al.* Study on the production process of suspension culture of porcine circovirus 2[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2019, 55(7): 98 - 101.
- [5] 刘天伦, 郎洪彬, 孔飒. PK15 细胞的无血清全悬浮驯化研究[J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53(9): 12 - 18.
- Liu T L, Lang H B, Kong S. Domestication of a PK15 cell line to suspension culture by serum - free medium[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2019, 53(9): 12 - 18.

(编辑:李文平)