

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2016.03.16

应用 Cephodex 微载体规模化生产伪狂犬病疫苗的研究

梅建国^{1,2*}, 庄金秋^{1,2}, 管宇¹, 姚春阳¹, 魏凤¹, 马力¹, 李峰¹, 莫玲¹, 吴信明¹

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600; 2. 滨州贝尔凯瑞生物技术有限公司, 山东 滨州 256600)

摘要: 为实现伪狂犬病病毒(PRV)的大规模生产, 本研究应用 Cephodex 微载体悬浮培养 BHK-21 细胞, 通过对培养工艺的研究, 初步实现了病毒抗原的高效生产。整个过程采用流加方式和动物细胞微载体培养技术, 在细胞反应器中进行 BHK-21 高密度培养和 PRV 的高滴度增殖。结果表明, 微载体工艺比转瓶培养法获得的病毒液滴度高约 $10^{0.525}$ TCID₅₀/0.1 mL。因此, 应用 Cephodex 微载体悬浮培养 BHK-21 细胞在伪狂犬病疫苗规模化生产中具有重要的应用价值。

关键词: 生物反应器; 细胞培养; 微载体; 伪狂犬病毒; 疫苗

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2016)03-0240-05

A study on Cephodex microcarriers application for pseudorabies vaccine large-scale production

MEI Jian-guo^{1,2*}, ZHUANG Jin-qiu^{1,2}, GUAN Yu¹, YAO Chun-yang¹, WEI Feng¹, MA Li¹,

LI Feng¹, MO Ling¹, WU Xin-ming¹

(1. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou 256600, China;

2. Binzhou Bio-carrier Biotechnology Co., Ltd., Binzhou 256600, China)

Abstract: In the present study, the culture of BHK-21 cells with Cephodex microcarriers in bioreactor was investigated to achieve the mass production of pseudorabies virus (PRV), and high efficiency production of viral antigens was obtained with optimization of culture conditions. In the whole culture process, the microcarriers cell culture technology and feeding strategy were applied, which resulted in high cell density cultivation of BHK-21 cells and high titer proliferation of PRV in the bioreactor. The results indicated that the virus titer achieved with microcarriers technology was $10^{0.525}$ TCID₅₀/0.1 mL higher than that of roller bottle. Thus, the study of suspension culture of BHK-21 cells with Cephodex microcarriers has a potential application for the scale production of pseudorabies vaccine.

Key words: bioreactor; cell culture; microcarrier; Pseudorabies virus; vaccine

伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)可以感染多种家畜、禽类和野生动物, 可以感染不同年龄段的猪只, 死亡率高, 给畜牧业造成严重的经济损失^[1]。该病防控仍以疫苗接种为主, 相关疫苗产品

的供应和质量保证已成为该病防控的基础性保障。目前伪狂犬疫苗的生产仍以传统的转瓶工艺为主, 存在成本高、效率低、批间差异大、质量稳定性差等诸多缺点。生物反应器微载体悬浮培养技术具有

*Corresponding author

收稿日期: 2015-08-21

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2015GSF121027)

作者简介: 梅建国(1976-), 男, 湖北大冶人, 硕士, 助理研究员, 主要从事大规模细胞培养技术及动物疫苗的研究与开发。

* 通信作者: E-mail: mjxlmail@163.com

生产效率高、生产工艺稳定、过程可控性好、产品批间差异小等众多优点, 已成为未来生物制药细胞培养工艺的发展方向^[2]。细胞微载体培养技术以其兼有贴壁培养和悬浮培养两种技术优势, 是目前贴壁依赖性细胞大规模高密度培养领域最为重要的技术之一^[3]。Cephodex 型微载体是滨州贝尔凯瑞生物技术公司研制开发的一款新型细胞培养微载体产品, 具有生物相容性好、分离容易、回收简便、重复利用性好等优点, 适用于动物疫苗的规模化生产^[4]。因此, 本研究采用这一新型技术工艺培养 BHK-21 细胞生产 PRV 疫苗, 为高品质高效力疫苗的稳定性生产进行初步探索。

1 材料和方法

1.1 细胞和病毒株 BHK-21 细胞系和 PRV 疫苗株由山东省滨州畜牧兽医研究院生物技术重点实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器 DMEM 细胞培养基干粉购自 Invitrogen 公司; 优级新生牛血清购自兰州民海生物工程有限公司; 细胞培养级葡萄糖购自 Sigma 公司; 台盼蓝购自国药集团化学试剂有限公司; 20L Autoclavable Bioreactor 购自 Applicon 公司; SBA-40E 生物传感分析仪购自山东省科学院生物研究所; Cephodex 细胞培养微载体购自滨州贝尔凯瑞生物技术有限公司。

1.3 细胞复苏与扩增 按常规培养法^[5], 利用含 6% (v/v) 新生牛血清的 DMEM 培养液, 从 T25 细胞培养瓶到 3 L 转瓶的逐级放大培养, 转瓶细胞扩增比率为 1:3, 培养液体积为 500 mL。

1.4 反应器与微载体准备

1.4.1 反应器准备 按反应器罐体顶盖的气体、液体进出口设置, 结合本工艺的实际需求, 合理设计进料、出料、进气、出气管路及其布局。准备、连接和安装各个管路。检验 Temp 电极, 检验 DO 电极, 校正 pH 电极。

1.4.2 微载体准备 向反应器罐体内注入 5 L PBS, 称取 50 g Cephodex 细胞培养微载体放入 PBS 中, 充分搅拌使微载体于 PBS 中分散混悬。

1.4.3 培养系统灭菌与稳定性检验 将装有 PBS 和微载体的反应器罐体放入高压蒸汽灭菌柜中高压蒸汽灭菌 30 min, 待温度降至 80 °C 后, 取出罐体,

并将其与反应器控制台连接。以底部通气模式向罐体内以 100 cc/min 的流量持续通气, 开启搅拌桨, 并以 95 r/min 的速率连续搅拌, 罐体温度设为 37 °C, 过夜。次日, 待 DO 数据显示稳定后, 将其校正为 100%, 同时观察 DO 值是否变化, 如果恒定不变, 则 DO 电极校定成功。

1.5 BHK-21 细胞的反应器培养

1.5.1 细胞反应器接种 选取长成完好单层的转瓶细胞 4 瓶, 0.25% 的胰酶-EDTA 消化液消化后, 利用细胞培养液混悬, 对细胞悬液计数后, 按 1.5×10^9 个确定接种所需要细胞悬液体积, 并将细胞悬液接种入反应器罐体内, 边接种边搅拌, 搅拌速度为 110 r/min, 使细胞和载体充分混匀^[6]。注入细胞悬液后, 补充细胞培养液至培养体积 5 L。

1.5.2 细胞上球阶段培养 细胞上球贴壁阶段采用间歇搅拌模式, 每搅拌 2 min~3 min, 静置 30 min, 持续 8 h。搅拌速度设为 110 r/min, 温度设为 37 °C。

1.5.3 细胞-载体悬浮培养 间歇搅拌 8 h 后, 细胞进入细胞-载体悬浮培养阶段。进行连续搅拌模式, 以充分悬浮细胞-载体复合物, 防止细胞-载体成团。Air 采用表面通气, O₂、CO₂ 采取深层通气。各项参数设定如表 1 所示。

表 1 反应器控制参数
Table 1 The control parameter of the bioreactor

Temp (°C)	pH	DO (%)	Stir (rpm)	Air (cc/min)	O ₂ (cc/min)	CO ₂ (cc/min)
37	7.15	50	95	30	200	200

在细胞-载体生长阶段, 每 24 h 对罐内细胞进行取样, 观察细胞生长状态, 测定培养液中葡萄糖含量, 进一步把握细胞生长情况。根据上述糖含量测定结果, 当培养液中的葡萄糖含量低于 2 g/L 时, 及时向培养液中流加 200 g/L 的葡萄糖溶液 50 mL, 以满足细胞高密度生长时的营养需求。

1.6 PRV 增殖阶段培养

1.6.1 病毒接种 细胞在反应器内培养 72 h, 取样观察, 并细胞计数, 测定培养液中的细胞密度。通过测培养液葡萄糖含量, 观察细胞生长状态, 确定细胞糖耗已达到较高水平, 因此选择此时病毒接种较为合理。采用蠕动泵无菌接种 PRV 病毒悬液, 接种量按培养体积的 1% 定量, 约为 50 mL。

1.6.2 病毒增殖 病毒增殖培养阶段, 反应器各项控制参数不变。在病毒接种后 24 h、32 h、40 h、48 h 进行取样, 观察细胞生长状态, 进行病毒效价

测定,并测定培养液中糖含量,计算出各培养时间段的糖耗量。

1.6.3 病毒回收 根据细胞病变(CPE)和细胞代谢糖耗水平来判定反应器内病毒增殖状况。当CPE达70%以上,细胞糖耗达到峰值后开始下降时,进行病毒收获。

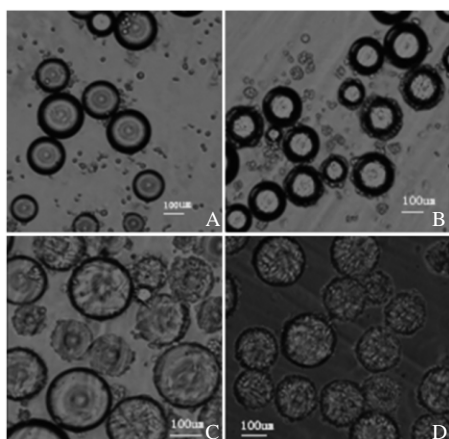
1.7 效价测定 通过对上述24 h、32 h、40 h、48 h 4个时间点的病毒样品进行TCID₅₀测定^[7],检测PRV回收液的病毒滴度,初步确定PRV回收的最佳时间^[6]。同批次PRV毒种利用常规转瓶培养法,在病毒感染细胞48 h后收获的病毒悬液,取样测定病毒液TCID₅₀,并与反应器收获的病毒液滴度进行比较,从而评价采用细胞反应器悬浮培养技术生产PRV的实际应用效果。

2 结果

2.1 BHK-21 细胞在微载体表面的生长状况 细胞-载体复合物在反应器内培养24 h、48 h和72 h后,每24 h取样,台盼兰活细胞计数法进行细胞计数^[8],结果如表2。各个时间阶段BHK-21细胞在Cephodex微载体上的生长状态如图1所示。

表2 BHK-21细胞在不同培养时间的细胞密度
Table 2 The density of BHK-21 cells at the different culture time

Hours after cells inoculation	0	24	48	72
The cell density ($\times 10^5$ cells/mL)	3.0	3.8	10.5	31.6



A: 8 h; B: 24 h; C: 48 h; D: 72 h

图1 在Cephodex微载体上不同培养时间的BHK-21细胞
Fig. 1 The BHK-21 cells on the Cephodex at different hours after inoculation

细胞-载体复合物培养至72 h, Cephodex微载体上的BHK-21细胞已长成致密的单层,已达到相

当高的细胞密度。甚至随着细胞的不断增长,一些载体表面由于细胞密度过大,部分细胞被挤出载体表面形成复层或多层,更加增大了培养液的细胞密度。

2.2 不同培养时间培养液葡萄糖含量的测定 BHK-21细胞在接种后,每隔24 h取样测培养液中葡萄糖含量,计算细胞糖耗量。另外,根据上述表2得到不同培养时间细胞密度,绘制反应器内BHK-21细胞的生长曲线。

结果显示,细胞-微载体复合物在反应器内悬浮培养至72 h,日糖耗量达到较高水平,为5.5 g/d(图2)。而此时反应器内的细胞密度也相应达到较高水平,为 3.2×10^6 cells/mL(图3)。通过图1D的显微镜观察分析,Cephodex微载体上已形成致密的细胞层。并且一些载体表面由于细胞密度过大,部分细胞被挤出载体表面而形成复层或多层。因此,72 h细胞密度基本达到最大,可以选择此时进行PRV接种。

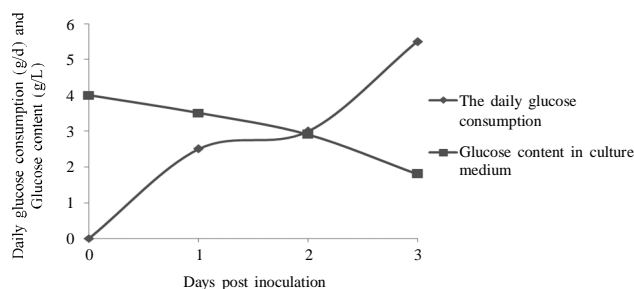


图2 培养液中葡萄糖浓度及细胞日糖耗量曲线
Fig. 2 Glucose content in culture medium and the BHK-21 cells daily glucose consumption in the different culture time

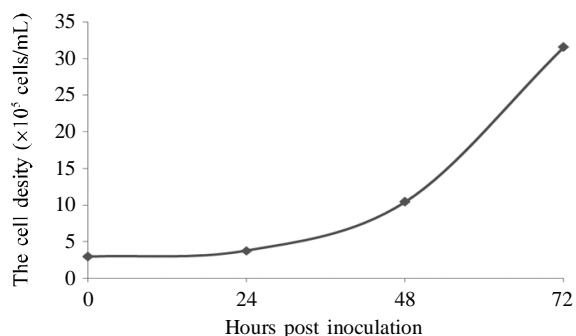
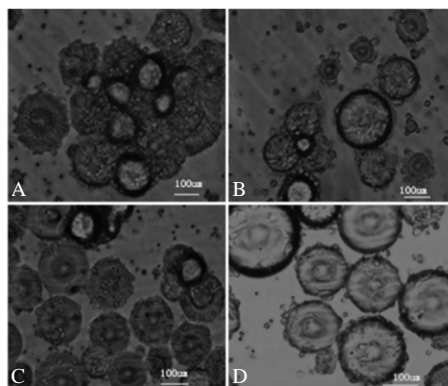


图3 反应器内BHK-21细胞的生长曲线
Fig. 3 The BHK-21 cells growth curve in the bioreactor

2.3 PRV在BHK-21细胞中增殖的研究

2.3.1 PRV感染后的CPE 细胞-微载体复合物在PRV接种后24 h,开始出现CPE,细胞变圆膨大,并从载体上脱落。继续培养至120 h,约70%以上的细胞产生CPE,并脱离载体。

BHK-21 细胞在感染 PRV 之前, 由于细胞密度的增大, 可以看到一些细胞 - 载体复合物聚集在一起, 出现成团现象。随着病毒的感染和增殖, 细胞出现 CPE 现象而从载体上脱离下来, 这些细胞 - 载体复合物团块也随之分解(图 4)。



A: 24 h; B: 32 h; C: 40 h; D: 48 h

图 4 BHK-21 细胞感染 PRV 不同时间产生的 CPE

Fig. 4 The CPE of BHK-21 infected by PRV at different hours

2.3.2 PRV 感染后 BHK-21 细胞的糖耗水平 由于病毒感染, BHK-21 产生 CPE 现象, 反应器内活细胞量也相应减少, 葡萄糖消耗水平也逐渐降低(表 3)。

表 3 细胞感染 PRV 后的糖含量测定及糖耗

Table 3 The glucose content of the culture and the glucose consumption of cells infected by PRV

Hours after infection	0	24	32	40	48
Glucose content in culture medium (g/L)	3.8	2.6	2.2	1.9	1.7
The cells glucose consumption (g)	0	6.0	3.0	1.5	0.5

根据细胞糖耗量水平, 绘制细胞在不同培养时间的糖耗曲线, 以判定反应器内的活细胞量变化趋势。结果显示当细胞培养至 120 h, 细胞日糖耗量开始下降(图 5)。

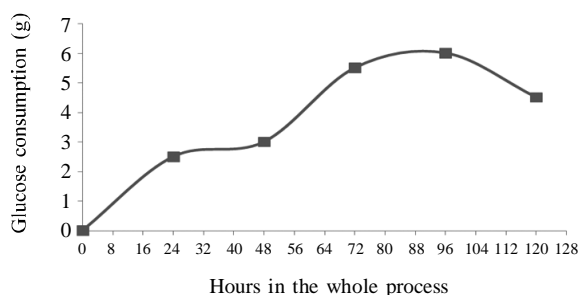


图 5 细胞不同培养时间的糖耗量变化曲线

Fig. 5 The cells glucose consumption in the different culture stages

另外, 病毒感染细胞后, 通过每 8 h 取样进行糖耗分析显示, 细胞在 PRV 感染 48 h 后, 糖耗量降到 1 g 以下(图 6)。结合图 4D 显微镜下观察到的

CPE 结果, 从而能较为准确地确定病毒收获时间为整个培养过程的 120 h, 即病毒感染细胞后 48 h。

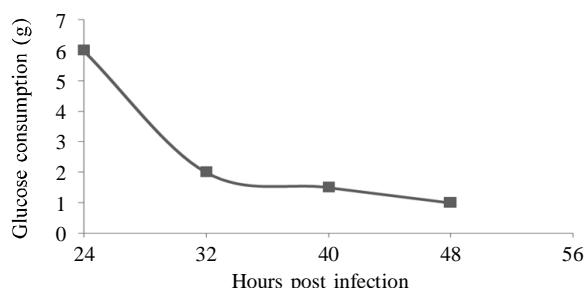


图 6 细胞感染 PRV 后的糖耗量变化曲线

Fig. 6 The glucose consumption curve of cells infected by PRV

2.3.3 培养液 PRV 滴度测定 分别对 BHK-21 PRV 感染 0 h、24 h、32 h、40 h、48 h 以及转瓶培养工艺病毒感染 48 h 获得的病毒液进行 TCID₅₀ 测定。结果显示, 应用反应器微载体悬浮培养技术进行 PRV 培养, 在病毒增殖 48 h 时滴度达到峰值, 此时取样测定病毒液 TCID₅₀ 结果为 10^{-7.625}/0.1 mL, 而转瓶培养的病毒液 TCID₅₀ 平均为 10^{-7.1}/0.1 mL, 即 PRV 病毒反应器微载体培养比传统的转瓶培养的病毒滴度要高约 10^{0.525} TCID₅₀/0.1 mL (表 4)。

表 4 反应器培养不同时间的病毒滴度及转瓶培养病毒滴度

Table 4 The PRV titers in bioreactor and roller bottle

The samples	Bioreactor					Roller bottle
	0 h	24 h	32 h	40 h	48 h	
TCID ₅₀	5.25	6.375	6.75	7.125	7.625	7.1

3 讨论

应用细胞反应器微载体悬浮培养技术进行疫苗生产, 具有灵活、快捷、便于控制等众多优点, 是未来疫苗产品大规模工业化生产工艺的发展方向^[8]。Cephodex 细胞培养微载体具有表面积大, 细胞相容性好, 可以很好地实现贴壁依赖性细胞的高密度培养, 从而大大提高生产效率和产品质量。由于细胞载体易于分离, 规模放大也较容易。而且该载体容易清洗, 可多次重复使用, 在疫苗和生物药品大规模工业化生产中将大大降低生产成本。这些均为新型技术工艺的成功应用提供了极大的方便。

本研究应用 Cephodex 型细胞培养微载体, 进行了 BHK-21 细胞的高密度悬浮培养生产 PRV 工艺的初步研究。整个细胞培养和病毒生产流程共计 120 h, 过程控制良好, 系统运行相对稳定。BHK-21 细胞

培养过程中,细胞密度可达 3.2×10^6 个/mL,约为转瓶工艺(细胞密度约为 1.2×10^6 个/mL)的3倍。反应器PRV回收液中病毒滴度比传统的转瓶工艺高约 $10^{0.525}$ TCID₅₀/0.1 mL。按病毒浓度计,也为转瓶工艺的3倍多。这些数据均已初步显示了Cephodex细胞培养微载体在密度培养BHK-21细胞生产PRV抗原方面取得了良好的效果。由于本研究只是对这一新型工艺做了初步探讨,如pH、DO、温度、微载体用量、细胞接种量、病毒接种量、各种气体通量等许多条件优化工作仍未深入研究,以致于技术优势并未得到应有的发挥。相信随着研究的不断深入,Cephodex微载体在大规模培养各种动物细胞进行疫苗生产方面将会取得更好的应用效果,具有更加广阔的发展空间。

参考文献:

- [1] Müller T, Hahn E C, Tottewitz F, et al. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective [J]. Arch Virol, 2011, 156(10): 1691-1705.
- [2] 梅建国, 庄金秋, 王金良, 等. 动物细胞大规模培养技术[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(7): 127-132.
- [3] Danielle M M, Jorg C G, Kacey G M. Bioreactors addressing diabetes mellitus [J]. J Diabetes Sci Technol, 2014, 8(10): 1227-1232.
- [4] 刘秋风, 曾令兵, 周勇, 等. 微载体规模化培养草鱼细胞与病毒的工艺及优化[J]. 淡水渔业, 2013, 43(4): 69-75.
- [5] 朱建春, 李勇, 王玉华, 等. 应用转瓶大规模培养杂交瘤细胞生产ABO血型单克隆抗体的工艺[J]. 中国生物制品学杂志, 2001, 14(1): 39-41.
- [6] 梅建国, 王玉茂, 王文秀, 等. 应用生物反应器生产高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原[J]. 动物医学进展, 2012, 33(11): 80-84.
- [7] 殷震, 刘景华. 动物病毒学(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [8] 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.

(本文编辑: 李 爽)