

梅建国, 庄金秋, 吴信明, 等. 新型 CephodexD 微载体在猪瘟病毒大规模增殖中的应用研究 [J]. 畜牧与兽医, 2018, 50 (8): 49-53.

Mei J G, Zhuang J Q, Wu X M, et al. A study on application of a new CephodexD microcarrier in large-scale multiplication of classical swine fever virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 50 (8): 49-53.

## 新型 CephodexD 微载体在猪瘟病毒大规模增殖中的应用研究

梅建国<sup>1,2</sup>, 庄金秋<sup>2,3</sup>, 吴信明<sup>2</sup>, 刘吉山<sup>2</sup>, 苗立中<sup>2</sup>, 张颖<sup>2</sup>,  
谢金文<sup>2</sup>, 林初文<sup>2</sup>, 王本琢<sup>4</sup>, 丁壮<sup>1\*</sup>

(1. 吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062;

2. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600;

3. 滨州贝尔凯瑞生物技术有限公司, 山东 滨州 256600;

4. 无棣县畜牧兽医局, 山东 无棣 251900)

**摘要:** 旨在应用新型 CephodexD 微载体悬浮培养 ST 细胞增殖猪瘟病毒。通过优化工艺条件初步实现了病毒抗原的大规模高效生产, 培养过程采用流加方式保证 ST 细胞的营养供应。用含 6% (v/v) 无牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 及其抗体的双阴牛血清 MEM 生长液培养 ST 细胞。当达到  $3.8 \times 10^9$  个细胞时, 接种入生物反应器中, CephodexD 微载体用量为 4 g/L。当反应器内 ST 细胞生长至 48 h, 接种猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV) 液。继续培养 4 d 后进行首次病毒收获, 之后每 3 d 收获 1 次, 直至第 5 次收获结束。整个培养过程持续 18 d, 细胞培养至 72 h, 密度可达  $2.8 \times 10^6$  cells/mL, 生产的 CSFV 滴度均在 100 万兔体反应量 (RID) /mL 以上。较现有的国家标准相比, 应用生物反应器和新型 CephodexD 微载体悬浮培养技术, 不仅病毒滴度提高了 1 倍, 而且整个生产周期缩短了 5 d, 大大提高了生产效率。因此, 本研究采用的新型微载体悬浮培养工艺在 CSFV 大规模生产中具有重要的应用价值。

**关键词:** ST 细胞; 猪瘟病毒; 微载体; 生物反应器; 悬浮培养

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2018)08-0049-05

## A study on application of a new CephodexD microcarrier in large-scale multiplication of classical swine fever virus

MEI Jianguo<sup>1,2</sup>, ZHUANG Jinqiu<sup>2,3</sup>, WU Xinming<sup>2</sup>, LIU Jishan<sup>2</sup>, MIAO Lizhong<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>2</sup>,  
XIE Jinwen<sup>2</sup>, Lin Chuwen<sup>2</sup>, Wang Benzhuo<sup>4</sup>, DING Zhuang<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;

2. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Institute, Binzhou 256600, China;

3. Binzhou Bio-carrier Biotechnology Co. Ltd., Binzhou 256600, China;

4. Wudi County Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Wudi 251900, China)

**Abstract:** In this study, a new type of CephodexD microcarrier was used to culture ST cells for producing classical swine fever virus. By optimizing the culture conditions, the high efficiency and large scale production of virus antigens were achieved. The fed-batch process ensured the nutrition of ST cells. Firstly, ST cells were cultured using the MEM growth liquid which contained 6% bovine serum with no BVDV and its antibody. When the number of ST cells reached  $3.8 \times 10^9$ , these cells were reinoculated into the bioreactor, in which the density of CephodexD microcarrier was 4 g/L. 48 hours later, the cells were infected with CSFV. The cell culture supernatant was reclaimed for the first time on the fourth day after viral infection, and then the virus was harvested once every three days until the end of the fifth harvest. The complete process lasted for 18 days, and the cell density reached  $2.8 \times 10^6$  cells/mL in 72 hours. Compared with the existing national standards, the titer of CSFV reproduced by the bioreactor and CephodexD microcarrier increased to two times and reached more than  $1 \times 10^6$  RID/mL. Moreover, the process was shortened by five days, which much improved the production efficiency. Therefore, the new microcarrier suspension culture technology in this study had important application in large-scale production of CSFV.

**Key words:** ST cells; classical swine fever virus; microcarrier; bioreactor; suspension culture

收稿日期: 2017-11-21; 修回日期: 2018-06-14

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, 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, E-mail: mjxlmail@163.com

\* 通信作者: 丁壮, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物传染病诊断与预防, 人兽共患传染病发病机制与快速诊断, E-mail: dingzhuang@jlu.edu.cn.

猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV) 培养一直以来是猪瘟疫苗研究和生产的关键技术之一。自 CSFV 的 ST 细胞培养技术建立以来,猪瘟传代细胞源活疫苗在猪瘟防疫上取得了很好的应用效果。目前猪瘟 ST 细胞源疫苗的生产仍以转瓶培养为主,落后的技术工艺使得产品稳定性欠佳,不同厂家的产品质量也差距较大。细胞微载体培养技术具有贴壁培养和悬浮培养双重技术优势,是贴壁依赖性细胞大规模培养的重要技术之一,也是未来生物制药细胞培养工艺的重要方向<sup>[1]</sup>。本研究应用新型 CephodexD 细胞微载体大规模高密度培养 ST 细胞增殖 CSFV,并通过反应器培养过程条件优化,建立一套适用于大规模生产高效猪瘟疫苗的新型微载体悬浮培养技术工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与病毒株

ST 细胞: 从 ST 细胞传代细胞系中筛选出的适合 CSFV 增殖的克隆细胞株。

CSFV 疫苗株: 经典猪瘟兔化弱毒疫苗中国 C 株。

以上种子用细胞和病毒株均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

MEM 培养基干粉购自南京三生生物公司; 无牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 双阴牛血清为内蒙古金源康生物工程有限公司产品; 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; CephodexD 型细胞培养微载体为滨州贝尔凯瑞生物技术有限公司产品。

ST 细胞生长液: MEM 培养液加入 6% (v/v) 的 BVDV 双阴牛血清; ST 细胞维持液: MEM 培养液加入 2% (v/v) 的 BVDV 双阴牛血清。

### 1.3 细胞扩增培养

T75 方瓶中的 ST 细胞生长 72 h 后,待细胞汇合度达 80% 以上,用 0.25% 的胰酶-EDTA 消化液消化,分散后按 1:3 的比率进行传代扩增,补充生长液至 15 mL,然后置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中静置培养。按 6 T75 方瓶接种入 1 个 3 L 转瓶中放大培养,转瓶亦按 1:3 的比率扩增,培养体积 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,合理安排进料、出料、进气、出气管路及其布局。检验 Temp 电极,检验 DO 电极,校正 pH 电极。

### 1.4.2 微载体准备

称取 60 g CephodexD 型细胞培养微载体置于 3 L 烧杯中,用 1 L 细胞培养级超纯水浸泡 48 h 以使载体充分膨胀,期间每隔 8~12 h 用超纯水清洗 1 次,抽干并换水。将膨胀好的微载体用等体积的无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 的 PBS 平衡 2 次,抽干。

### 1.4.3 反应器系统灭菌与检验

将平衡好的微载体移入反应器中并用 8 L PBS 混悬,115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。待温度降至 80 °C,连接反应器控制台。开启搅拌桨,搅拌速率为 65 r/min,罐体温度设为 37 °C。以底部通气模式向罐体内持续通空气,流量为 100 cc/min,过夜。待 DO 数据显示稳定,将其校正为 100%。

## 1.5 ST 细胞的生长培养

### 1.5.1 细胞反应器接种

按培养体积 15 L,接种密度 2.5×10<sup>5</sup> cells/mL 计算。将 14 个转瓶的 ST 细胞充分消化分散后,取 3.8×10<sup>9</sup> cells 接种入反应器内,以 90 r/min 的速度边注入边搅拌,使细胞和载体充分混匀,补充细胞生长液至 15 L。

### 1.5.2 细胞上球阶段培养

为提高细胞上球率,在反应器培养起始阶段通常采用沉降-悬浮-沉降法,以促进细胞在微载体上贴壁生长<sup>[2]</sup>。即细胞上球贴壁阶段采用间歇搅拌模式,每搅拌 2~3 min,静置 30 min,连续 3 次。然后,每搅拌 2~3 min,静置 60 min,连续 3 次。搅拌速度设为 65 r/min,温度设为 37 °C。

### 1.5.3 细胞-载体悬浮培养

间歇搅拌后,细胞进入细胞-载体悬浮培养阶段。在连续搅拌条件下,可充分悬浮细胞-载体复合物,防止细胞-载体成团。空气采用表面通气,氧气 (O<sub>2</sub>)、二氧化碳 (CO<sub>2</sub>) 采取深层通气,参数设定如表 1。

表 1 反应器控制参数

温度/°C	pH	溶氧/%	桨速/(r·min <sup>-1</sup> )	空气/(cc·min <sup>-1</sup> )	O <sub>2</sub> /(cc·min <sup>-1</sup> )	CO <sub>2</sub> /(cc·min <sup>-1</sup> )
37	7.20	50	65	30	150	150

ST 细胞-载体复合物在反应器内培养 24、48 和 72 h 后, 分别进行定量取样。离心弃上清, 加入适量胰酶-EDTA 消化液混悬, 37℃ 作用 10~20 min, 离心弃去消化液后加一定培养液吹打分散, 沉降 3~5 min 收集上层细胞悬液。反复加入少量培养液清洗微载体, 沉降收集上层细胞液直至载体上无细胞为止<sup>[2]</sup>。离心细胞悬液, 弃上清, 加原体积的培养液充分混悬, 并用台盼兰活细胞计数法测定各培养时间的 ST 细胞密度。

在 ST 细胞-载体生长阶段, 每 24 h 取样测糖含量, 观察细胞生长状态, 计算出各培养时间段的糖耗量。当培养液中葡萄糖含量低于 0.5 g/L 时, 及时向培养液中流加 200 g/L 的葡萄糖溶液 75 mL (合计补充 1.0 g/L 的葡萄糖), 以满足细胞生长的营养需求。

## 1.6 CSFV 增殖阶段培养

### 1.6.1 病毒接种

ST 细胞在反应器内培养 48 h, 取样观察, 细胞计数, 测定培养液中细胞密度。细胞在微载体上汇合度达 80% 以上, 更换细胞维持液。换液前停止搅拌 5~10 min, 使细胞-载体复合物自然沉降。换液后重新开启搅拌, 转速不变, 如表 1 所示。然后按培养体积的 5% (v/v) 的比例无菌接种 CSFV 细胞种毒约 750 mL<sup>[3]</sup>。

### 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, 如表 1。病毒接种后每 24 h 取样测糖含量, 观察细胞生长状态, 计算各培养时间段的糖耗量。当培养液中葡萄糖含量低于 0.5 g/L 时, 及时向培养液中流加 200 g/L 的葡萄糖溶液 75 mL (合计补充 1.0 g/L 的葡萄糖), 以满足细胞生长和病毒增殖的营养需求。

### 1.6.3 病毒收获

CSFV 接种后第 4 天进行首次收毒, 此后每 3 d 收获一次, 直至第 5 次收 (即病毒接种后第 16 天) 毒收获结束。每次收获病毒前取样观察细胞生长状态, 测定培养液中糖浓度, 并取样测病毒效价。

## 1.7 效价测定

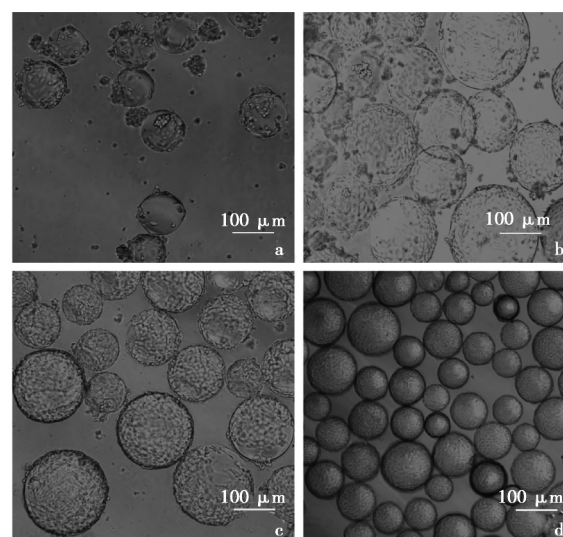
CSFV 病毒含量测定采用对兔的最小感染量计算。取各收次 CSFV 收获液按规定倍数稀释, 分别接种家兔 2 只, 然后测体温。其中定型热反应以 “++” 表示, 轻热反应以 “+” 表示, 无反应以 “-” 表示, 具体操作按中华人民共和国农业部第 1719 号公告附件 2 所述的猪瘟活疫苗 (传代细胞源) 制造及检验试行规程中的方法进行<sup>[4]</sup>。按时做好观察和记录, 根据兔体温反应与攻毒结果综合判定病毒效价。

## 2 结果

### 2.1 ST 细胞生长培养

#### 2.1.1 细胞生长状态

细胞-载体复合物在反应器内培养 4、24、48 和 72 h, 分别取样于显微镜下观察。ST 细胞接种后 4 h, 约 60% 以上的细胞均能很好地在 CephodexD 微载体表面铺展生长。培养 24 h 后, 细胞基本都能在微载体上形成单层, 培养液中很少有游离的细胞。而培养 48 h 后, CephodexD 微载体表面的细胞汇合度可达 80% 以上。培养至 72 h, 微载体表面已长成致密的细胞单层, 如图 1 所示。



a. 4 h; b. 24 h; c. 48 h; d. 72 h

图 1 ST 细胞在 CephodexD 微载体上生长状态

从图 1 可见, ST 细胞在 CephodexD 微载体表面分布均匀, 呈现良好的生长能力。而且细胞-载体复合物分散性很好, 基本没有成团现象。这些都对后续 CSFV 感染与增殖形成十分有利的环境条件。

#### 2.1.2 细胞密度测定

对各培养时间的 ST 细胞密度测定结果表明, 细胞生长至 72 h 达到的最高密度为  $28.1 \times 10^5$  cells/mL。从图 2 可以看出, ST 细胞在接种后 24 h 内生长较为缓慢。24 h 后进入快速生长期, 至 48 h 细胞密度为  $21.6 \times 10^5$  cells/mL, 已达到了一个较高的水平, 之后细胞生长也较为缓慢。

#### 2.1.3 细胞糖耗水平

图 3 糖耗结果表明, 细胞在最初的 24 h 内, 糖耗量相对较少, 随着细胞的生长逐渐增加。培养至 48 h, 葡萄糖消耗逐渐达到一个较高水平, 之后增长缓慢并接近峰值。

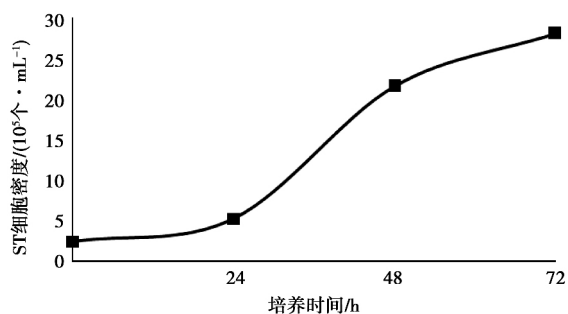


图2 反应器中不同培养时间的 ST 细胞密度

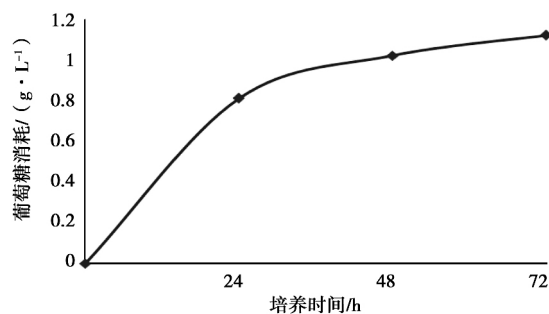


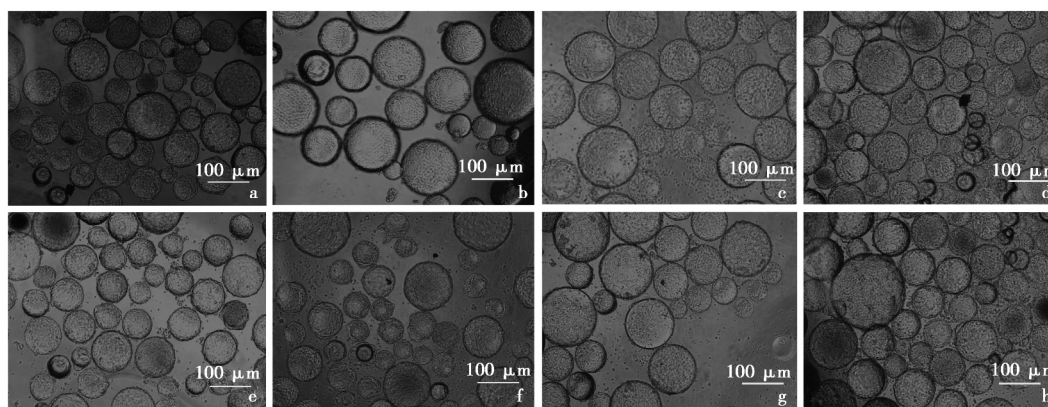
图3 反应器中细胞生长培养阶段的日糖耗量曲线

## 2.2 CSFV 增殖研究

### 2.2.1 细胞生长状态

CSFV 对 ST 细胞不产生病变效应。但在接毒 2 d

后, 培养液中的细胞碎片开始明显增多。直至第 4 天的首次病毒收获, 培养液中存在大量细胞碎片, 如图 4a~d 所示。



a. 1 d; b. 2 d; c. 3 d; d. 4 d; e. 7 d; f. 10 d; g. 13 d; h. 16 d

图4 ST 细胞在 CSFV 增殖过程中的状态变化

不仅如此, 在后续病毒收获的 2~5 个收次中, 每个收次的细胞碎片都较前一个收次更多。直至第 5 收, 微载体上开始有细胞脱落现象, 表明 ST 细胞由于 CSFV 的大规模增殖而大量死亡, 如图 4e~h。由此可见, CSFV 的感染增殖并非不导致 ST 细胞死亡, 只是死亡的速度较为缓慢, 或没有特征性病变。

### 2.2.2 细胞糖耗水平

在 CSFV 增殖过程中, 特别是在各次病毒收获后期, 都有大量细胞死亡, 产生组织碎片。在葡萄糖消耗方面, 表现为细胞糖消耗水平随培养时间而下降, 如图 5 所示。

并且在每一个病毒收获周期, 由于细胞死亡导致糖耗也逐渐下降。而在每次收毒时, ST 细胞的糖耗水平降至最低, 这也说明了 CSFV 增殖过程中, 细胞死亡使得细胞数量下降是确实存在的。从整个生产周期看, 病毒收获时间为 16 d, 与现行国家标准制造规

程病毒收获时间 21 d 相比, 生产过程缩短 5 d。

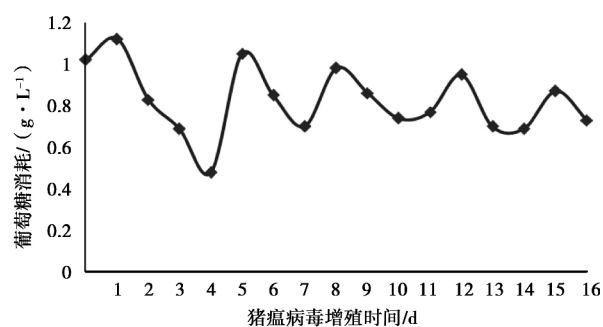


图5 ST 细胞在 CSFV 增殖过程中的糖耗水平

## 2.3 病毒效价测定

将不同收次收获的 CSFV 悬液分别按 50 万和 100 万倍稀释, 耳静脉注射家兔 2 只, 记录兔体热型反应, 测定病毒滴度水平, 如表 2。

表2 各收次收获的CSFV效力检验

稀释倍数 ( $\times 10^4$ )	病毒收次									
	1 <sup>th</sup>		2 <sup>th</sup>		3 <sup>th</sup>		4 <sup>th</sup>		5 <sup>th</sup>	
	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100
兔体反应热型	++/++	+ /++	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++	+ /++	++/+	++/+

由表2可见,将各收次的CSFV液50万倍和100万倍稀释后注射家兔,呈现良好的定型热反应。因此,每个收次的CSFV效价均在100万RID/mL以上,明显高于传代细胞源猪瘟活疫苗制造50万RID/mL的国家标准<sup>[4]</sup>。

### 3 讨论

细胞密度和糖耗量测定出的数据准确反映了细胞生长过程的动态变化(图1、图3),对后续的细胞生长趋势判定以及病毒接种时间把握具有重要的参考价值。由于病毒接种后的首次收毒至少在3d后,高密度培养条件产生的大量乳酸、氨等代谢产物加速了ST的凋亡<sup>[5]</sup>。另外,细胞在接种病毒后,培养液中会有大量组织碎片产生,也可能是由于病毒在细胞内的大量复制使得细胞加速衰老死亡所致<sup>[6-7]</sup>。因此,选择细胞在反应器内生长培养48h接种CSFV,可以保证较高的细胞密度,又尽可能防止细胞较快衰亡,应是一种较为合理的选择<sup>[8]</sup>。

新型CephodexD型细胞微载体表面接枝有羟基、羧基和氨基等基团,具有较为稳定均衡的电荷分布。微载体在生理pH条件下具有良好的细胞相容性,在Vero、BHK-21、MDCK等多数哺乳动物细胞的悬浮培养中表现出良好的细胞黏附和生长能力,是一种通用型细胞培养微载体。由于CephodexD型微载体无需硅化等繁琐处理过程,在大规模生产中更具实用性。在ST细胞源猪瘟活疫苗生产中,ST细胞的大规模培养已成为一项关键技术,而细胞培养微载体的选用则直接决定这一技术的成败以及整个生产工艺的可行性和实用性。因此,新型CephodexD细胞微载体培养条件下的ST细胞生长能力和CSFV的增殖水平,便成为生产工艺研究的首要内容。

本研究通过对细胞接种密度、病毒接种时间和接种量、葡萄糖流加以及反应器过程参数等环节的调控策略进行优化,取得了较为理想的应用效果。通过对反应器培养过程的取样监测和反应器培养条件的反馈

调节,可以实现生产过程的自动化。以CephodexD微载体为基础的新型动物细胞悬浮培养技术工艺,初步研究结果较为理想,取得的各项数据指标可以为后续CSFV的大规模工业化生产提供重要的参考依据。由于本研究所采用的反应器规模较小,与工业化生产用大型生物反应器还有一定差距。因此,工艺过程和参数调控仍有待进一步考察和验证。另外,培养过程的实时监测技术和方法也有待进一步提高。而且在CSFV大规模工业化生产中,反应器规模的级联放大仍是一个亟待解决的技术难题<sup>[9]</sup>,今后需在这一领域开展大量研究工作。

### 参考文献:

- [1] 庄金秋,梅建国,马力,等.微载体培养技术在猪用病毒性疫苗研制中的应用进展[J].养猪,2016(2):124-128.
- [2] 梅建国,庄金秋,管宇,等.应用Cephodex微载体规模化生产伪狂犬病疫苗的研究[J].中国预防兽医学报,2016,38(3):240-244.
- [3] 郑朝朝,柳珊,邹立宏,等.激流灌注式生物反应器培养猪瘟活疫苗工艺的研究[J].中国动物保健,2016,8(2):62-64.
- [4] 中华人民共和国农业部.中华人民共和国农业部公告第1719号[Z].北京:中华人民共和国农业部,2012.
- [5] 陈以衡.低血清微载体悬浮体系生产ST细胞源CSFV工艺的开发与研究[D].上海:华东理工大学,2016.
- [6] 张鑫,时洪艳,徐佳.猪瘟病毒衣壳蛋白与宿主细胞核仁素蛋白相互作用[J].中国预防兽医学报,2015,37(6):430-433.
- [7] Kang K, Lin Z, Gao H, et al. Classical swine fever virus promotes cell autophagy which facilitates virus proliferation [J]. Acta Veterinaria Zootechnica Sinica, 2014, 45 (9): 1481-1487.
- [8] Liang W, Fang J, Lin Z, et al. Classical swine fever virus entry into ST cells by clathrin-mediated endocytosis pathway [J]. Acta Veterinaria Zootechnica Sinica, 2017, 48 (1): 140-149.
- [9] 孙振鹏,李欢,孙燕,等.生物反应器内微载体培养细胞的胰酶消化放大技术[J].中国生物制品学杂志,2015,28(6):628-632.