

## 应用新型 CephodexD 微载体培养 ST 细胞增殖 CSFV

梅建国<sup>1,2,3</sup>, 庄金秋<sup>2,3</sup>, 吴信明<sup>2</sup>, 苗立中<sup>2</sup>, 庄夕栋<sup>4</sup>, 谢金文<sup>2</sup>, 张颖<sup>2</sup>, 李峰<sup>2</sup>, 刘吉山<sup>2</sup>, 王金良<sup>2</sup>, 丁壮<sup>1\*</sup>, 沈志强<sup>2\*</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.诸城市畜牧兽医管理局, 山东 诸城 262200)

**摘要:**应用新型 CephodexD 微载体悬浮培养 ST 细胞增殖猪瘟病毒(CSFV), 并与常规单层静置培养法进行比较。新型微载体悬浮培养的 ST 细胞密度 72 h 可达  $18.9 \times 10^5$  cells/mL, 是单层静置培养工艺的 2 倍以上; 病毒滴度最高可达  $7.5 \times 10^5$  RID/mL, 较单层静置培养法提高了 50%; 在一个生产流程中, 能比传统培养工艺多收获 2 次合格病毒液。而且, 采用新型微载体悬浮培养工艺生产的 CSFV, 能够刺激猪体产生特异性的中和抗体, 对猪的保护率达 100%, 具有很好的免疫原性。因此, 新型微载体悬浮培养工艺较单层静置培养法更有技术优势, 在 CSFV 大规模生产领域具有重要的应用价值。

**关键词:**ST 细胞; 猪瘟病毒; 细胞微载体; 悬浮培养

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 1005-4545(2018)01-0165-06

DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2018.01.26

## The cephodexD microcarrier application to ST cells culture for the CSFV production

MEI Jian-guo<sup>1,2,3</sup>, ZHUANG Jin-qiu<sup>2,3</sup>, WU Xin-ming<sup>2</sup>, MIAO Li-zhong<sup>2</sup>, ZHUANG Xi-dong<sup>4</sup>, XIE Jin-wen<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>2</sup>, LI Feng<sup>2</sup>, LIU Ji-shan<sup>2</sup>, WANG Jin-liang<sup>2</sup>, DING Zhuang<sup>1\*</sup>, SHEN Zhi-qiang<sup>2\*</sup> (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Institute, Binzhou, Shandong 256600, China; 3. Binzhou Bio-carrier Biotechnology Co., Ltd., Binzhou, Shandong 256600, China; 4. Zhucheng Animal Husbandry & Veterinary Bureau, Zhucheng, Shandong 262200, China)

**Abstract:** A new type of cephodexD microcarrier was used to culture ST cells for the classical swine fever virus(CSFV) reproduction, and the results were compared with those of conventional monolayer culture. At 72 h, up to  $18.9 \times 10^5$  cells/mL in microcarrier suspension culture, the cell density was two times than a static monolayer cultivation process. Compared with the monolayer culture, the virus titer was up to  $7.5 \times 10^5$  RID/mL in microcarrier suspension culture, increased by 50%. In one production process, more than two batch of qualification CSFV product could be harvested compared with traditional culture method. The CSFV produced by the new microcarrier suspension culture technology could stimulate the specific neutralizing antibody in pigs, and the protective rate was 100%. Therefore, it possessed a satisfied immunogenicity. The new microcarrier suspension culture process is superior to the monolayer culture method with an important application value in the field of CSFV large-scale production.

**Keywords:** ST cells; classical swine fever virus; cell microcarrier; suspension culture

\* Corresponding authors, E-mail: mjxlmail@163.com; dingzhuang@jlu.edu.cn

收稿日期: 2016-08-24

基金项目: 山东省重点研发计划资助项目(2015GSF121027)

作者简介: 梅建国(1976-), 男, 助理研究员, 硕士。

\* 通讯作者, E-mail: mjxlmail@163.com; dingzhuang@jlu.edu.cn

猪瘟是猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起的猪的一种急性、高度接触性传染病。该病防控仍以疫苗接种为主,疫苗产品的质量已成为该病防控的重要保障。目前猪瘟 ST 细胞源疫苗的生产仍以传统的转瓶培养为主,存在效率低、批间差异大、质量稳定性差等诸多缺点<sup>[1]</sup>。细胞微载体培养技术以其兼有贴壁培养和悬浮培养 2 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<sup>[2]</sup>。该技术具有生产效率高、生产工艺稳定、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<sup>[3]</sup>。近年来,微载体悬浮培养技术在 CSFV 的大规模生产领域已逐渐得到应用和发展。漆世华等<sup>[4]</sup>将微载体悬浮培养技术与细胞反应器技术相结合,建立了一套稳定高效的猪 ST 细胞活疫苗生产工艺。王延辉等<sup>[5]</sup>采用微载体悬浮培养技术规模化高密度培养对 CSFV 疫苗株高敏感的 STK 克隆化细胞株增殖 CSFV,可使病毒滴度达到  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/mL。本研究采用滨州贝尔凯瑞生物技术有限公司最新研发的 CephodexD 型细胞培养微载体培养 ST 细胞增殖 CSFV,并与同等条件下的单层培养法进行比较,研究建立适用于大规模生产高品质、高效力猪瘟疫苗的技术工艺。

## 1 材料与方 法

**1.1 细胞与病毒株** ST 细胞传代细胞系中筛选出的适合 CSFV 增殖的克隆细胞株;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** MEM 培养基干粉购自南京三生生物公司;CSFV 培养专用双阴牛血清购自南京三生生物公司;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;Minitron CO<sub>2</sub> 细胞培养摇床购自瑞士伊孚森生物技术有限公司;SBA-40E 生物传感分析仪购自山东省科学院生物研究所;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;50 mL 螺旋盖玻璃三角瓶为德国肖特公司产品;CSFV 抗体 ELISA 检测试剂盒为美国爱德士公司(IDEXX)产品。

培养基:ST 细胞生长液, MEM 培养液加入 6% (v/v)的 CSFV 培养专用双阴牛血清;ST 细胞维持液, MEM 培养液加入 2% (v/v)的 CSFV 培养专用

双阴牛血清。

**1.3 ST 细胞复苏与常规扩增** 从种子库中取出 ST 细胞 1 支,于 37℃ 水浴中融化后常温 1 000 r/min 的转速离心 5 min。弃去上清,用 ST 细胞生长液重悬细胞。将重悬的 ST 细胞无菌转移至 T75 方瓶中,补充生长液至 15 mL,然后置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中静置培养。待生长 72 h 后,细胞汇合度达 80% 以上,用 0.25% 的胰酶-EDTA 消化液消化后,按 1:3 的比率进行传代扩增。每 24 h 取 1 瓶观察细胞生长状态,测定培养液中葡萄糖含量,进行细胞计数,进一步把握细胞生长情况。

### 1.4 微载体培养

**1.4.1 微载体准备** 称取 4×0.04 g CephodexD 型细胞培养微载体置于 4 只 50 mL 三角摇瓶中,每瓶用 5~10 mL 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 清洗 2 次,抽干。用适量(半量培养体积)的 PBS 后混悬微载体,115℃ 高压蒸汽灭菌 30 min。灭菌后,待温度降至 80℃ 左右充分摇匀混悬,以防止载体结团。将灭菌好的微载体更换无菌 PBS 溶液,并向微载体 PBS 混悬液中加入适量的细胞生长液,37℃ 孵育 24~72 h 进行无菌检验。

**1.4.2 ST 细胞接种与上球** 将无菌检验合格后的微载体,弃去检验液,持留微载体,备用。将 T75 瓶中长成完好单层的 ST 细胞用胰酶消化、吹打分散,按  $3 \times 10^6$  个/瓶的细胞量接种入摇瓶中,补充 ST 细胞生长液至 10 mL,放入 CO<sub>2</sub> 细胞培养摇床中培养。接种后 0~6 h 为间歇低速振荡<sup>[6]</sup>,每 30~60 min 振荡 1 次,每次 1~2 min,摇床参数设定如表 1。

表 1 间歇振荡阶段时的摇床参数

<i>t</i> /℃	CO <sub>2</sub> /%	转速/(r·min <sup>-1</sup> )	Shaker On/Off/min
37	5	55	3×(1/30) 4×(1/60)

**1.4.3 微载体悬浮培养** 间歇振荡 6 h 后,ST 细胞进入细胞-微载体悬浮培养阶段。进行连续振荡模式,以充分悬浮细胞-载体复合物,防止细胞-载体成团。CO<sub>2</sub> 细胞培养摇床控制参数设定如表 2 所示。

表 2 连续振荡阶段摇床参数

<i>t</i> /℃	CO <sub>2</sub> /%	转速/(r·min <sup>-1</sup> )	Shaker On/Off(min)
37	5	60	ON

在 ST 细胞-载体生长阶段,每 24 h 取 1 摇瓶对

细胞进行取样,观察细胞生长状态,测定各摇瓶培养液中葡萄糖含量,进一步把握细胞生长情况。测定 MEM 培养液中葡萄糖的起始质量浓度为 1.0 g/L,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 190 g/L 的葡萄糖溶液 52.6  $\mu$ L,以满足细胞高密度生长时的营养需求。

### 1.5 CSFV 增殖与收获

**1.5.1 病毒接种** 取 T75 方瓶和三角摇瓶 ST 细胞各 2 瓶,ST 细胞汇合度达 70% 时可进行病毒接种。ST 细胞在摇瓶或 T75 方瓶内培养 48 h,取样观察,其中 1 瓶细胞计数,测定培养液中的细胞密度。通过测培养液葡萄糖含量,观察细胞生长状态弃去细胞生长液,按培养体积的 3% (v/v) 接种 CSFV 病毒液。并将摇瓶和方瓶放入 37 $^{\circ}$ C 吸附 30 min 后,摇瓶补加 ST 细胞维持液至 10 mL,方瓶补加维持液至 15 mL,然后将摇瓶和方瓶分别置于摇床和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**1.5.2 病毒增殖** 病毒增殖培养阶段,摇床各项控制参数不变(表 2)。在病毒接种后每 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。按 1.4.3 及时补充葡萄糖,以满足细胞生长和病毒增殖的营养需求。

**1.5.3 病毒收获** CSFV 接种后第 5 天分别对摇瓶和方瓶进行首次病毒收获,此后每 4 d 收获 1 次,直至第 5 收(即病毒接种后第 21 天)病毒收获结束。每次收获病毒前观察细胞生长状态,取样测培养液中糖质量浓度,取样测病毒效价。

**1.6 CSFV 效价测定** 本研究做的 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 1.2 毒种标准、3.4 半成品检验及 4.7 效力检验规定的方法进行<sup>[7]</sup>。兔体反应热型测定亦按照该规程要求的方法来操作,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。

**1.7 免疫原性测定** 将微载体培养工艺的 2,3,4 3 个收次的 CSFV 收液等量混匀后稀释 75 万倍,单层静置培养的 2,3,5 3 个收次的 CSFV 收液等量混匀稀释 50 万倍,分别肌肉注射无猪瘟中和抗体的健康猪各 5 头,每头 1.0 mL。同时,设对照组猪 5 头,每

头接种含 2% FBS 的细胞培养液 1.0 mL。并于接种后 14 d 采血,测定各试验组和对照组猪的猪瘟抗体水平。采血后连同对照猪 5 头,各注射含量为 10<sup>5.0</sup> MLD(最小致死量)的 CSFV 石门系血毒 1.0 mL/头,观察 16 d。记录猪只临床症状、体温状况、发病情况、死亡头数,具体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 1.2 毒种标准进行<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

**2.1 2 种不同工艺培养的 ST 细胞** 分别对单层培养和微载体培养的 ST 细胞每 24 h 取样,台盼兰活细胞计数法做细胞计数<sup>[8]</sup>,结果如表 3。各个时间阶段 ST 细胞在 CephodexD 微载体上的生长状态如图 1 所示。

表 3 2 种不同培养方法 ST 细胞在不同培养时间的细胞密度

培养方法	0 h	24 h	48 h	72 h
静态单层培养/( $\times 10^5$ cells $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	3.0	3.9	6.8	7.6
微载体悬浮培养/( $\times 10^5$ cells $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	3.0	5.1	14.3	18.9

ST 细胞在方瓶中静置培养时,72 h 细胞长成致密单层,最高密度达 7.6 $\times 10^5$  cells/mL,微载体悬浮培养条件下,由于表面积的增加,72 h 细胞密度可达 18.9 $\times 10^5$  cells/mL。因此,同等条件下细胞密度后者是前者的 2 倍以上。

**2.2 2 种不同工艺条件下 ST 细胞的糖耗水平** 在微载体摇瓶悬浮培养和 T75 方瓶单层静置培养条件下,接种 CSFV 病毒以及无病毒空白对照组 ST 细胞,各组细胞的葡萄糖消耗水平均存在明显差异。在每个收获周期,微载体悬浮培养组的糖耗最高,而空白对照组糖耗则最低。其中糖耗以每个收获周期所产生的葡萄糖质量浓度(g/L)变化量之和计算,具体如图 2 所示。

由于微载体悬浮培养组细胞量大于单层静置培养组,再加上病毒增殖所需的能量物质也较多,因此前者葡萄糖消耗明显高于后者。而单层培养病毒增殖组的糖耗高于空白对照组应该源于前者病毒增殖产生的葡萄糖消耗,这些从图 2 显示的实际结果基本与理论水平相符。

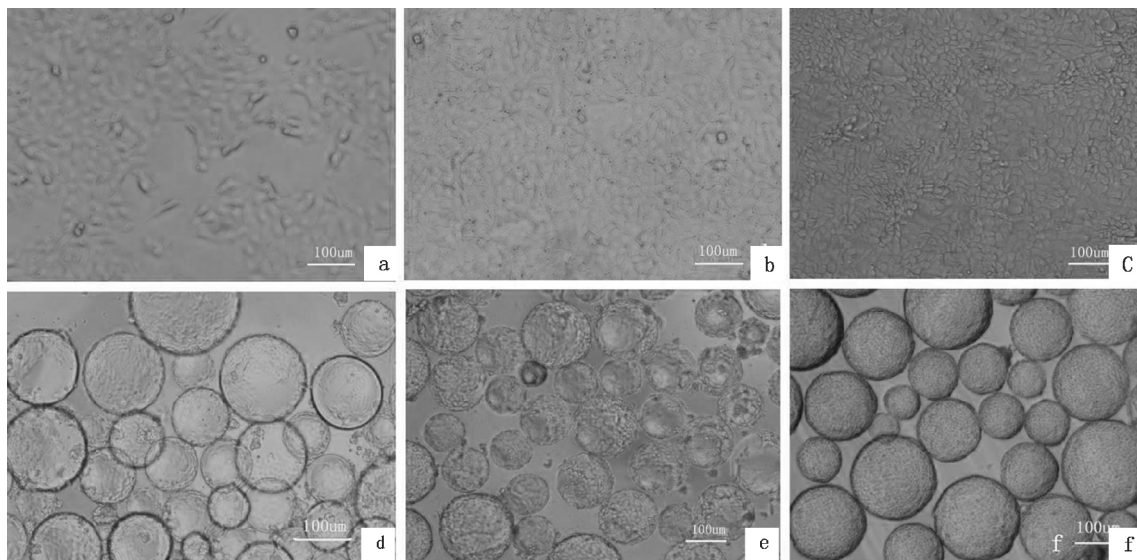


图1 2种不同工艺培养的ST细胞 a,b,c.单层静置培养的ST细胞;d,e,f.微载体悬浮培养的ST细胞;a,d.24 h;b,e.48 h;c,f.72 h

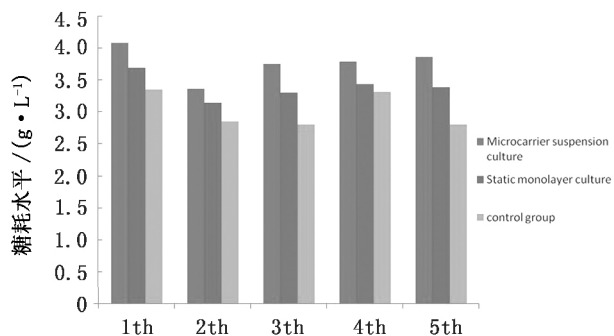


图2 不同工艺条件下ST细胞单次病毒收获的糖耗水平

细胞无致细胞病变效应(CPE),因此在CSFV感染增殖的整个过程中并没有特征性病毒蚀斑或病灶产生。但由于培养时间延长,细胞数量仍有一定增长,且会出现自然凋亡,因此在单层静置培养模式下会有少量细胞局部堆积。而在微载体悬浮培养模式下,由于细胞密度过大和病毒增殖导致培养液中营养物质的过快消耗及代谢产物的大量积累,且不能及时得到补充和清除,因此加速了ST细胞的凋亡过程,导致细胞碎片过多,甚至培养后期有少量空球现象<sup>[9]</sup>。尽管如此,贴壁或附球生长的ST细胞状态和活力都较好,能耗仍维持在较高的水平,具体如图2,3所示。

2.3 2种不同工艺的病毒增殖 由于CSFV对ST

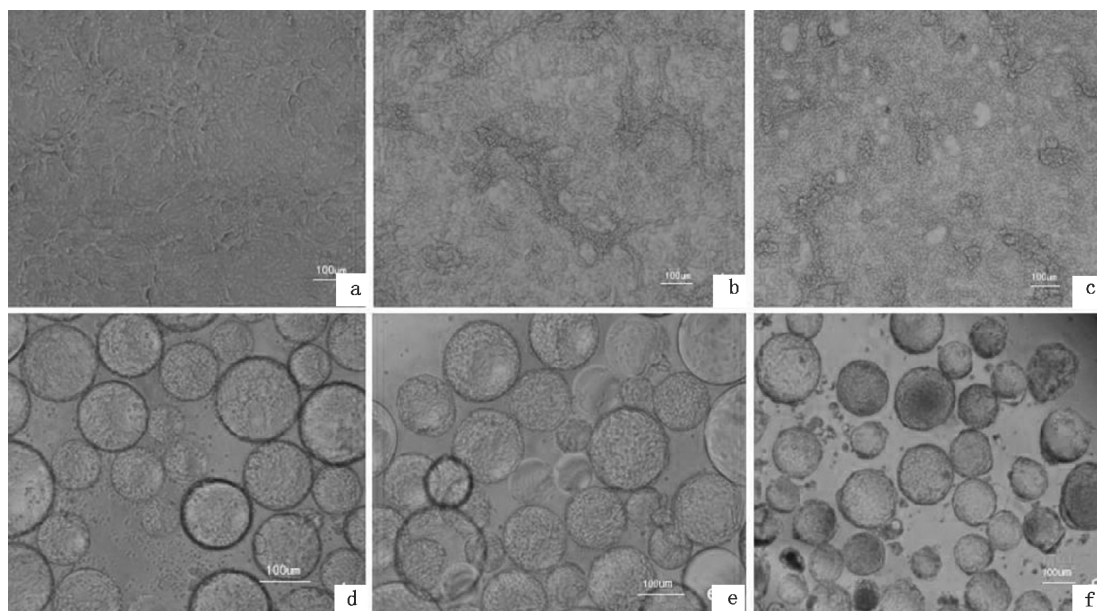


图3 2种不同工艺的病毒增殖 a,b,c.单层静置培养的ST细胞感染CSFV后的1,3,5收细胞状态;d,e,f.微载体悬浮培养的ST细胞感染CSFV后的1,3,5收细胞状态

将不同收次收获的 CSFV 悬液分别按 50 万和 75 万倍稀释,耳静脉注射家兔 2 只,记录兔体热型反应结果如表 4。微载体悬浮培养收获的 CSFV 除 1 收和 5 收稀释 75 万倍不合格外,其余均合格。而单层静置培养仅 2,3,5 3 个收次的 50 万倍稀释的热型反应合格。因此,可以判定单层静置培养的病毒

效价最高为 50 万 RID/mL,其中第 1 收和第 4 收低于 50 万 RID/mL。而微载体悬浮培养法收获的 CSFV 各个收次的效价均在 50 万 RID/mL 以上,且 2,3,4 3 个收次均达到 75 万 RID/mL 以上,具体如表 5 所示。

表 4 2 种不同培养方法收获的 CSFV 效力检验

收次 稀释因子/ ( $\times 10^4$ RID $\cdot$ mL $^{-1}$ )	1 <sup>th</sup>		2 <sup>th</sup>		3 <sup>th</sup>		4 <sup>th</sup>		5 <sup>th</sup>	
	50	75	50	75	50	75	50	75	50	75
单层静置培养	-/-	-/-	+/+/+	-/-	+/+/+	-/-	-/-	-/-	+/+/+	-/-
微载体悬浮培养	+/+/+	-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-

通过对不同收次收获的 CSFV 悬液的病毒效价测定,比较了 2 种不同技术工艺条件下培养的 CSFV 滴度水平,显示了 2 种工艺之间 CSFV 增殖效果存在明显差异。按照现行的有关国家标准<sup>[7]</sup>,低于  $50 \times 10^4$  RID/mL 的收获液不合格,微载体悬浮培养法不仅比传统单层静置培养多收获 2 个收次的合格病毒液,而且中间 2,3,4 这 3 个收次的病毒效价较后者高出 50%。显然,前者在 CSFV 培养方面具有更好的增殖效果、更高的生产效率和更稳定的技术优势。

体阴性。因此,微载体悬浮培养的 CSFV 与传统的单层静置培养工艺生产的 CSFV 同样具有良好的免疫原性。

表 5 2 种不同培养方法收获的 CSFV 滴度

试验组别	1 <sup>th</sup>	2 <sup>th</sup>	3 <sup>th</sup>	4 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>
	病毒效价/( $\times 10^4$ RID $\cdot$ mL $^{-1}$ )				
单层静置培养	<50	50	50	<50	50
微载体悬浮培养	50	75	75	75	50

表 6 ELISA 检测 CSFV 特异性中和抗体

试验组别	1	2	3	4	5
	$D_{450}$				
单层静置培养	0.365 3	0.396 9	0.421 3	0.427 1	0.408 2
微载体悬浮培养	0.443 0	0.407 9	0.450 0	0.441 6	0.461 5
对照组	0.109 5	0.227 1	0.101 3	0.213 6	0.187 2

表 7 攻毒后动物临床症状及保护率

试验组别	动物数/只	发烧数/只	死亡数/只	保护率/%
单层静置培养	5	1	0	100
微载体悬浮培养	5	0	0	100
对照组	5	5	5	0

**2.4 免疫原性分析** 对微载体培养细胞毒和静置培养细胞毒试验组以及对照组各 5 头猪 14 日采血,进行血清中和抗体检验。其中,阳性对照 1.449、阴性对照 0.111;按临界值(C.O.)的计算方法,临界值 =  $0.19 +$  阴性对照孔均值;检测样品  $D_{450}$  值  $\geq 0.301$  血清抗体即为阳性;检测样品  $D_{450}$  值  $< 0.301$  判定该检测样品为阴性。ELISA 检测结果如表 6,试验组猪血清样  $D_{450}$  均高于 0.301,对照组猪血清样  $D_{450}$  均低于 0.301。可知,微载体培养的 CSFV 与单层静置培养的 CSFV 均能产生很好的 CSFV 特异性中和抗体,而无细胞毒的对照组明显呈 CSFV 抗

从表 7 可以看出,接种微载体培养组细胞毒的试验猪没有明显的临床症状和发热反应,接种静置培养组细胞毒的试验猪除 1 头产生一过性发热外,其余都表现正常。而未接种细胞毒的对照组各猪都有明显的发热症状,且都在攻毒后以死亡转归。而试验组没有猪只死亡,保护率均达 100%,进一步验证了微载体培养工艺生产的 CSFV 具有很好的免疫原性。

### 3 讨论

本研究采用 CephodexD 型细胞微载体在摇瓶

中进行了 ST 细胞悬浮培养增殖 CSFV 的技术工艺研究,并与 Flask 瓶的单层静置培养法进行了比较。微载体悬浮培养法的细胞密度是单层静置培养的 2 倍以上,病毒效价较后者能高 50%,而且 1 个工艺流程微载体悬浮培养法能多收获 2 个收次的合格产品,大大提高了生产效率,具有明显的技术优势。然而,整个试验过程中对培养条件的调控仍很有限,在细胞生长和病毒增殖过程中对 pH、DO 等基本没有调控,病毒检测仍不能做到快速而准确。因此,要想微载体悬浮培养工艺的技术优势得到应有的发挥,仍需要做大量的深入研究工作。微载体培养法收获的 CSFV 具有很好的免疫原性,而与传统工艺生产的 CSFV 相比,免疫猪抗体产生是否更快,抗体滴度水平是否更高,持续时间能否更长,将有待进一步研究。

尽管如此,本研究的意义在于初步掌握 ST 细胞在 CephodexD 微载体上的生长特性,了解 CSFV 的微载体悬浮培养工艺中 CSFV 的感染规律和增殖水平,把握好病毒培养过程中的葡萄糖流加量与培养时间的关系,掌握病毒接种方法与收获规律等,这些重要的技术资料可以为应用 CephodexD 型微载体在细胞生物反应器中大规模悬浮培养 ST 细胞生产 CSFV 等后续研究提供重要的试验依据。

#### 参考文献:

[1] 平 玲,魏园园,王家敏,等.猪瘟疫苗的研究进展及

ST 细胞苗的研究现状[J].当代畜禽养殖业,2014(3):3-6.

- [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] 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.
- [4] 漆世华,刘汉平,秦红刚等.应用生物反应器工业化生产猪瘟疫活疫苗的方法:中国,CN201010282143.8[P].2011-05-04.
- [5] 王延辉,彭伍平,胡东波,等.猪瘟疫病毒高敏感性细胞的克隆及其在微载体培养中的应用[C]//中国畜牧兽医学会动物传染病学分会猪病防控学术研讨会.2010.
- [6] 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.
- [7] 中华人民共和国农业部公告第 1719 号[EB].北京:中华人民共和国农业部,2012.
- [8] CHIA C,VIADIMIR L,HANA G,et al.Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human siat7e gene and its application for influenza virus production[J].PNAS,2009,106(35):14802-14807.
- [9] 梁 武.猪圆环病毒 2 型悬浮培养技术及冻干灭活疫苗研究[D].北京:中国农业大学,2016.