

用 Vero 细胞大量制备传染性法氏囊病病毒

顾 铭 聂峰光 戚艺华

(中国科学院化工冶金所生物工程国家重点实验室 北京 100080)

关键词 传染性法氏囊病病毒弱毒株, Vero 细胞, 大量培养, 分批收毒

中图分类号 Q591.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0645-03

目前传染性法氏囊病病毒疫苗主要是用原代鸡胚成纤维细胞(PCEF)增殖 IBDV 进行生产。由于 SPF 种蛋价格高,且 SPF 种蛋在取得及培养过程中易被外源病原污染,造成产品质量的不稳定,生产成本很高^[1]。Vero 细胞系是一种贴壁依赖性的传代细胞系,WHO 已经批准用 Vero 细胞作为载体进行病毒疫苗的生产。目前已成功地应用 Vero 细胞生产出脊髓灰质炎病毒疫苗和狂犬病毒疫苗^[2]。用 Vero 细胞生产传染性法氏囊病病毒疫苗也会有较好的前景。我们已完成了在 Vero 细胞上静止状态下增殖 IBDV 弱毒株的培养条件研究,而利用微载体和生物反应器大量培养 Vero 细胞生产 IBDV 可以简化工艺,稳定产品质量。为此首先在 200 mL 搅拌瓶内进行了培养条件优化。

1 材料与方法

1.1 细胞

Vero 细胞由卫生部北京生物制品研究所提供,第 146 代。

1.2 病毒

IBDV BJ836 由北京农林科学院畜牧兽医研究所提供,弱毒株。

1.3 培养基

细胞培养基:M199 培养液+8%胎牛血清,pH7.2

病毒维持培养基:M199 培养液+2%胎牛血清,pH7.2

1.4 微载体

Cytodex-3 购于 SIGMA CHEMICAL CO.。处理方法:用 PBS 液浸泡过夜,用 PBS 液洗 2 遍,115℃ 灭菌,15min,弃去上清,用含 8% 胎牛血清的 M199 培养液浸泡过夜。

1.5 细胞和病毒培养方法

1.5.1 在 200 mL 搅拌瓶或 5L 搅拌罐内培养 Vero 细胞:在硅化的搅拌瓶或罐中按 2 g/L 加入微载体,接种 Vero 细胞,补足细胞培养基,37℃ 培养,搅拌速度 60r/min,在培养起始的 3 h 内间歇搅拌,即 静止 25 min,搅拌 5 min。在搅拌瓶内 12 h 换液 1 次并调整 pH 值,在搅拌罐内每 72 h 换液 1 次;每 24 h 取样 1 次,计数并拍照。

1.5.2 在 200 mL 搅拌瓶或 5L 搅拌罐内培养 IBDV 病毒:待 Vero 细胞在微载体上生长并均匀布满时,停止搅拌,使微载体沉降并抽去上清,接种种毒,补足病毒培养基,37℃ 培养。

种毒:因高滴度的种毒(8.375)数量有限,所以在 200mL 搅拌瓶内进行培养条件优化时,使用的 IBDV 种毒为 7.75(TCID₅₀),以 16:1000(体积比)的比例接种到 Vero 细胞上;进行罐培时,使用滴度为 8.375(TCID₅₀)的种毒,并适当降低了接毒比例 7:1000(体积比)。

1.6 分析方法

细胞单层培养的计数方法:见文献[3];细胞的微载体培养的计数方法:见文献[4];病毒滴度测定:蚀斑法,见文献[5]。

2 结果和讨论

2.1 在 200 mL 搅拌瓶内利用微载体悬浮系统培养 Vero 细胞的细胞生长曲线

首先测定了细胞的生长曲线,以决定接毒时间。微载体浓度 2.0 g/L,细胞接种密度 2.4×10^5 cells/mL,培养体积 200mL。

细胞生长经历了延迟期、对数生长期、平稳期(时间很短)和衰亡期。在细胞对数生长后期(120 h)细胞已经布满了微载体表面,此时接种病毒有利于病毒增殖。

2.2 静止培养系统和悬浮培养系统对 IBDV 增殖的影响

用同一批细胞和同一批种毒,以悬浮和静止培养状态下

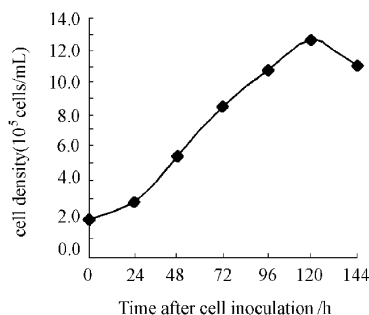


图 1 Vero 细胞在微载体悬浮培养时的生长曲线

的最佳工艺条件进行实验。

实验表明 :悬浮培养时培养上清的病毒滴度高峰来得快 ,维持时间长 ,静止培养时病毒滴度高峰相对推迟 ,且下降也快。原因有两个 :一是悬浮培养的传质性能较好 ,有利于病毒粒子从细胞内释放到培养液中 ;二是悬浮培养所能达到的细胞密度较高 ,悬浮培养时病毒对细胞的感染更多的是二次感染 ,即悬浮培养时细胞发生病变的时间不一致 ,而且相差较大 ,在病毒释放与失活两种状态之间 ,存在一个较长的平衡期 ,也就是培养液的病毒滴度高峰所维持的时间较长。

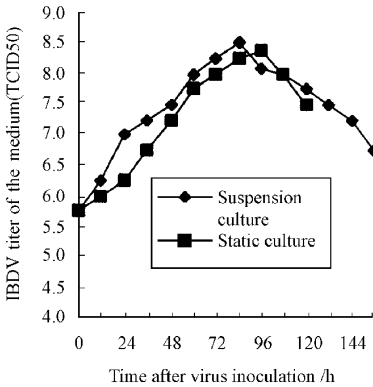


图2 静止和悬浮培养系统对 IBDV 增殖的影响

2.3 IBDV 在 200 mL 搅拌瓶内增殖条件的优化

2.3.1 血清浓度对 IBDV 增殖的影响：

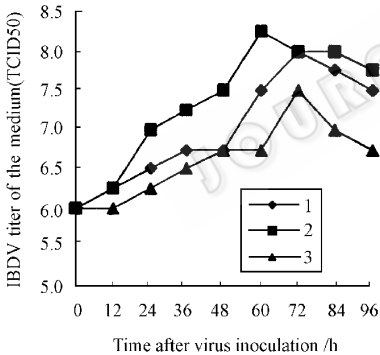


图3 血清浓度对 IBDV 增殖的影响

- 1. Serum concentration 0 % ；
- 2. Serum concentration 2 % ；
- 3. Serum concentration 8 %

以 2.4×10^5 cells/mL 接种细胞 ,第 5 天细胞布满微载体并进入对数生长期的后期 ,用不含血清的培养基将微载体上的细胞洗 3 次 ,换成分别含 0 % 2 % 8 % 血清的病毒维持液 ,种毒滴度 7.75 ,接种比例 16 :1000 (体积比) ,病毒维持液 pH6.8 ,病毒增殖情况如图 3 所示。

实验表明 :血清浓度对 IBDV 在 Vero 细胞上的增殖有较大的影响。血清浓度为 2 % 时 ,IBDV 滴度高峰出现最早 ;当血清浓度为 0 % 时 ,IBDV 滴度高峰出现较迟 ;而 8 % 的血清浓度对 IBDV 增殖有了明显的抑制作用。

血清对病毒增殖的作用可能有两方面的原因 :一是血清中存在的有关抑制因子可能与细胞表面的病毒受体结合 ,从

而降低病毒在细胞上的吸附^[6] ,同时 ,维持液中血清浓度很高 ,细胞迅速老化 ,不利于病毒增殖。

可见 ,在病毒增殖阶段 ,维持培养基并不需要高浓度的血清 ,这与人用病毒疫苗的情况相似^[7]。

2.3.2 pH 值对 IBDV 增殖的影响：

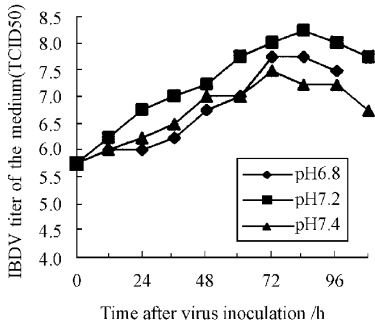


图4 pH 对 IBDV 增殖的影响

以 2.4×10^5 cells/mL 接种细胞 ,第 5 天细胞布满微载体并进入对数生长后期 ,用不含血清的培养基将细胞洗 3 遍 ,换上含 2 % 胎牛血清的病毒维持液 ,调节维持液 pH 值分别为 6.8 ,7.2 ,7.4 ,种毒滴度 7.75 ,接毒比例 16 :1000 (体积比) ,并在整个培养过程中 ,每隔 12 h 调节一次病毒维持液的 pH 值 ,其间每 12 h 取样一次测定病毒滴度 ,如图 4 所示。

有报道表明 IBDV 在鸡胚原代细胞上增殖时 ,pH 对病毒滴度影响较大^[8]。实验表明 pH 值对 IBDV 在 Vero 细胞上的增殖也具有较大的影响 ,pH7.2 的病毒维持液有利于 IBDV 在 Vero 细胞上的增殖。推测 这是维持液的酸碱度对细胞活性及病毒本身作用的综合结果 ,pH7.2 的维持液对维持细胞活跃的生理状态比较有利 ,最终表现出的细胞病变也较明显。

2.3.3 细胞表面活性剂对 IBDV 增殖的影响 :以 2.4×10^5 cells/mL 接种细胞 ,第 5 天细胞布满微载体并进入对数生长期后期 ,用不含血清的培养基将细胞洗 3 次 ,换为含 2 % 胎牛血清、pH7.2 的病毒维持液 ,并分别加入 0.01 % ,0.02 % ,0.05 % 0.1 % 的细胞表面活性剂。种毒滴度 7.75 ,接毒比例 16 :1000 (体积比) ,如图 5 所示。

实验表明 :浓度适宜 (0.01 %) 的细胞表面活性剂虽不能明显提高 IBDV 的滴度 ,但由于细胞表面活性剂可增加细胞膜的通透性 ,有利于病毒的二次感染 ,使病毒在一个较长时间内 (约 60 ~ 72 h) 维持较高滴度 ,这对于 IBDV 的大量培养是很有意义的。但高浓度的表面活性剂不利于病毒的增殖。

小结 :IBDV 微载体悬浮培养的最佳培养条件 :在 Vero 细胞进入对数生长后期接种病毒 ,病毒维持液血清浓度为 2 % ,pH7.2 ,细胞表面活性剂 0.01 % 。

2.4 在 5L 搅拌罐内培养 Vero 细胞增殖 IBDV

完成了转瓶中培养条件优化 ,将 Vero 细胞增殖 IBDV 的规模放大到 5L。为了缩短细胞培养周期 ,提高了细胞接种密度 3×10^5 cells/mL ,第一天细胞已均匀地布满了微载

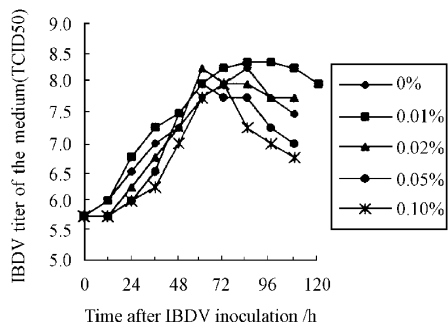


图 5 细胞表面活性剂对 IBDV 增殖的影响

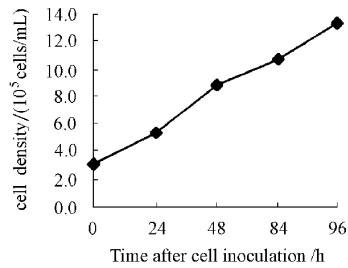


图 6 Vero 细胞在 5L 搅拌罐内悬浮培养时的生长曲线

体,此时从 Vero 细胞微载体悬浮培养时的生长曲线看,Vero 已进入对数生长后期,如图 6 所示。

选用高滴度的 IBDV 种毒——8.375(TCID50),所以适

当降低了接毒比例,改为 7:100(体积比)。接毒后 120 h,从显微镜下观察到微载体上尚有很多形态较好的细胞,所以,在 120 h 时停止搅拌,沉降微载体,收取病毒上清,再补入病毒维持液,培养 72 h,再次全部收取上清——分批收毒。

实验表明,以上工艺条件是适合 IBDV 增殖的,IBDV 在 96 h 内维持了很高的滴度,并成功实现了分批收毒,获得了很高的病毒滴度(见图 7)。

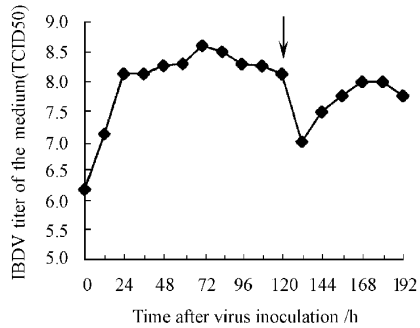


图 7 在 5L 搅拌罐内在 Vero 细胞上 IBDV 的增殖曲线及分批收毒情况
箭头处表示 收取病毒并重新注入培养基

IBDV 大规模培养的主要成本在于微载体和细胞培养用血清的费用,分批收毒可以节约资源,获得更多的产品,具有重要的经济效益。这是鸡胚原代细胞所不具有的优势。

参 考 文 献

[1] 李有根,聂峰光,戚艺华等.微生物学杂志,1998,18(3):10~14
[2] Fabry L,Baijot B,D'Hondt E,et al. Advance in Animal Cell Biotechnology and Bioprocess,Guilford:Butterworths,1989
[3] Butler M 等著,肖成祖等译.哺乳动物细胞工程——实用方法,北京:军事医学科学院,1993,pp.26~27
[4] 陈因良,陈志宏.细胞培养工程,上海:华东化工学院出版社,1992,pp.95~97
[5] Purchase H G 主编,唐桂运译.禽病分离鉴定实验室手册(第三册),北京:农业出版社,1993,pp.236~244
[6] 于大海,陈冠春,王笑梅.病毒学报,1988,4(1):33~37
[7] 董树沛,顾小华,陈因良等.生物工程学报,1993,9(2):137~141
[8] 张立,张元兴,严春等.华东理工大学学报,1996,22(6):707~711

Proliferation of Attenuated Infectious Bursal Disease Virus(IBDV) on Vero Cell on Large Scale

GU Ming NIE Feng-Guang QI Yi-hua OUYANG Fan

(State Key Lab of Biochemical Engineering ,Institute of Chemical Metallurgy ,The Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080)

Abstract Vero cell was selected as productive carrier in production of Attenuated IBDV. The optimal conditions in culturing IBDV in agitating bottle were figured out. After proliferation ,supernatant was harvested in batch process under the condition of five-liter-agitated fermenter. The result shows it was successful to culture IBDV by this methodology.

Key words Attenuated infectious bursal disease virus(IBDV),Vero cell ,large scale ,harvest supernatant in batch process