

国产生物反应器及其在病毒培养中的应用

董树沛 顾小华 陈因良 严春 姜壁贵
赵一鸣 宋家骊* 陈列胜* 陈文兰*

(华东化工学院生化工程研究所, 上海 200237)

本文简要介绍了华东化工学院研制的CellCul-20细胞培养生物反应器, 报道了此反应器用于细胞和病毒培养的情况。经严格的无菌试验和一年多的培养表明: CellCul-20反应器具有优良的抗污染性能, 其主要参数的控制完全满足细胞培养的要求, 并能根据培养过程的实际情况, 随时对参数进行修正。用所开发的培养工艺进行Vero细胞和乙脑病毒培养, 细胞在较短时间内达到高密度, 乙脑病毒滴度和抗原效价均取得了较为满意的结果。在国际上第一次成功地应用vero细胞大规模培养乙脑病毒原制苗。

关键词 CellCul-20; 生物反应器; Vero细胞; 乙脑病毒; 细胞培养

在生物技术发展过程中, 人们已广泛地应用细菌、真菌、酵母等来大量生产各种有用的产物如抗生素, 蛋白质。然而, 许多有重要价值的生物物质, 必须借助于动、植物细胞培养才能获得, 如疫苗、干扰素、单克隆抗体。经过近30年的开发和发展, 采用细胞大规模培养来生产疫苗和新型药物的工艺和技术日臻成熟, 已成为现代生物技术的一个重要组成部分^[1-3]。

最近20—30年, 在大规模动物细胞培养技术方面, 出现了许多新型的生物反应器培养系统包括微载体、中空纤维、微胶囊固定化细胞、灌注系统等, 并已用于口蹄疫疫苗、狂犬病疫苗及干扰素等生产。国内则尚无工业规模的生产, 一个重要的原因在于培养设备的缺乏。经过几年的努力, 华东化工学院生化工程研究所成功地研制出适合于细胞培养的反应器—CellCul-20细胞培养生物反应器(图1)。整套反应器系统具有运行稳定, 操作简单, 拆装方便, 易清洗, 易维修等特点。用CellCul-20生物反应器进行Vero细胞和乙脑病毒培养,

Vero细胞无论在细胞形态还是在细胞密度上均达到了国外同类产品细胞培养的先进水平^[4,5], 细胞密度超过 10^7 Cells/ml, 病毒滴度和抗原效价均达到和超过卫生部颁标准。

材料和方法

(一)材料

1. 反应器: 20L CellCul-20细胞培养生物反应器(华东化工学院)。
2. 检漏液: Snoop[®] (Liquid Leak Detector) (Nupro Co, Ohio 44094)。
3. 无菌试验培养基: 水解乳蛋白(LH), 添加5%小牛血清(CS); LH (OXOID Ltd); CS(卫生部上海生物制品研究所, 以下简称上生所)。
4. 无菌试验检测培养基: 改良马丁; 营养琼脂; 硫乙醇酸盐(上生所)。
5. 微载体: GT-2(华东化工学院)。

本文于1992年3月20日收到。

* 卫生部上海生物制品研究所

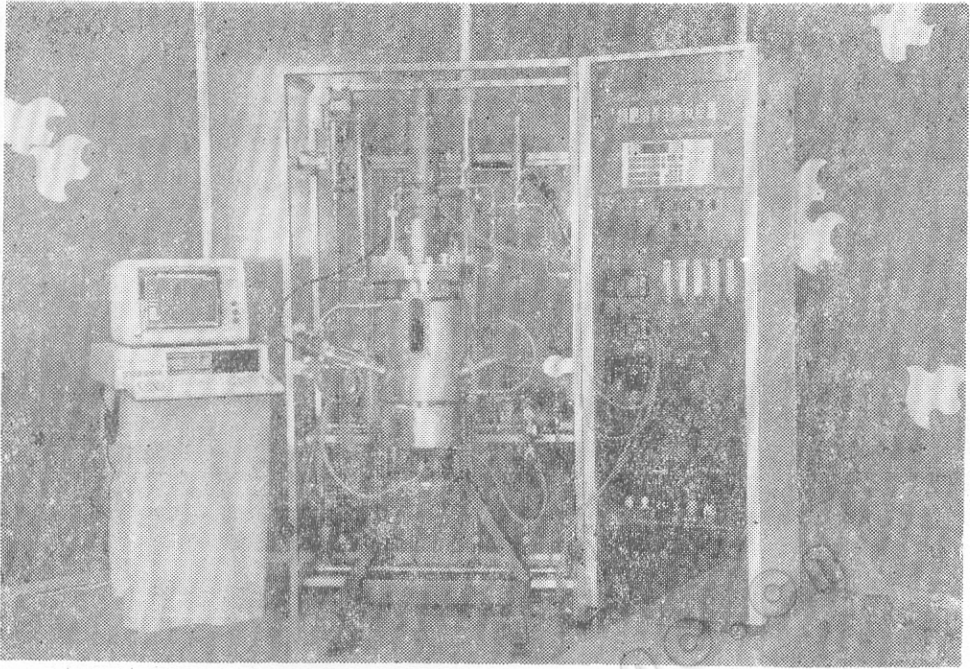


图1 CellCul-20细胞生物反应器

Fig.1 CellCul-20 cell culture bioreactor

由变性胶原制成,在PBS缓冲液溶胀后粒径180—220 μm ,比重1.03—1.04,光学透明,淡黄色球形微粒^[6]。

6. 细胞: Vero细胞(ATCC)。

7. 细胞培养基: EMEM,添加5—10% CS, 50u/ml抗生素, 2% NaHCO_3 (6%), 补加葡萄糖使其终浓度为4g/L培养基: EMEM、CS、 NaHCO_3 (6%) (上生所); 抗生素(上海第三制药厂); 葡萄糖(上海葡萄糖厂)。

8. 病毒: 乙脑病毒P₃株(上生所)。

9. 病毒培养基: EMEM,添加0.5—1% 人血白蛋白(20%), 50u/ml 抗生素, 5% NaHCO_3 (6%) 人血白蛋白(上生所)。

(二) 方法

1. CellCul-20细胞培养生物反应器的检漏和气密性试验: CellCul-20反应器全部安装就位后,对罐体和各管道接口,在0.12MPa恒压下,用检漏液进行检漏。

装置检漏完毕,还需进行气密性检查。气密性检查要求向罐内通入气体,在0.12MPa压力下,关闭气源进、出口阀门,保压1h,压力下降速度应不大于0.015MPa/h。

2. CellCul-20反应器的准备: (1)用标准pH电极缓冲液校正pH电极; (2)称取一定量的微载体经PBS浸泡、溶胀、灭菌后备用; (3)在清洁的CellCul-20培养罐内倒入PBS溶液,在121 $^{\circ}\text{C}$, 1h条件下,就地高压灭菌二次; (4)冷却后,校DO电极; (5)除去PBS溶液,加入无菌的新鲜培养基和微载体,浸泡24—48h。

3. 无菌试验: 步骤(1)—(4)同上步骤(1)—(4); (5)除去PBS溶液,将含小牛血清的LH(不加任何抗生素)压入罐内; (6)设定与细胞培养参数相同的参数进行无菌试验培养; (7)每日取样作无菌检查(培养7天),同时观察罐内培养情况。

4. 细胞培养：在准备好的CellCul-20反应器中加入种子细胞。在静态条件下，进行球间(beads to beads)细胞接触转移，每小时搅拌一次；4—7h后正式开启搅拌，控制培养条件：pH7.0—7.2，溶解氧30—60%空气饱和度，转速20—40r/min，温度37℃，全部操作状态为自动控制。每天取样，观察细胞生长情况，细胞计数，测定葡萄糖、NH₄⁺含量^[7]。

5. 病毒培养：培养4—6天，细胞在微载体上呈较密单层，停止搅拌，抽出培养基，用基础溶液(如Hanks液)洗涤后，接种乙脑病毒，加不含人血白蛋白的病毒培养基进行培养。次日，抽出培养基，加病毒培养基继续培养，第二天起做多次收液。病毒培养条件：pH7.4—8.0，溶解氧40—60%空气饱和度，转速20—40r/min，温度32℃。

6. 病毒检定：病毒滴度(LD₅₀)和抗原效价(ID₅₀)测定均为小白鼠接种法^[8]。

结果与讨论

(一) CellCul-20细胞培养生物反应器的无菌试验结果

在制造过程中，对罐体及管件进行检漏和气密性检查。整套装置安装就位后，用丰富培养基进行微生物无菌试验，以确保装置的无菌可靠性。无菌试验期间，培养基在进罐前、进罐搅拌半小时后，分别取样，一天后，每天取样。全部样品作无菌试验。经过7天严格的无菌试验结果均为阴性，证明该生物反应器能有效地进行就地灭菌，结构设计合理，无蒸汽灭菌死区，具有优良的密封性能，外源气体经过高效过滤器后能有效地除菌。一年多的培养证明，该反应器具有良好的无菌密封性

能。但仍应定期检查，及时更换密封用的各种规格的O形硅胶垫圈，以防由于O形圈失效而引起的污染。用于气体过滤除菌的高效过滤器也应定期检查，更换。

(二) CellCul-20生物反应器培养过程中主要参数的控制和变化

每隔一定时间观察，记录该反应器的主要参数值，并观察罐内微载体悬浮情况。

根据动物细胞生长过程中对pH、溶氧、温度、搅拌速度等工艺参数的要求，CellCul-20生物反应器专门设计和制造了高性能、智能化的微机自动化控制系统，该系统对培养过程的各参数进行自动数据采集，经微机分析，计算和处理，再通过执行机构实时控制。实际培养证明：该反应器能有效地控制pH、溶氧、温度和搅拌转速，并能随培养情况的改变而重新设定参数。在温和的搅拌条件下，能提供足够的溶解氧，保持较稳定的pH，优化细胞生长环境，保证了细胞有较快的生长速率和高密度细胞培养对环境的要求。

(三) CellCul-20生物反应器培养Vero细胞和乙脑病毒

结果(见图2, 表1)证明：CellCul-20反应器能为微载体细胞培养提供一个理想的生长环境，反应器所选用的材料对细胞，病毒无毒性。细胞在CellCul-20生物反应器中无圆缩，生长速度缓慢，形态畸形等中毒症状。细胞的附着，生长，形态均良好，细胞在短时间内能达到高密度，且可重叠生长而不脱落。接种乙脑病毒后能产生较高的病毒量，其病毒滴度和抗原效价均已达到和超过卫生部部颁标准，且可多次收获病毒培养液。

(四) CellCul-20细胞培养生物反应器

这是国内第一台动物细胞大规模培养国产生物反应器，它并不是为某一特定细

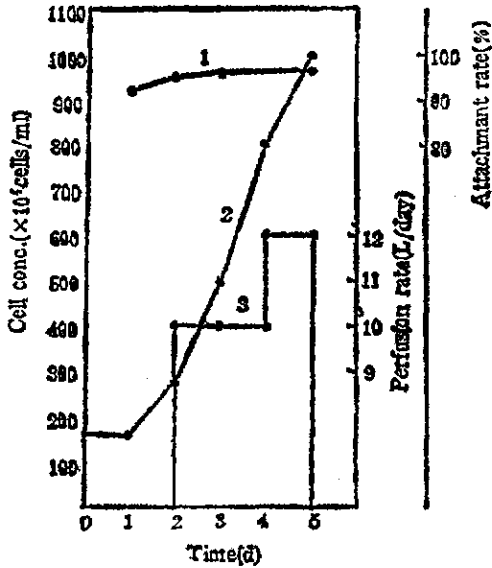


图2 在CellCul-20反应器中, 细胞生长、吸附及渗透速率

Fig.2 The curve of cell growth, attachment and perfusion rate (CellCul-20)

1. Cell attachment rate
2. Cell concentration
3. Medium perfusing rate

胞培养而设计的, 它既适用于悬浮细胞的

表1 CellCul-20中, Vero 细胞乙脑病毒培养结果

Table 1 The result of JEV-infected Vero cells (CellCul-20)

No.	CPC	Harvested JEV volume (ml)	ID ₅₀ /0.04ml	ID ₅₀ /ml
1	+++	10000	5.67	0.00017
2	+++	7600	>7.5	0.00025
3	+++	7600	7.0	0.00032

培养又适用于贴壁细胞的培养。针对Vero细胞和乙脑病毒培养的一些特殊要求。在实际使用过程中, 对原反应器的设计作了一些完善, 使之更适合于培养工艺的要求。如工艺要求乙脑病毒接种前, 应尽可能多地抽取原细胞培养液, 针对这一要求, 采取加长抽液管, 在抽液管进液口加滤网的措施, 使之既能尽可能多地抽取液体, 又防止微载体被夹带出。又如原设计取样阀在底部, 在实际使用中效果不好, 就改成从罐中部取样, 并建议在以后设计、制造中将取样阀放在罐中部。

参 考 文 献

- [1] Montagnon, B. et al., *Dev. Biol. Standard*, 55:37, 1984.
- [2] Johnston, M.D. et al., *Dev. Biol. Standard*, 42:189, 1979.
- [3] Birch, J.R. et al., 188th American Chemical Society Meeting, Philadelphia, PA, 1984.
- [4] Young, M.W. et al., *Bio/technology*, 5:335, 1987.
- [5] Tolbert, W.R. et al., *Dev. Biol. Standard*, 49:109, 1980.
- [6] 李福田等: 生物工程学报, 8(2):157-163, 1992.
- [7] 董树沛等: 生物工程学报, 8(4):389-393, 1992.
- [8] 中华人民共和国卫生部: 中国生物制品规程, 1990年版。

A Domestic Cell Bioreactor and its Application in Viruses Culture

Dong Shupeì Gu Xiaohua Chen Yinliang Yan Chun
Jiang Bigui Zhao Yiming Song Jiali*
Chen Liesheng* Chen Wenlan*

*(Research Institute of Biochemical Engineering, East China University
of Chemical Technology, Shanghai 200237)*

The cell culture bioreactor (CellCul-20) and its application in cells and viruses culture are described in this paper. It was proved by aseptic test and one-year's operation that CellCul-20 can keep aseptic after being autoclaved and control or adjust the main parameters in the set range. A high cell density and virus titre were reached when culturing Vero cells and Japanese encephalitis virus (JEV) in this cell bioreactor. It's the first report about large scale culture of JEV-infected Vero cells to prepare primary JEV vaccine. A series of suggestion are proposed for the improvement of CellCul-20.

Key words: CellCul-20; bioreactor; Vero cell; Japanese encephalitis virus (JEV); cell culture

* Shanghai Institute of Biological Products