

悬浮培养技术在猪圆环疫苗生产中的应用

李少丽* 邵攀峰 朱国坡 尹忠良
杭州佑本动物疫苗有限公司, 杭州 310018

摘要 猪圆环病毒病是猪的一种非常重要的免疫抑制性疾病,可直接破坏猪的免疫系统,并引起其他疾病的并发或继发感染。针对该病的疫苗主要为全病毒灭活疫苗和基因工程亚单位疫苗,基因工程亚单位疫苗一般利用生物反应器生产,而国内猪圆环全病毒灭活疫苗的微载体悬浮培养生产的工艺目前还处于研究阶段。

关键词 悬浮培养;猪圆环病毒;疫苗

1 猪圆环病毒概况

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)是目前发现的脊椎动物中最小的一种动物病毒,该病毒可分为 PCV1 和 PCV2 两种血清型。PCV1 对猪无致病性,广泛存在于猪体内和猪源传代细胞系中,PCV2 可在猪群内引发多种传染病,如断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)、猪皮炎肾病综合征(PDNS)等。PCV2 不仅可造成仔猪生长缓慢,而且还会侵害猪的免疫系统,导致猪群免疫抑制,影响其他疫苗的免疫效果,并引发其他病原的继发感染。PCV2 基因组大小为 1 766~1 768 bp,共包括 ORF1 和 ORF2 在内的 11 个 ORF。ORF2 编码病毒衣壳蛋白(Cap 蛋白),Cap 蛋白为病毒的主要结构蛋白,是刺激机体产生免疫应答的主要抗原,也是基因工程亚单位疫苗研究的热点。目前,针对圆环病的商品化疫苗国内已有 30 多家,主要为全病毒灭活疫苗和亚单位疫苗。目前,国内疫苗企业上市的全病毒灭活疫苗均为转瓶工艺。

2 悬浮培养技术在猪用疫苗生产中的应用

随着细胞培养技术的不断发展成熟,许多细胞

已从传统的转瓶培养被驯化为悬浮培养。悬浮培养技术具有病毒产量高、生产周期短、污染小、批间稳定、操作方便、可自动化控制、劳动成本低等优势,其可分为微载体悬浮培养和全悬浮培养 2 种方式。微载体培养是以细小的颗粒作为细胞载体,通过搅拌使细胞悬浮在培养液内,细胞在载体表面生长成单层的一种细胞培养方式。常用的微载体一般为纸片载体或球状载体,球状载体相对于纸片载体更容易进行细胞观察。1962 年, Capstick PB 首次采用 BHK21 细胞悬浮培养 FMDV^[1]; 1965 年, Telling R.C 使用发酵罐悬浮培养 BHK21 细胞进行 FMDV 的批量生产^[2]。周燕等^[3]利用生物反应器培养 ST 细胞进行 TGEV 的繁殖,培养病毒效价为 $10^{11.3}$ TCID₅₀/0.2 mL,比方瓶培养效价提高约 100 倍。冯磊等^[4]在 Marc145 细胞上使用微载体悬浮灌注培养方式大规模培养 PRRSV,将 Marc145 细胞种子以循环灌注培养方式在 5 L 反应器中完成初级培养,经消化传代工艺,将种子细胞放大接种于 60 L 反应器中进行分批换液式的二级培养,用于 PRRSV 的大规模增殖,PRRSV 的增殖滴度可达到 $10^{8.3}$ TCID₅₀/mL,成功模拟了 Marc145 细胞在工业化水平上的放大培养操作工艺,具备实际应用价值。

全悬浮培养不需要载体,培养细胞的生长密度

收稿日期:2020-03-05

* 通讯作者

李少丽,女,1983 年生,博士,高级兽医师。

不受附着物限制,无需胰酶消化,工艺放大相对微载体更简单,自动化程度高,长期使用成本低,但前期对细胞驯化技术要求较高。目前,实现全悬浮培养的细胞有 BHK21、Vero、ST、MDCK、293 细胞等。陈文庆等^[5]采用全悬浮培养口蹄疫病毒和狂犬病毒,并与转瓶培养作比较,当 BHK21 细胞生长至 96 h 细胞密度可达 $5.4 \times 10^6/\text{mL}$,成活率维持在 94% 左右;从细胞数量比较,650 L 反应器培养一批的细胞数量相当于 500~700 个 15 L 转瓶培养的细胞总量,且病毒接种 12 h 后病毒效价均比转瓶高出约 $10^{0.25}$ TCID₅₀/mL;而采用 70 L 的反应器微载体培养 Vero 细胞生产狂犬病毒,其毒价要比 15 L 转瓶高出 10 倍,生产效率和产品质量明显提高。

3 悬浮培养在猪圆环病毒生产中的应用

目前,关于圆环全病毒培养的研究主要集中于悬浮培养的方式。邹勇^[6]利用生物反应器灌注工艺微载体培养 PCV2,其病毒效价可达 10^{50} TCID₅₀/mL。南京农业大学何锡忠^[7]利用 Celli Gen 生物反应器,高密度悬浮培养 PK15 细胞繁殖 PCV2,同时设转瓶培养作对照,悬浮培养的病毒毒价为 $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL,而转瓶培养的病毒毒价为 $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL。张许科等^[8]以聚酯、明胶、多糖为微载体,每克载体加入 $1.4 \times 10^7 \sim 2.6 \times 10^7$ 个传代细胞,使细胞与微载体充分结合,当传代细胞培养至 $5.0 \times 10^9 \sim 8 \times 10^{10}$ cells/L 时,换用细胞维持液,按照感染复数为 MOI=0.001~1.000 接种 PCV2,使病毒与细胞充分接触,运用潮汐式微载体悬浮培养技术生产的 PCV2 病毒毒价可达到 $10^{6.0} \sim 10^{7.0}$ TCID₅₀/mL,其毒价要比转瓶的 $10^{4.0}$ TCID₅₀/mL 高出 100~1 000 倍。钱钟等^[9]采用灌注悬浮培养技术繁殖 PCV2,病毒效价可达 $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL。华涛等^[10]利用生物反应

器微载体悬浮培养 PK15 细胞,优化各重要参数条件后,收获 PCV2 病毒液效价可达 $10^{7.25}$ TCID₅₀/mL。

综合比较,细胞悬浮培养技术在圆环疫苗生产中的应用优势非常明显,而且由于全病毒含有病毒全部的抗原决定簇,免疫原性更占优势。因此,预计圆环全病毒灭活疫苗将会在很长时间占据国内市场,一旦全病毒悬浮培养技术成熟,将从很大程度上提高优质圆环全病毒灭活疫苗的产能,进一步提高疫苗质量,为猪圆环病的有效防控提供坚实的保障。

参 考 文 献

- [1] CAPSTICK P B,TELLING R C,CHAPMAN W G.Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of food-and-mouth disease [J].Nature,1962(195):1163-1164.
- [2] DOEL T R.FMD vaccines[J].Virus research,2003,91(1):81-99.
- [3] 周燕,王建超,华平等.猪传染性胃肠炎病毒在 ST 细胞中增殖规律的研究[J].中国兽医科技,2005,35(6):423-427.
- [4] 冯磊,王伟峰,吴培培,等.生物反应器中 PRRSV 工业规模增殖工艺的建立[J].江苏农业科学,2016,2(44):247-251.
- [5] 陈文庆,王建超,刘华杰,等.悬浮培养工艺与转瓶培养工艺的比较分析[J].中国兽药杂志,2010,44(10):37-41.
- [6] 邹勇.一种制备猪圆环病毒的工艺:CN101289655A[P].2007-12-17.
- [7] 何锡忠.猪圆环病毒 2 型高密度培养的研究[D].南京:南京农业大学,2009.
- [8] 张许科,孙进忠,乔荣岑,等.猪圆环病毒 II 型疫苗及其生产方法:CN101934074A[P].2010-09-03.
- [9] 钱钟,潘杰,宋庆庆,等.一种应用生物反应器及片状载体大规模扩增猪圆环病毒 2 型的方法:CN103614344A[P].2014-03-05.
- [10] 华涛,冯磊,张雪花,等.PK15 细胞在微载体悬浮放大培养及 PCV2 增殖工艺研究[J].西南农业学报,2017,30(2):474-480.

【责任编辑:胡 敏】