

文章编号: 1674-5566(2017)05-0784-09

DOI:10.12024/jsou.20161101896

鲫细胞与病毒微载体规模化培养工艺研究

王维玲¹, 刘文枝², 马杰², 周勇², 范玉顶², 曾令兵^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223)

摘要: 本文研究了在 Cephodex 微载体悬浮培养系统中规模化培养鲫脑组织细胞(GiCB)和鲤疱疹病毒 II 型(Cyprinid herpesvirus II, CyHV-2)的工艺。结果表明, Cephodex 微载体适合 GiCB 细胞的贴壁培养, 细胞贴壁期培养基中血清浓度为 10%, 微载体浓度为 6 g/L; 细胞初始接种密度为 2.5×10^5 cells/mL 时, 以转速 35 r/min, 每静置 30 min 搅拌 2 min 的间歇搅拌条件贴壁率最佳, 8 h 后贴壁率可达 90% 以上; 增殖期以 45 r/min 的连续搅拌速度可获得最佳的细胞生长效能。采用优化的工艺条件, 以感染复数为 0.2 的 CyHV-2 病毒接种规模化培养的 GiCB 细胞 5 d 后, 出现典型的细胞病变效应, 病毒滴度(TCID₅₀/mL)可达 $10^{6.50 \pm 0.30}$ 。本研究为鲫造血器官坏死症疫苗的规模化制备技术研究奠定了前期基础。

关键词: 鲫脑组织细胞系(GiCB); 鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2); 微载体; 规模化培养

中图分类号: Q 935 **文献标志码:** A

鲤疱疹病毒 II 型(Cyprinid herpesvirus-2, CyHV-2)感染养殖鲫引起的鲫造血器官坏死症是近年来我国新发生与流行的高度传染性疾病, 死亡率高达 90% 以上, 给鲫鱼养殖业带来了巨大的经济损失^[1-2]。目前, 预防水产养殖动物传染性疾病特别是病毒性疾病最为有效的方法是疫苗免疫, 而鱼类病毒性疫苗研制与免疫预防技术研究依赖于病毒病原敏感细胞系的建立。2015 年, MA 等首次建立了支持鲤疱疹病毒 II 型稳定复制的异育银鲫脑组织细胞系(GiCB), 为研究鲤疱疹病毒 II 型的感染机理与防治技术提供了重要基础材料^[3]。ZHANG 等在 GiCB 细胞上利用细胞瓶贴壁法制备了鲤疱疹病毒 II 型灭活疫苗^[4], 研究了疫苗的免疫保护效果与应答规律。但利用细胞瓶贴壁培养方式大规模培养细胞和病毒, 不仅耗时耗力, 且产量有限, 质量稳定性控制困难。利用微载体规模化培养细胞与病毒, 是 20 世纪九十年代发展起来的技术^[5-7], 其具有细胞贴壁表面积大、产量高等优点, 克服了传统细胞与病毒大规模培养的缺陷, 为细胞、病

毒大规模培养以及疫苗制备技术的进一步发展作出了重要贡献。在鱼类细胞培养中, 叶雪平等^[8]和陈志宏等^[9]利用 GT-2 微载体和生物反应器分别对草鱼的吻端细胞 ZC-7901 和胚胎细胞 CP-80 以及草鱼呼肠孤病毒的培养条件进行了研究。刘秋凤等^[10]利用微载体细胞培养技术规模化培养草鱼肾脏细胞和草鱼呼肠孤病毒并制备了草鱼出血病疫苗, 为草鱼出血病的有效防控奠定了基础。

本文研究了微载体规模化培养鲫脑组织细胞和鲤疱疹病毒 II 型的工艺, 确定了间歇搅拌条件、血清浓度、微载体浓度、细胞接种密度以及搅拌速度等最适培养条件或参数, 并通过病毒感染试验, 利用微载体悬浮培养的 GiCB 细胞规模化培养了 CyHV-2, 为规模化制备 CyHV-2 疫苗奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞系与病毒

鲫脑组织细胞系(GiCB)由本实验室建立^[3]。

收稿日期: 2016-11-06 修回日期: 2017-04-28

基金项目: 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2016HY-ZD0501); 国家现代农业产业技术体系大宗淡水鱼产业技术体系(CARS-46); 武汉市关键技术攻关计划(2016020101010083)

作者简介: 王维玲(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖病害防治。E-mail: ww1583906816@163.com

通信作者: 曾令兵, E-mail: zlb@yfi.ac.cn

培养条件:含 10% 新生牛血清的 M199, pH 7.0 ~ 7.2, 温度 28 °C。鲤疱疹病毒 II 型 (Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2) 由本实验室分离鉴定^[3]。

1.2 试剂与仪器

主要试剂与仪器: M199 培养基 (Sigma); 血清 (浙江省杭州四季青生物工程材料有限公司); 胰蛋白酶 (Sigma); PBS (Sigma); Cephodex 微载体 (山东省滨州贝尔凯瑞生物技术有限公司), 直径 100 ~ 150 μm; 双侧臂细胞培养搅拌瓶 (Wheaton, USA), 容积为 4 L; Micro-Stir 低速磁力搅拌器 (Wheaton, USA); 倒置显微镜 (Nikon, 日本); 离心机 (Sigma 3K-15, 德国)。

1.3 种子细胞与病毒培养

T-75 cm² 细胞培养瓶 (Croning, USA) 以 1:2 传代培养种子细胞。以感染复数 (Multiplicity of Infection, MOI) 为 0.2 的 CyHV-2 病毒接种 GiCB 细胞, 当细胞病变效应 (Cytopathic effect, CPE) 至 90% 左右时收获细胞培养物, -80 °C 反复冻融 3 次, 4 °C 4 500 r/min 离心 30 min, 去除细胞碎片, 将病毒上清置于 -80 °C 保存备用。

MOI 值的计算:

$$MOI = 0.7 \times TCID_{50} \times V_v / X_m \quad (1)$$

式中: V_v 为接种病毒的体积; X_m 为接种病毒时的细胞量。

1.4 Cephodex 微载体预处理

工作体积为 400 mL, 分别按 3、6、9 g/L 的微载体浓度称取后, 置于盛有 150 mL 无 Ca²⁺、Mg²⁺ PBS (50 ~ 100 mL/g Cephodex) 的洁净烧杯中, 充分搅拌使其在 PBS 中分散混悬, 并用新鲜的 100 mL PBS (30 ~ 50 mL/g Cephodex) 溶液重复清洗 2 次, 微载体经水化后于 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min, 置 4 °C 冰箱备用。

1.5 间歇搅拌条件对 GiCB 细胞贴壁的影响

细胞在上球贴附阶段采用间歇搅拌方式进行培养, 贴附时间为 8 h。实验分组见表 1。

细胞贴壁率的计算公式^[11]:

$$P = (1 - X / X_0) \times 100\% \quad (2)$$

式中: X 为培养液中的游离细胞数; X_0 为细胞接种数。

空球率的计算: 取样至于载玻片上, 显微镜观察并计算 100 个以上微载体中空球所占的比例。

表 1 贴壁期间歇搅拌条件

Tab. 1 Agitation conditions during cell attachment

搅拌条件	A 组	B 组	C 组	D 组
Agitation conditions	Group A	Group B	Group C	Group D
培养体积/mL	400	400	400	400
Culture volume				
静置时间/min	50	30	30	50
Stilling time				
搅拌速度/(r/min)	35	35	45	45
Agitation speed				
搅拌时间/min	2	2	2	2
Agitation time				

1.6 血清浓度对 GiCB 细胞贴壁的影响

细胞贴附期间, 分别用含 0%、5%、10%、15% FBS 浓度的 M199 培养液进行培养, 每 30 min 间歇搅拌 2 min, 贴附 8 h 后取样, 测定细胞贴壁率。

1.7 最适微载体用量的确定

微载体用量设置 3 个浓度, 分别为 3、6 和 9 g/L, 细胞接种密度为 2.5×10^5 cells/mL, 血清浓度为 10%, 在 28 °C 培养箱中以转速 35 r/min, 每静置 30 min 搅拌 2 min 的间歇搅拌方式促进贴壁, 8 h 后以 45 r/min 的转速连续搅拌生长, 每天取样观察 GiCB 细胞在微载体上的生长情况, 并进行细胞计数, 绘制生长曲线。

1.8 最适细胞接种密度的确定

微载体用量为 6 g/L, 血清浓度为 10%, 以 1.0×10^5 cells/mL、 2.5×10^5 cells/mL、 4.0×10^5 cells/mL 的密度接种细胞, 培养总体积 400 mL, 培养条件如 1.7 所述, 每天取样观察 GiCB 细胞在微载体上的生长情况, 并进行细胞计数, 绘制生长曲线。

1.9 最适搅拌速度的确定

微载体的用量为 6 g/L, 血清浓度为 10%, 细胞接种密度为 2.5×10^5 cells/mL, 细胞经 8 h 间歇搅拌后进行连续搅拌, 转速分别为 35、45、55 r/min, 每天取样, 观察微载体上细胞生长和增殖情况, 并用台盼蓝计数法计数细胞, 绘制生长曲线, 确定最适搅拌速度。

1.10 细胞形态观察与计数

细胞贴附 8 h 后, 在均匀悬浮状态下定时取样 2 mL 静置, 去上清, PBS 清洗, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清后加入 1 mL 0.25% 的胰酶溶液消化细胞, 并用等量的 10% 的 M199 培养基终止消化, 吸管吹打直至细胞从微载体上脱落, 台酚

蓝法计数细胞;同样方法取样,在倒置显微镜下观察细胞在微载体表面的生长状态。

1.11 病毒感染及电镜观察

采用最优的工艺条件培养 GiCB 细胞,工作体积为 400 mL,待形成微载体细胞单层后,静置 3~5 min,弃培养液,以 MOI 为 0.2 的 CyHV-2 病毒液接种细胞,每 15 min 摇晃一次促进病毒吸附,1 h 后,加入血清浓度 2% 的 M199 维持液至终体积 400 mL,低速磁力搅拌器上以 40 r/min 的转速连续搅拌。在接种病毒后 24、36、48、60、72、96 和 120 h 取微载体细胞样,用 PBS 清洗两次后,2.5% 的戊二醛固定 2 h,经脱水、干燥等处理后,将制好的样品在扫描电子显微镜上观察微载体细胞病变情况。

1.12 病毒增殖曲线测定

在 1.11 的培养条件下,分别在接种病毒后 1、12、24、48、60、84、108 和 120 h 时取细胞培养液 2 mL,于 -80 °C 反复冻融 3 次,4 °C 5 000 r/min 离心 30 min 去除细胞碎片,用 Reed-Muench 法进行 TCID₅₀(半数组织培养感染剂量)的测定^[12],设 3 次重复测定试验,绘制病毒增殖动态曲线。Reed-Muench TCID₅₀公式计算:

$$P = (A - 50) / (A - B) \quad (3)$$

$$\lg \text{TCID}_{50} / 0.1 \text{ mL} = \lg D + P \times \lg C \quad (4)$$

式中: P 为距离比例; A 为高于 50% CPE 率; B 为低于 50% CPE 率; D 高于 50% 的稀释度; C 稀释系数。

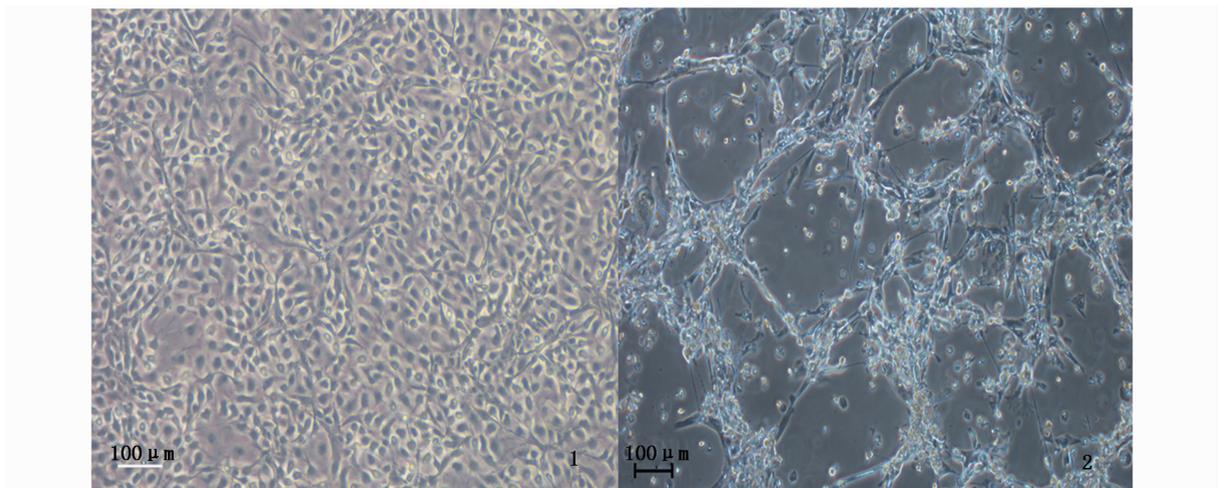
1.13 病毒增殖曲线测定

所有的实验至少重复 3 次。数据以平均值 ± 标准偏差的形式表示,采用 Welch 校正的非配对 t 检验。 $P \geq 0.05$ 认为无显著性差异,用“ns”表示; $P < 0.05$ 认为差异显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 认为差异非常显著,用“**”表示; $P < 0.001$ 认为差异极显著,用“***”表示。

2 结果

2.1 GiCB 细胞静置培养的形态及病变效应

正常 GiCB 细胞在培养瓶中静置培养,其轮廓清晰,形态均一,为成纤维样细胞,传代后 3~5d 可长满单层,细胞单层稳定(图版 I-1)。CyHV-2 接种 GiCB 后 2d 细胞开始病变,5d 左右可见明显的细胞病变效应(CPE)。与正常细胞相比,病变的细胞收缩、变圆,折光度增加,细胞碎片增多,细胞拉长,最后细胞单层崩解呈破渔网状(图版 I-2)。



图版 I 静置培养条件下 CyHV-2 感染 GiCB 细胞的细胞病变效应

Plate I Cytopathic effect of CyHV-2 infected GiCB cells during stilling culture

1. 正常 GiCB 细胞; 2. 病毒感染 5 d 后的 GiCB 细胞

1. normal GiCB cells; 2. cytopathic effect in GiCB cells after CyHV-2 infection at 5 d post-infection

2.2 间歇搅拌条件对 GiCB 细胞贴壁的影响

不同的间歇搅拌条件(A、B、C、D 组)对细胞

的贴壁率的影响见图 1。B 组 GiCB 细胞贴壁率最高,为 90% 左右,D 组其次,C 组细胞贴壁率最

低。倒置显微镜下观察,D 组 GiCB 细胞在微载体上分布很不均匀,与 A 组均呈现部分细胞抱团生长的现象,且间歇搅拌时微载体细胞不能均匀的悬浮在培养基中;C 组 GiCB 细胞空球现象明显,空球率近 50%;B 组 GiCB 细胞较均匀分布在每个微载体上,细胞空球率最低,约 5% 左右。因此确定 B 组为 GiCB 细胞贴附期的最适间歇搅拌条件。

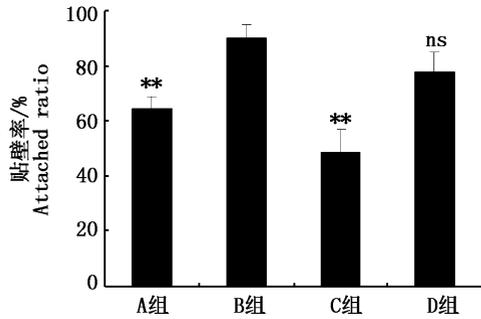


图 1 间歇搅拌条件对 GiCB 细胞贴壁率的影响

Fig. 1 Effects of stirring method on the attachment efficiency of GiCB cells

$P \geq 0.05$ 认为无显著性差异,用“ns”表示; $P < 0.05$ 认为差异显著,用“*”表示; $P < 0.01$ 认为差异非常显著,用“**”表示,图 2 同

ns indicate there was no significant difference between two groups ($P \geq 0.05$); * indicate there was a significant difference between two groups ($P < 0.05$); ** indicate there was a very significant difference between two groups ($P < 0.01$), the same in fig. 2

2.3 血清浓度对 GiCB 细胞贴壁的影响

细胞经过 8 h 的间歇搅拌贴附期后,不同血清浓度对细胞贴壁率的影响见图 2。血清浓度为 0% 时,细胞贴壁率显著低于其他组;血清浓度为 5% 时,细胞贴壁速度较慢且贴壁率相对较低;血清浓度为 10% 和 15% 时,细胞贴壁率相近,均为 90% 左右,且在倒置显微镜下观察细胞在微载体上的贴附状态和铺展状况无显著差异。考虑到细胞在后期生长过程中对营养成分的需求以及血清成本因素,选择细胞贴壁期合适的血清浓度为 10%。

2.4 微载体浓度对细胞生长的影响

固定细胞接种浓度为 2.5×10^5 cells/mL,不同的微载体浓度随时间的变化对细胞密度的影响不同(图 3)。随着微载体浓度的升高,最大细胞密度也随之升高。当微载体浓度为 3 g/L 时,细胞密度在 72 h 时达到最大后随之下降。微载

体浓度为 6 g/L 和 9 g/L 时,60 h 内细胞的生长趋势相近,在 84 h 左右细胞密度达到最大,分别是 1.93×10^6 cells/mL 和 2.05×10^6 cells/mL;但 84 h 后,浓度为 9 g/L 组细胞密度下降较 6 g/L 组明显。综合考虑,最适微载体浓度选择 6 g/L。

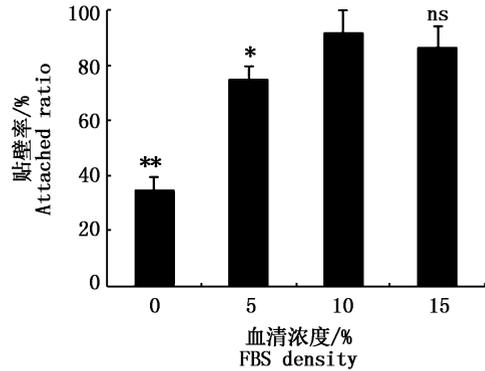


图 2 不同血清浓度对 GiCB 细胞贴壁率的影响

Fig. 2 Effects of different FBS concentrations on GiCB attachment efficacy

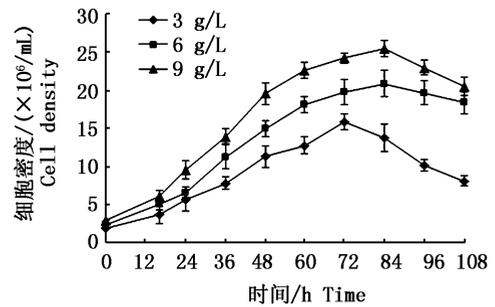


图 3 不同 Cephodex 浓度下 GiCB 细胞生长曲线

Fig. 3 Growth curves of GiCB cells with different Cephodex concentrations

2.5 接种密度对 GiCB 细胞生长的影响

不同的细胞接种密度对细胞在微载体上生长曲线见图 4。当接种密度为 1.0×10^5 cells/mL 时,微载体的空载较高,细胞增殖速度缓慢,能达到的最大细胞密度最低。细胞接种密度为 4.0×10^5 cells/mL 时,倒置显微镜下观察微载体上分布的细胞数量高,但在 84 h 后出现了多个微载体聚集、细胞团聚的现象,此后部分细胞开始出现脱落,108 h 细胞密度下降明显。在 2.5×10^5 cells/mL 的接种密度下,细胞在微载体表面分布较均匀,达到稳定期的时间与细胞密度和 4.0×10^5 cells/mL 的接种密度时相近,微载体上细胞单层稳定。因此,选择微载体培养 GiCB 细胞时的最佳接种密度为 2.5×10^5 cells/mL。

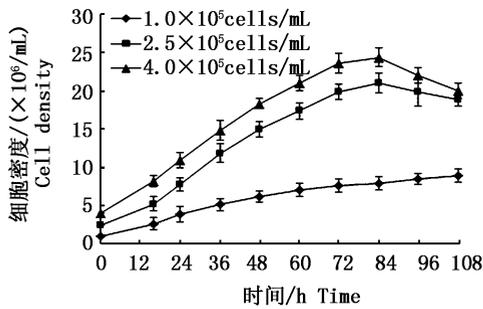


图4 不同细胞接种密度对 GiCB 细胞生长的影响
Fig. 4 Effects of inoculated cell densities on the growth of GiCB cells

2.6 搅拌速度对 GiCB 细胞生长的影响

固定细胞接种浓度为 2.5×10^5 cells/mL, 不同搅拌速度下对细胞在微载体上生长曲线见图 5。当转速为 35 r/min 时, 细胞在培养液中不能充分悬浮, 易引发细胞团的聚结、汇合, 显微镜下观察细胞在微载体表面分布不均匀; 当转速为 55 r/min 时, 84 h 后微载体上的细胞开始脱落, 细胞团崩解, 上清液中可见有少量细胞团的存在, 细胞生长状态一般; 当转速为 45 r/min 时, 细胞的生长密度有所增加, 且在 96 h 时细胞仍保持良好的生长状态。因此选择 GiCB 细胞生长期的最佳搅拌速度为 45 r/min。

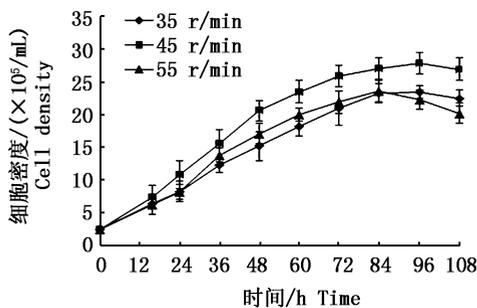


图5 不同搅拌速度下 GiCB 细胞生长曲线
Fig. 5 Growth curves of GiCB cells at different stirring speeds

2.7 GiCB 细胞在 Cephodex 微载体上的形态观察

按优化后的培养条件进行微载体细胞培养, 分别在接种后 12、24、48 和 72 h 后取样, 用倒置显微镜和扫描电子显微镜进行观察(图版 II), 结果均显示 GiCB 细胞在 Cephodex 微载体上生长良好。在接种 12 h 后细胞大部分贴附在微载体表面(图版 II-2), 但只有部分细胞开始铺展; 24 h

后贴附的细胞迅速分裂增殖, 在微载体空白表面延伸包覆, 以类似于方瓶培养的形式单层生长, 细胞开始在微载体之间迁移(图版 II-4); 48 h 后细胞已基本长满微载体表面, 细胞的轮廓开始模糊, 部分细胞已贴附于首层细胞之上生长(图版 II-3, 5); 72 h 后 90% 以上的细胞在微载体上呈现多层生长的状态, 微载体之间出现了多“架桥”的现象(图版 II-6)。

2.8 病毒感染与电镜观察

在最优的工艺条件下接种 CyHV-2, 分别在倒置显微镜与扫描电镜下观察微载体上细胞的病变情况, 可看到明显的 CPE(图版 III)。在病毒感染后 36 h, 微载体细胞单层被破坏(图版 III-1), 微载体间的细胞“架桥”断裂, 细胞出现皱缩变圆凝集, 病变细胞之间的空隙增大, 此时 60% 的粘连微载体已解离成单个微载体, 96 h 后细胞裂解并从微载体表面脱落下来(图版 III-4, 5), 在微载体上留下因细胞脱落后膜碎片形成的痕迹或细胞碎片, 120 h 时微载体上的细胞病变脱落率达 90%(图版 III-2, 3), 此时收集培养病毒。于 96 孔微量培养板(Coming, USA)上进行收集病毒滴度的测定, 按照 Reed-Muench 方法计算收获液的病毒滴度为 $10^{6.50 \pm 0.30}$ TCID₅₀/mL。

2.9 病毒增殖曲线测定

微载体培养条件下 CyHV-2 的增殖动态如图 6。病毒接种细胞 12 h 后, 病毒滴度开始上升, 24 h 后病毒增殖进入对数生长期, 96 h 后病毒增殖减慢, 108 h 左右病毒滴度达到最大, 之后趋于稳定, 经计算病毒滴度(TCID₅₀/mL)可达 $10^{6.50 \pm 0.30}$ 。

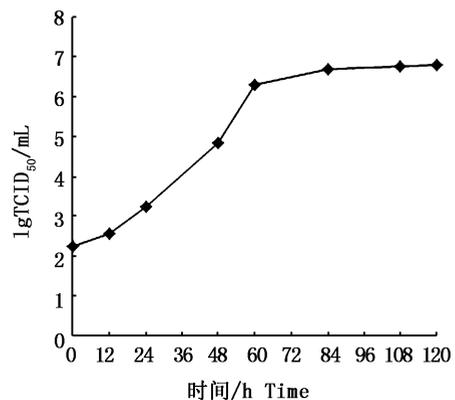
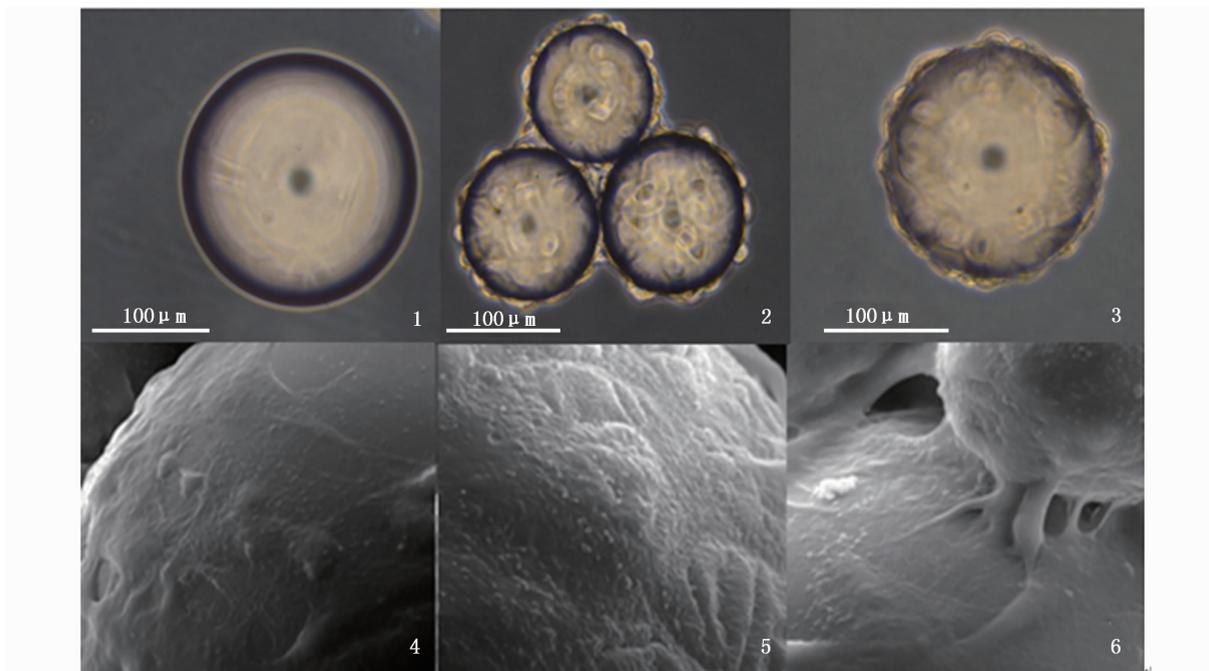


图6 CyHV-2 在微载体培养条件下的增殖动态
Fig. 6 Proliferation dynamics of CyHV-2 in microcarrier culture system

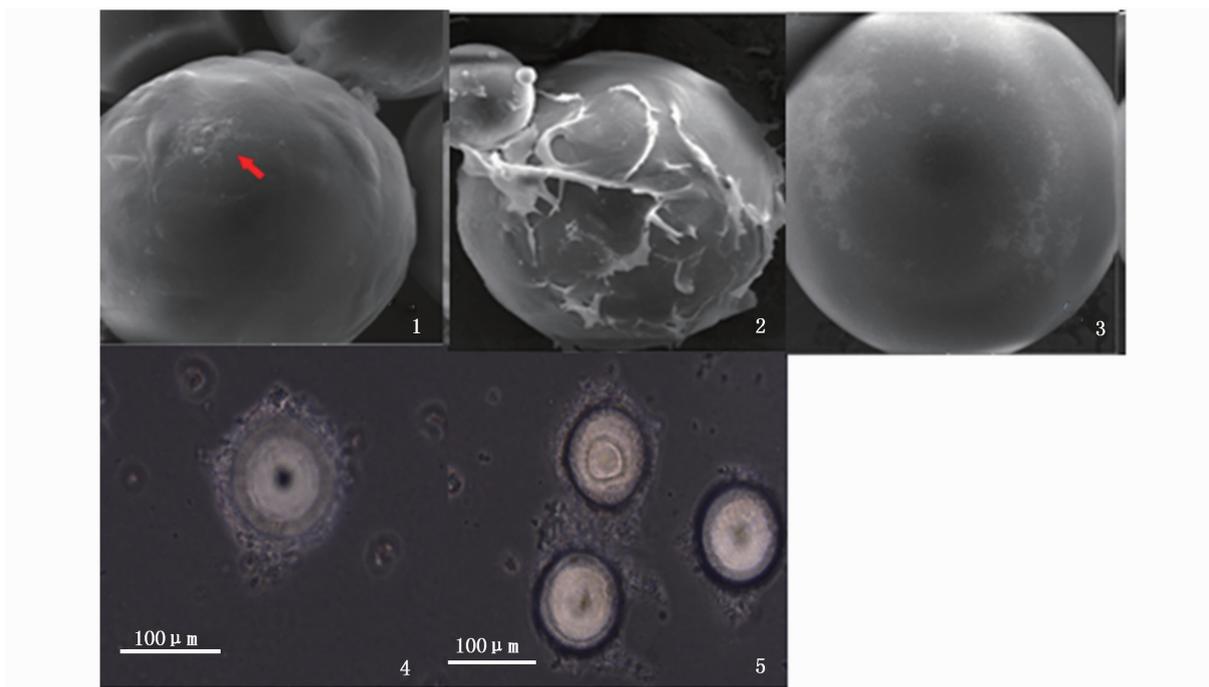


图版 II GiCB 细胞在 Cephodex 微载体表面的形态观察

Plate II Morphology of GiCB cells growth on Cephodex microcarriers

倒置显微镜观察:(1)空载体,(2)12 h,(3)48 h;扫描电镜观察:(4)24 h,(5)48 h,(6)72h,细胞“架桥”

Inverted microscopy: (1)Empty microcarriers; (2)12 h; (3)48 h; Scan electron microscopy: (4)24 h; (5)48 h; (6)72 h, cell “bridge”



图版 III GiCB 细胞在 Cephodex 微载体表面的细胞病变效应

Plate III Cytopathic effects of GiCB cells on microcarrier infected with CyHV-2

扫描电镜观察:(1)36 h,(2)60 h,(3)120 h;倒置显微镜下观察:(4)48 h,(5)96 h

Scan electron microscopy: (1)36 h, (2)60 h, (3)120 h; Inverted microscopy: (4)48 h, (5)96 h

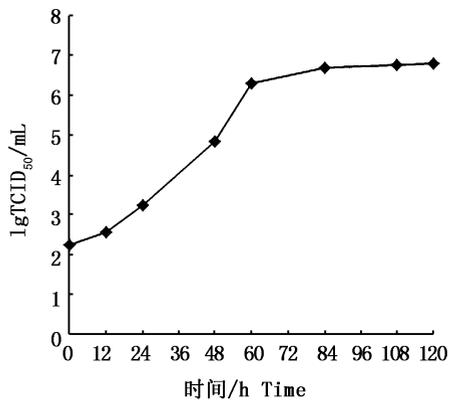


图 6 CyHV-2 在微载体培养条件下的增殖动态

Fig. 6 Proliferation dynamics of CyHV-2 in microcarrier culture system

3 讨论

微载体悬浮培养技术具有单位表面积大、细胞培养密度高、成本低廉等优点,是疫苗规模化生产工艺的发展方向^[13-14]。微载体细胞培养是否成功很大程度上决定于细胞贴壁率的高低^[15-16]。本研究发现间歇搅拌时的静置时间和搅拌速度对细胞贴壁效率影响较大。静置时间的长短影响细胞在微载体上分布的均匀性,静置时间越长,分布越不均匀;反之细胞贴壁不牢或未贴壁的细胞越多。搅拌速度的增加可提高微载体表面细胞分布的均匀性,但当转速过大时(>65 r/min)细胞贴壁率却降低甚至造成细胞的死亡,可能是高转速产生的剪切力和湍流涡旋力对刚贴壁的细胞造成了破坏。经研究选择以转速 35 r/min,每静置 30 min 搅拌 2 min 的间歇搅拌方式贴壁效果最佳。比较在不同血清浓度(0%、5%、10%、20%)下 GiCB 细胞在微载体上的贴壁情况,无血清(0%)浓度下细胞贴壁率低,可能原因在于血清成分和生物学作用复杂,浓度过小情况下黏附因子、扩展因子、结合蛋白等物质缺失,贴附基本靠物理吸附作用^[17],进而造成细胞附着性降低、贴壁困难等^[18],而 5%、10%、15% 血清浓度对细胞均有较强的促进贴壁作用,但其浓度与微载体细胞的贴壁率也并非成正比。蒋丹丹等和杨琴等对不同微载体悬浮培养的研究中却证实降低血清浓度有利于提高贴壁率^[17,19-20],可见血清浓度的高低对不同微载体培养细胞时的影响效果不同。因此,在微载体细胞

培养时,根据不同微载体的特性和细胞的生长状态类型选择合适的血清浓度对于提高细胞的贴壁率意义重大。

许多研究表明,合适的微载体浓度和细胞接种密度对细胞微载体悬浮培养阶段的细胞生长有密切的关系^[21-23]。3 g/L 微载体浓度下最大细胞密度仅为 1.5×10^6 cells/mL,且达到最大密度后细胞数量迅速下降,可能是由于微载体表面贴附面积有限,细胞生长空间不足导致;9 g/L 微载体浓度下达到的最大细胞密度为 2.6×10^6 cells/mL,但相对较高的细胞密度下微载体利用率仅为 45%,且过多的微载体用量并未使细胞密度成比例的增加,这与何锡忠等^[24]在微载体培养 PK-15 细胞条件优化研究中有同样发现,微载体浓度与最大细胞密度仅有一定程度的相关性^[25],推测原因可能与在转瓶系统中培养环境的溶氧性、pH、细胞之间的碰撞摩擦、细胞毒性效应等因素有关。 1.0×10^5 cells/mL、 2.5×10^5 cells/mL、 4.0×10^5 cells/mL 的接种密度下,达到的最大细胞密度比为 1:1.9:2.2,说明提高接种密度后微载体的表面利用率增加,扩增倍数增加,但高接种密度仅使最大细胞密度提高了 13.6%,细胞间的接触抑制作用明显。为提高载体利用率以及细胞培养效率,选择 6 g/L 的微载体浓度, 2.5×10^5 cells/mL 的细胞接种密度培养细胞。

微载体悬浮培养时,当搅拌速度过低(0~30 r/min),微载体细胞悬浮不均匀,培养瓶底部有微载体颗粒沉降堆积;当搅拌速度过大(>65 r/min)时,机械搅拌产生的湍流、层流和涡流等流体作用力加大了对细胞的损伤,使细胞从微载体上脱落,培养基中有大量可见的细胞团。因此本研究选择 45 r/min 的搅拌转速,使微载体细胞恰好均匀悬浮生长且增殖较好。

本文通过研究确定了规模化培养鲫脑组织细胞 GiCB 及病毒的多项基本工艺参数,表明利用微载体培养系统规模化制备鲤疱疹病毒 II 型疫苗具有极大的应用潜力。但因实验中尚未测定细胞培养过程中代谢产物等是否会引起培养液中血清蛋白、无机元素、细胞因子、pH 等的变化对细胞和病毒增殖的影响,因此仍需进一步深入探索微载体悬浮培养 GiCB 细胞和鲤疱疹病毒 II 型的工艺条件。

参考文献:

- [1] WANG L, HE J Q, LIANG L Q, et al. Mass mortality caused by Cyprinid Herpesvirus 2 (CyHV-2) in Prussian carp (*Carassius gibelio*) in China [J]. Bulletin- European Association of Fish Pathology, 2012, 32(5): 164-173.
- [2] XU J, ZENG L B, ZHANG H, et al. Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 166(1/2): 138-144.
- [3] MA J, JIANG N, LAPATRA S E, et al. Establishment of a novel and highly permissive cell line for the efficient replication of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) [J]. Veterinary Microbiology, 2015, 177(3/4): 315-325.
- [4] ZHANG L L, MA J, FAN Y D, et al. Immune response and protection in gibel carp, *Carassius gibelio*, after vaccination with β -propiolactone inactivated cyprinid herpesvirus 2 [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 49: 344-350.
- [5] GOORHA R M. Preparation and assay of vesicular stomatitis virus [J]. Methods in Enzymology, 1981, 78: 309-312.
- [6] CRESPI C L, THILLY W G. Continuous cell propagation using low-charge microcarriers [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1981, 23(5): 983-993.
- [7] VAN WEZEL A L. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture [J]. Nature, 1967, 216(5110): 64-65.
- [8] 叶雪平, 杨广智, 罗毅志, 等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗生产工艺的比较 [J]. 中国兽药杂志, 1998, 32(4): 9-12.
- YE X P, YANG G Z, LUO Y Z, et al. Studies on technology of grass carp haemorrhage inactive vaccine production [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 1998, 32(4): 9-12.
- [9] 陈志宏, 陈因良, 施源, 等. 生物反应器微载体系统大规模培养草鱼细胞及病毒 [J]. 华东理工大学学报, 1991, 17(4): 416-420.
- CHEN Z H, CHEN Y L, SHI Y, et al. Large-scale microcarrier culture of fish cells and viruses in Bioreactor [J]. Journal of East China University Science and Technology, 1991, 17(4): 416-420.
- [10] 刘秋凤, 曾令兵, 周勇, 等. 微载体规模化培养草鱼细胞与病毒工艺及优化 [J]. 淡水渔业, 2013, 43(4): 69-75.
- LIU Q F, ZENG L B, ZHOU Y, et al. Technique and optimization for large-scale culture of grass carp cells and reovirus by microcarrier [J]. Freshwater Fisheries, 2013, 43(4): 69-75.
- [11] Uppsala Pharmacia Fine Chemicals. Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods [M]. Sweden: Pharmacia Fine Chemicals, 1981: 1-107.
- [12] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- YIN Z, LIU J H. The Animal Virus [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997.
- [13] 刘苹, 李平, 周元国, 等. 血清浓度对 TGF- β 1 刺激成纤维细胞增殖的影响 [J]. 西南军医, 2008, 10(5): 1-3.
- LIU P, LI P, ZHOU Y G, et al. The proliferate effect of fibroblast with different concentration serum induced by TGF- β 1 [J]. Journal of Military Surgeon in southwest China, 2008, 10(5): 1-3.
- [14] PERRIN P, MADHUSUDANA S, GONTIER-JALLET C, et al. An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture process; use of serum-free medium and perfusion-reactor system [J]. Vaccine, 1995, 13(13): 1244-1250.
- [15] REISINGER K S, BLOCK S L, IZU A, et al. Subunit influenza vaccines produced from cell culture or in embryonated chicken eggs: comparison of safety, reactogenicity, and immunogenicity [J]. Journal of Infectious Diseases, 2009, 200(6): 849-857.
- [16] FORESTELL S P, KALOGERAKIS N, BEHIE L A, et al. Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 39(3): 305-313.
- [17] CHUN B H, CHUNG S I. Attachment characteristics of normal human cells and virus-infected cells on microcarriers [J]. Cytotechnology, 2001, 37(1): 1-12.
- [18] 章静波, 张世馥, 黄东阳. 组织和细胞培养技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- ZHANG J B, ZHANG S Y, HUANG D Y. Tissue and Cell Culture Techniques [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [19] 蒋丹丹, 胡静波, 周燕, 等. 兔骨髓间充质干细胞在 Cytodex3 微载体悬浮培养系统中的贴附条件优化 [J]. 生物医学工程学杂志, 2007, 24(4): 884-888.
- JIANG D D, HU J B, ZHOU Y, et al. Optimization of attachment conditions for rabbit mesenchymal stem cells in cytodex 3 microcarrier culture system [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2007, 24(4): 884-888.
- [20] 杨琴, 张兴晓, 杨灵芝. 3 种细胞培养流感病毒的比较 [J]. 动物医学进展, 2009, 30(11): 76-79.
- YANG Q, ZHANG X X, YANG L Z. Comparison of culturing influenza virus in three kinds of cell lines [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2009, 30(11): 76-79.
- [21] BOCK A, SCHULZE-HORSEL J, SCHWARZER J, et al. High-density microcarrier cell cultures for influenza virus production [J]. Biotechnology Progress, 2011, 27(1): 241-250.
- [22] HU W S, MEIER J, WANG D I C, et al. A mechanistic analysis of the inoculum requirement for the cultivation of mammalian cells on microcarriers [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1985, 27(5): 585-595.
- [23] HU A Y C, WENG T C, TSENG Y F, et al. Microcarrier-based MDCK cell culture system for the production of

- influenza H5N1 vaccines [J]. *Vaccine*, 2008, 26 (45): 5736-5740.
- [24] 何锡忠, 李春华, 倪建平, 等. 微载体培养 PK-15 细胞试验条件的优化[J]. *动物医学进展*, 2010, 31(8): 20-23.
HE X Z, LI C H, NI J P, et al. Optimization of condition for culture of PK-15 cell by microcarrier [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2010, 31(8): 20-23.
- [25] GENZEL Y, OLMER R M, SCHÄFER B, et al. Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media [J]. *Vaccine*, 2006, 24(35/36): 6074-6087.

Studies on the technology for large-scale cultivation of gibel carp brain cells and cyprinid herpesvirus 2 by microcarrier

WANG Weiling¹, LIU Wenzhi², MA Jie², ZHOU Yong², FAN Yuding², ZENG Lingbing^{1,2}

(1. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Yangtze River Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, Hubei, China*)

Abstract: In this study, the technology for the large-scale cultivation of gibel carp brain cells and CyHV-2 by Cephodex microcarrier in suspension system was investigated. The results showed that the Cephodex microcarrier is suitable for the growth of anchorage-dependent GiCB cells. The optimal serum concentration for cells attaching to the Cephodex microcarrier was 10%, the microcarrier concentration was 6 g/L and the density of cells inoculated was 2.5×10^5 cells/mL. With an intermittent agitation for 2 min at 35 rpm after 30 min stilling culture, the attachment efficacy reached 90% after 8 h cultivation; while in growing period, the optimal speed was 45 r/min for continuous agitation. After infection of GiCB cells on Cephodex microcarrier with CyHV-2 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.2, the typical cytopathic effect (CPE) appeared after 5 days post-infection and the virus titer (TCID₅₀/mL) reached $10^{6.50 \pm 0.30}$. This study established a solid basis for the large-scale preparation of vaccine against the crucian carp hematopoietic necrosis.

Key words: GiCB cell line; cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2); microcarrier; large-scale culture