

细胞生物反应器大规模培养 草鱼细胞和病毒*

叶雪平 杨广智 罗毅志

(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

陈因良 陈志宏

(华东化工学院生化工程研究所, 上海 200237)

提 要 应用细胞生物反应器微载体悬浮培养法, 对草鱼胚胎细胞 CP-80 进行大规模培养, 同时增殖草鱼出血病病毒。细胞经培养 6 天后, 细胞量可达到 8.4×10^6 cells/ml, 较始接量 (2×10^6 cells/ml) 提高了 41 倍。接入草鱼出血病病毒后, 经 5 天培养增殖, 毒力达到 $8.0 \text{ IgTCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$, 较始接毒力 ($3.75 \text{ LgTCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$) 增加了 4.25 个对数值。

关键词 细胞生物反应器, 微载体悬浮培养, 草鱼细胞, 草鱼出血病病毒

Van Wezel(1967)首先报道了应用 Deae Sephadex Δ -50 作微载体进行动物贴壁细胞(anchorage dependent cells)的培养, 使细胞产量获得了成倍提高。至今已有近百种动物细胞在各种微载体上进行培养。近十年来建立起来的细胞生物反应器培养工艺, 由于优化了细胞生长条件, 使单位培养液的细胞产量较之一般的静培养, 提高了几倍甚至几十倍。现在微载体悬浮培养细胞技术正广泛应用于人医和兽医的疫苗、干扰素、单克隆抗体、激素、酶等细胞生物产品的研究和生产。

Bruce L. Nicholson (1980)应用微载体培养技术, 培养 5 种鱼类细胞并进行传染性胰脏坏死病病毒(IPNV)的增殖。在静置培养条件下 CHSE 等等细胞产量可达到 2.9×10^6 cells/ml, 接入 IPNV 后病毒毒力比静置单层培养提高了 2 倍。CHARLES BUCK 和 C.P.Loh(1985)报道了用 100ml 转瓶(spinner bottle)进行了 BB、RTG-2 等 6 种鱼细胞的培养, 同时增殖 CCV 病毒, 细胞和病毒产量均有明显提高。但迄今为止, 应用细胞生物反应器进行鱼类细胞和病毒的大规模培养, 国内外尚未见报道。我们应用 GT-2 微载体, 将草鱼胚胎细胞和出血病病毒在细胞生物反应器中进行悬浮培养, 取得了高效增殖的效果。

材料与 方法

(一) 材 料

* 浙江省淡水水产研究所曹 铮、张 勤, 华东化工学院生物工程研究所华 平、顾林祥、郑白龙、徐殿胜等同志给予了大力协助和支持, 谨表衷心感谢。

收稿年月: 1990 年 12 月; 1991 年 8 月修改。

1. 细胞 草鱼吻端组织细胞 ZC-7901 和草鱼胚胎细胞 CP-80 均由浙江淡水水产研究所建株。
2. 微载体 GT-2 微载体由华东化工学院生物工程研究所细胞培养技术实验室提供。
3. 病毒 ZV-8909 草鱼出血病病毒株由浙江淡水水产研究所建立和保存。
4. 培养基 采用 199 培养基 (日本)。用前加小牛血清和双抗,并用 NaHCO_3 调节 pH 为 7.0~7.2。

5. 细胞生物反应器 采用 1.5 升的 Celligen™ 细胞培养系统 (美国 NBS 公司出品)。

(二) 培养方法

1. 细胞的悬浮培养 将种子细胞消化分散后与经过处理的微载体混合,混合后作静态吸附,间歇摇晃混合物,使细胞贴壁尽量均匀。之后,将混合物加入到培养罐中,同时加入培养液达到最终培养体积 (1200ml),开动搅拌系统使微载体悬浮在培养液中。

2. 细胞观察和计数 在悬浮培养过程中,每隔 24 小时取样观察细胞生长情况,同时取样 1.0ml,用 0.02% EDTA 消化后,在血球计数板上进行细胞计数。

3. 病毒的接种与收获 当细胞在微载体表面长满后,换入含草鱼出血病病毒的新鲜无血清培养液,继续悬浮培养。每隔 24 小时取样观察细胞病变情况,待细胞病变完成时,收集细胞病毒培养物,置 -30°C 保存。以细胞病变法 (TCID₅₀) 和鱼体感染法 (LD₅₀) 测定毒力。

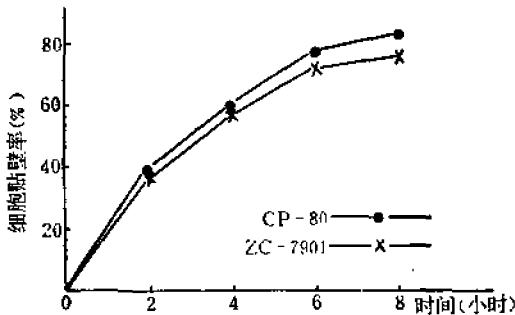


图 1 CP-80 和 ZC-7901 细胞在 GT-2 微载体上的贴壁率 (微载体 3.0mg/ml; 接种细胞量 3.1×10^6 cells/ml)

Fig. 1 Rate of CP-80 and ZC-7901 cells attachment to GT-2 microcarrier (Microcarrier concentration: 3.0mg/ml; Inoculation density: 3.1×10^6 cells/ml)

但两者相差不多。随着时间的延长,贴壁细胞逐渐增多,6 小时后均达到 70% 以上。24 小时后观察,培养液中仍有少量游离细胞。

(二) 细胞在微载体上的生长

按前述方法,将微载体与 CP-80 细胞混合并在 1.5 升的细胞生物反应器中进行悬浮培养。图 2 为细胞生物反应器的示意图。培养过程中根据细胞生长状况和培养液中葡萄糖含量的变化,在培养的第三和第五天分别换液 50% 和 60%。观察结果表明,细胞在吸附 6 小时后,大多数微载体的表面均附着上数量不等的球状细胞。悬浮培养 24 小时后,细胞开始分裂增殖,形态呈多角形并紧贴在微载体的表面。之后,细胞数呈倍增上升。5~6 天后,绝大部分微载体表面长满了细胞 (图版-1)。一些微载体间还出现了“细胞桥”现象

结 果

(一) 细胞在微载体上的贴壁

用 3mg/ml 的微载体分别与 3.1×10^6 cells/ml 的 ZC-7901 和 CP-80 细胞混合于 200ml 的玻璃瓶中,培养液的体积为 100ml,静置于 $25 \sim 26^\circ\text{C}$ 下进行吸附,每隔 1 小时摇动培养液并计数培养液中的细胞量,按细胞贴壁率 = $(1 - \text{培养液中的游离细胞数} / \text{细胞接种数}) \times 100\%$ 的公式计算细胞的贴壁率。图 1 为两种细胞在微载体上的贴壁变化。ZC-7901 细胞的贴壁率较 CP-80 细胞略低,

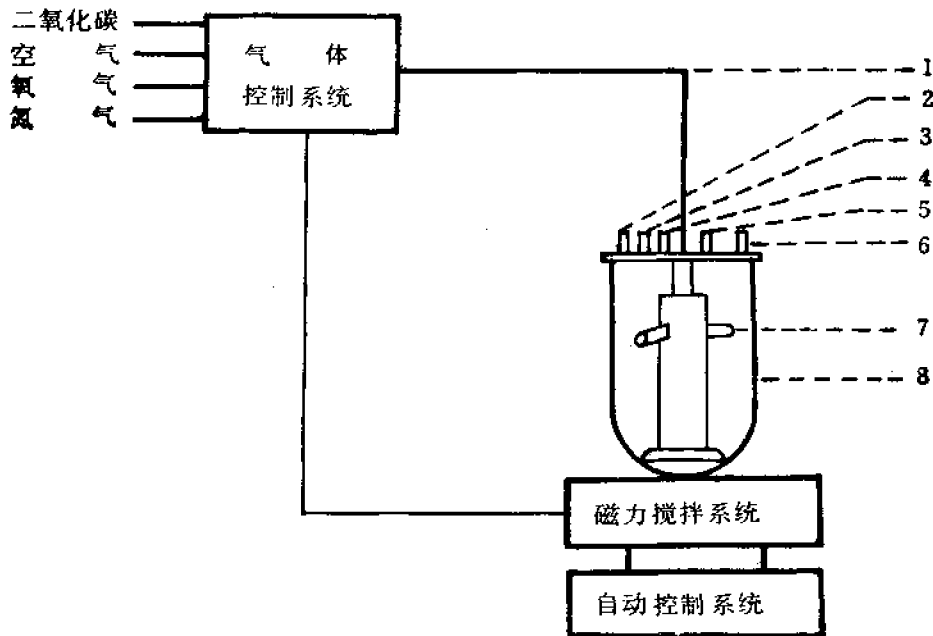


图2 Celligen™ 1.5升细胞生物反应器示意图

Fig. 2 Schematic diagram of Celligen™ 1.5L. cell-bioreactor

1. 进气口 2. 出气口 3. 出样口 4. 进样口 5. 溶氧电极 6. pH 电极 7. 搅拌桨 8. 培养罐

(图版-2)。CP-80 细胞在微载体悬浮培养时的生长曲线如图 3 所示。

图3 表明, 在 Celligen™ 反应罐中, 细胞数量随着培养时间逐渐增加, 而且每次换入新鲜培养液后, 细胞便出现较快的增长速度。培养至第 6 天时, 细胞数量达到最高, 为 8.4×10^6 cells/ml, 这一数量较始接浓度 2×10^6 cells/ml 提高了 41 倍。

(三) 病毒的培养和毒力测定

当细胞在微载体表面长满后, 将草鱼出血病病毒 (毒株 ZV-8909) 接种到培养罐中。病毒的接种量为 3.75 Lg TCID₅₀/0.1ml。调节培养液的 pH 至 7.2~7.4, 连续培养 6 天。经观察, 在病毒接入 1~2 天时, 细胞形态几乎没有变化, 培养至第 3 天, 细胞收缩变圆, 且有少量细胞开始脱离微载体表面 (图版-3)。随后, 细胞病变逐渐明显, 至第 5 天, 培养液中可见大量的游离细胞及一些细胞碎片, 多数微载体表面只剩少量细胞 (图版-4)。收集第 1~6 天细胞病毒培养物, 置 -30°C 下保存。以 TCID₅₀ 法测定毒力, 图 4 为病毒的增殖曲线。

图 4 表明, 病毒在第 1~2 天内, 毒力有些下降, 第 3 天起毒力开始增强, 至第 5 天达

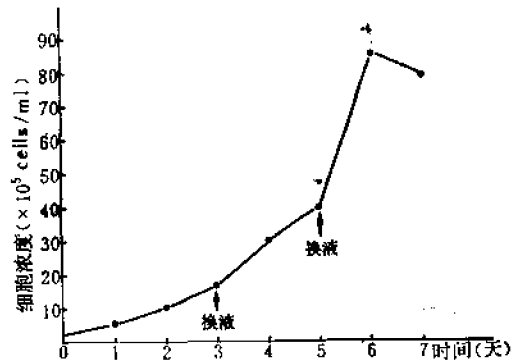


图3 CP-80细胞在生物反应器中的生长曲线(微载体 5.0 mg/ml; 细胞接种量 2.0×10^6 cells/ml)

Fig. 3 Growth rate of CP-80 cell in cell-bioreactor. (Microcarrier concentration: 5.0mg/ml; Inoculation density: 2.0×10^6 cells/ml)

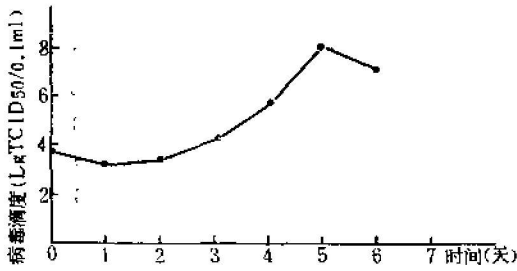


图4 ZV-8909病毒在细胞生物反应器中的增殖曲线(病毒接种量: 3.75 Lg TCID₅₀/0.1ml)

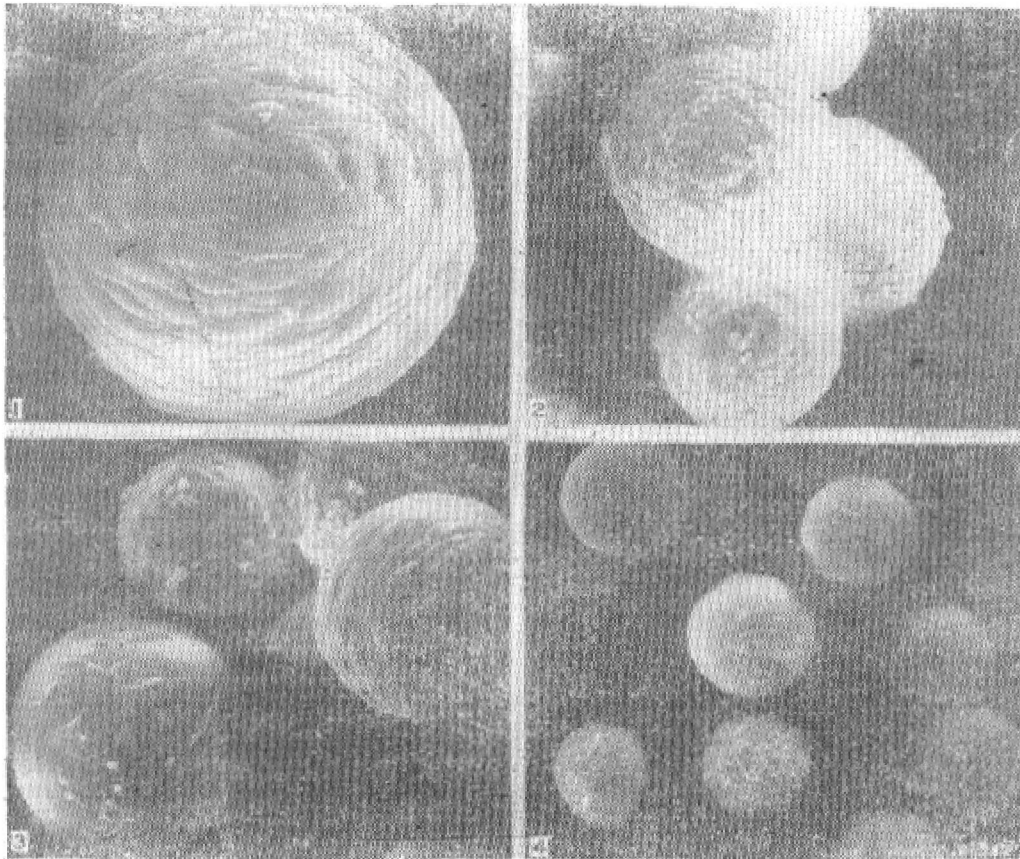
Fig. 4 Propagation rate of ZV-8909 virus in cell-bioreactor. (Inoculation titer: 3.75 Lg TCID₅₀/0.1ml)

Charles Buck 和 C. Philip(1985)在用 Bio-Rad 微载体培养 BB 细胞时,发现细胞生长良好,但在 Cytodex 微载体上生长却很缓慢。从我们的实验结果表明,用 GT-2 微载体进行 CP-80 细胞大规模悬浮培养是完全可行的。可见细胞与微载体之间存在一定的选择性。

到高峰,毒力达到 8.0 Lg TCID₅₀/0.1 ml,较接入时毒力提高了 4.25 个对数值。将第 5、6 天的细胞病毒培养物感染健康草鱼,其半数致死剂量分别为 6.75 Lg LD₅₀/0.5ml 和 6.0 Lg LD₅₀/0.5ml。

讨 论

1. Nicholson(1980)在 Deae-葡聚糖微载体上培养鱼类细胞后,认为 RTG-2 和 AS 等细胞不适宜悬浮培养。Char-



图版说明 Explanation of plate

1 微载体上正处于生长期的 CP-80 细胞(扫描电镜×5k)。2. 细胞长满微载体后,出现“架桥”现象(扫描电镜×2.4k)。3. 病毒感染四天后,细胞出现病变(扫描电镜×2.4k)。4. 病毒感染六天后,大多数细胞脱离微载体表面(扫描电镜×1.2k)。

2. 在细胞的微载体培养中,一些哺乳动物细胞常能较快地吸附到微载体表面,且贴壁率很高。Vero 细胞经 3 小时吸附后即能达到 80% 的贴壁率。相比之下,草鱼细胞的贴壁要慢得多,而且贴壁率也较低,本研究表明,CP-80 细胞经 3 小时吸附后,其贴壁率为 45% (见图 1)。因此,在进行草鱼细胞的微载体悬浮培养时,适当增加细胞的接种量和延长吸附时间是非常必要的。

3. 徐殿胜等(1989)在培养 Vero 细胞后认为,当微载体浓度为 2.0g/L 时,一个 1.5 升的反应罐可获得相当于 4 只 10 升滚瓶的细胞产量。我们在培养草鱼细胞时也获得了类似的结果。当微载体浓度为 5.0g/L 时,细胞产量可达到 8.4×10^6 cells/ml, 与我们静置单层培养细胞的产量 4×10^5 cells/ml 相比较,其单位培养液的细胞产量则可提高 21 倍,而培养液的用量只有静置培养的 1/6~1/8。可见,应用细胞生物反应器进行细胞培养,不仅能提高细胞产量,而且还能降低培养液的消耗。

4. 目前,国外已成功地将微载体培养细胞技术应用于脊髓灰质炎病毒疫苗及狂犬病疫苗的生产。在我国也开始应用该工艺进行干扰素、单克隆抗体及一些病毒的高表达研究。我们的研究结果显示了细胞生物反应器培养草鱼出血病病毒可得到高效的增殖。由于细胞生物反应器具有高产率、低消耗且能自动控制等优点,所以应用细胞生物反应器增殖鱼类细胞和病毒作为疫苗工厂化生产的基本工艺是具有广阔的发展前景。

参 考 文 献

- [1] 徐殿胜等,1989。微载体培养 Vero 细胞工艺条件初探。华东化工学院学报,15(4):441—446。
- [2] Bruce, L. Nicholson, 1980. Growth of fish cell lines on microcarriers. *Applied & environmental microbiology*, 39(2): 394—379.
- [3] Charles, D. Buck & C. Philip, Loh, 1985. Growth of brown bullhead (BB) and other fish cell lines on microcarriers and the production of channel catfish virus (CCV). *Journal of virological methods*, 10: 171—184.
- [4] Van Wezel, A. L., 1967. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature*, 216: 64.

LARGE-SCALE CULTURE OF GRASS CARP CELL AND VIRUS BY USING BIOREACTOR

Ye Xueping, Yang Guangzhi and Luo Yizhi

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

Chen Yinliang and Chen Zhihong

(East China University of Chemical Technology, Shanghai 200237)

ABSTRACT The embryo cell strain (CP-80) of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) has been cultured on a large scale by using microcarrier suspension culture. After being cultured with microcarriers for 6 days, the cell density can reach to about 8.4×10^6 cells/ml, which is 41 times as high as the initial inoculative concentration (2×10^5 cells/ml). Afterwards, the haemorrhagic virus of grass carp is inoculated into the bioreactor while the cells have just been full on microcarriers. The titer of virus can be increased to $8.0 \text{ LgTCID}_{50}/0.1\text{ml}$ in 5 days incubation, which is 4.25 logarithm values as high as the initial virulence.

KEYWORDS bioreactor, microcarrier suspension culture, grass carp cells, haemorrhagic virus of grass carp