

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,2016,44(2):247-251.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.071

生物反应器中 PRRSV 工业规模增殖工艺的建立

冯磊,王伟峰,吴培培,褚轩,陈丽,侯继波

(江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014)

摘要:分析比较了 3 种不同微载体悬浮培养工艺——分批换液式、消化传代放大式、循环灌注培养式对 Marc-145 细胞微载体培养效能及生理代谢的特点及差异,并实现了从 5 L 至 60 L 反应器放大过程的 PRRSV 实际增殖应用。结果表明,在 5 L 动物细胞反应器中使用相同的微载体用量 6 g/L,分批换液式培养和消化传代放大式培养仅获得 $27 \times 10^5 \sim 28 \times 10^5$ cells/mL 的细胞密度,低于循环灌注培养式的培养能力 (59.4×10^5 cells/mL)。根据这 3 种不同培养工艺的特点,设计并实施了可应用于实际生产的工艺流程,即 Marc-145 种子细胞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,结果显示 PRRSV 增殖滴度可达到 $10^{8.3}$ TCID₅₀/mL。该过程成功地模拟了 Marc-145 细胞在工业级水平上的放大培养操作工艺,其放大倍数达到 1:3 的传代系数,具备实际应用价值。

关键词:猪繁殖与呼吸综合征病毒;微载体培养;Marc-145 细胞;循环灌注培养;分批换液式培养;消化传代式培养

中图分类号: Q943.1;S858.285.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0247-05

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是一种严重危害养猪业的传染病 (猪蓝耳病)^[1]。控制猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 的主要办法是使用疫苗进行免疫防控,而提高病毒增殖规模及滴度是疫苗生产的一个重要目标。目前该疫苗的生产用细胞株为 Marc-145 细胞^[2],具体的生产工艺依然是实验室滚瓶培养工艺的简单数量放大,其生产规模、产品质量都有待于进一步提高。在生物反应器中完成细胞株的悬浮培养及病毒增殖,并按照工业规模要求完成规模放大是亟待解决的难题。

自从 1976 年 van Wezel 开发出动物细胞微载体培养技术^[3],生物制药领域进入了利用体外动物细胞培养工艺大规模生产重组蛋白、抗体、细胞因子、疫苗等生物技术药物的高速发展时期^[4-5]。到目前为止,微载体悬浮培养技术已在多种疫苗,如狂犬病疫苗^[6]、人流感疫苗^[7]、黄热病疫苗^[8]等大规模制备中起到关键性的作用。同时动物细胞的微载体悬浮培养也逐步形成了一些独特的培养条件、放大工艺及病毒增殖策略,以适用于不同的疫苗制备工艺需求。

本研究以 Marc-145 细胞为研究对象,在实验室 5 L 动物细胞反应器中考察了分批换液式、消化传代放大式、循环灌注式 3 种不同培养工艺对该细胞在微载体 (cytodex 1) 上生长及代谢的影响,按照该疫苗工业生产要求,评价并设计出不同培养工艺在细胞培养、病毒增殖过程中的具体应用模式,最终在 60 L 培养体积中实现整个病毒增殖过程,为我国 PRRS 疫苗的规模化生产提供应用基础。

1 材料与方法

1.1 细胞及种毒

Marc-145 细胞为国家兽用生物制品工程技术研究中心保藏细胞株。PRRSV 为国家兽用生物制品工程技术研究中心保藏毒种。

1.2 材料及设备

1.2.1 微载体 cytodex 1 购自 GE 公司。用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子的磷酸缓冲液清洗并浸泡至少 3 h 后,经 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 25 min 冷却后储于 4 ℃ 密封待用。使用前用 37 ℃ 的细胞培养液清洗 2 遍。

1.2.2 试剂 细胞培养液 DMEM 购自默克密理博清大天一科技有限公司。新生牛血清购自 Gibco 公司。配制成含有 5% 新生牛血清的 DMEM 培养液,其中含有 100 IU/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素,经无菌 0.22 μm 膜过滤除菌,4 ℃ 冷藏备用。胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司,用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子的磷酸缓冲液配制成 0.25% 浓度的胰蛋白酶溶液,调整 pH 值至 7.5~8.0,经无菌 0.22 μm 膜过滤除菌,4 ℃ 冷藏备用。

1.2.3 设备 5 L 动物细胞反应器由华东理工大学国家生化工程技术研究中心 (上海) 制造,反应器培养体积范围 1.2~4.0 L,具有溶解氧 (DO)、pH 值、温度、转速及四气 (N_2 、 O_2 、 CO_2 、空气) 控制系统。

60 L 动物细胞反应器由默克密理博北京清大天一科技有限公司制造,反应器培养体积为 48 L,具有 DO、pH 值、温度、转速及四气 (N_2 、 O_2 、 CO_2 、空气) 控制系统。

1.3 试验方法

1.3.1 5 L 生物反应器中 Marc-145 细胞微载体悬浮培养分批换液式操作 DO 电极、pH 电极标定及罐体安装完毕,经 121 ℃ 高压灭菌 45 min 及预培养 1 d (无菌检测) 后,用于 Marc-145 细胞的微载体悬浮培养,微载体用量分别为 3、6、9 g/L,初始细胞接种密度均为 3×10^5 cells/mL,培养体积为

收稿日期:2014-12-26

基金项目:公益性行业 (农业) 科研专项 (编号:201303046)。

作者简介:冯磊 (1979—),男,江苏南通人,博士,副研究员,主要从事兽用生物制品工程技术研究。E-mail: fengli@ hotmail. com。
通信作者:侯继波,研究员。E-mail: houjibo@ jaas. ac. cn。

4 L,利用分批换液式操作,即将培养液、细胞及微载体一次全部投入进行细胞培养,培养过程中根据实际情况进行换液操作。控制 DO 为 50% 饱和度,pH 值为 7.0~7.1,搅拌转速为 25~40 r/min,培养温度为 37 ℃。每天从反应器中吸取样品,测定细胞密度和培养液中营养成分浓度、代谢副产物浓度等。

不同培养方式的反应器预备安装、灭菌流程及过程参数的设定均同上所述,以下不再赘述。

1.3.2 5 L 生物反应器中 Marc-145 细胞微载体悬浮培养消化传代放大式操作 初始培养时微载体用量分别 2、3 g/L,初始细胞接种密度为 3×10^5 cells/mL,培养体积分别为 4 L。经过初始培养后,对 2、3 g/L 的微载体培养物进行消化操作,使细胞从微载体上消化脱落,将消化后的细胞和旧微载体一并分别接种于 16 g 和 12 g 新微载体中,进行消化传代后放大再培养,微载体的终浓度均为 6 g/L,培养体积均为 4 L。每天从反应器中吸取样品,测定细胞密度和培养液中营养成分浓度、代谢副产物浓度等。

1.3.3 5 L 生物反应器中 Marc-145 细胞微载体悬浮培养循环灌注式操作 微载体用量为 6 g/L,初始细胞接种密度为 3.5×10^5 cells/mL,培养体积为 4 L。培养 24 h 后,开始进行循环灌注操作,操作前期进行每天 1/2 个培养体积的循环灌注量,随着培养时间的延长及细胞生长的加快,将循环灌注的速率逐步提高至每天 1~3 个培养体积的循环灌注量。循环灌注操作需要安置 1 个大体积的贮液罐(贮液量 10~12 L),通过 2 个变速蠕动泵及硅胶管道将反应器和贮液罐闭环连接,形成培养液以一定流速从贮液罐中泵入反应器的同时,培养液以相同的流速从反应器中泵回贮液罐。每天分别从反应器和贮液罐中吸取样品,测定细胞密度和培养液中营养成分浓度、代谢副产物浓度等。

通过上述 3 种操作方式,在 5 L 动物细胞反应器中最终实现的都是在 6 g/L 微载体用量下进行 Marc-145 细胞的微载体悬浮培养,比较不同操作方式的培养效能。

1.3.4 消化后 Marc-145 细胞在 60 L 生物反应器中微载体悬浮培养操作及 PRRSV 接毒增殖操作 经消化处理后的 Marc-145 细胞检测细胞活率,按照初始细胞密度 3.0×10^5 cells/mL 重新接种于新微载体中,微载体的使用浓度为 3 g/L,培养体积为 48 L。设置细胞培养过程 pH 值、DO 及温度为自动控制。培养过程中每天检测细胞密度、营养物浓度及代谢副产物的浓度。视培养的具体情况选择换液或其他操作辅助细胞生长。

待细胞密度增长至 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells/mL 进行接毒操作,PRRS 种毒以 MOI=0.05 接入微载体悬浮培养 Marc-145 细胞的 60 L 反应器中^[9],接毒后 24、48、72 h 取样测定 PRRSV 的效价。

1.4 检测及计算方法

细胞密度的测定:均匀吸取微载体培养样品,经离心去除培养上清后,用 PBS 清洗 3 次,经 0.25% 胰酶溶液于 37 ℃ 消化 10 min 后获得游离细胞,以台盼蓝染色法,用血球计数板分别计死、活细胞数,计算细胞密度及存活率。每天取样测定,绘制 Marc-145 细胞的生长曲线。按下式计算 Marc-145 细胞的比生长速率 μ (d⁻¹):

$$\mu = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{x_t}{x_0}。$$

式中: t 为时间(d), x_t 为时间 t 时活细胞密度(cells/mL), x_0 为初始接种活细胞密度(cells/mL)。

培养液中的葡萄糖、乳酸、氨、谷氨酰胺浓度及渗透压均由 Nova 400 全自动生化分析仪进行测定。葡萄糖、谷氨酰胺比消耗速率(q_{Glu} 、 q_{Gln}),乳酸、氨比生成速率(q_{Lac} 、 q_{Amm}),乳酸生成对葡萄糖消耗的得率系数($Y_{\text{Lac/Glu}}$)以及 Marc-145 细胞对营养物消耗的得率系数($Y_{\text{cell/Glu}}$ 、 $Y_{\text{cell/Gln}}$)按下列公式计算:

$$q_{\text{Glu}} \text{ 或 } q_{\text{Gln}} = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt};$$

$$q_{\text{Lac}} \text{ 或 } q_{\text{Amm}} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt};$$

$$Y_{\text{Lac/Glu}} = -\frac{dP}{dS};$$

$$Y_{\text{cell/Glu}} \text{ 或 } Y_{\text{cell/Gln}} = -\frac{dX}{dS}。$$

式中: X 为活细胞密度($\times 10^5$ cells/mL), S 为葡萄糖、谷氨酰胺的浓度(mmol/L), P 为乳酸、氨的浓度(mmol/L), t 为时间(d)。

PRRSV 增殖滴度测定,含 10% 血清正常培养的 Marc-145 细胞在 96 孔板上长至单层时,接入连续 10 倍稀释的病病毒样品,每个稀释度接入 8 个孔,每孔 200 μ L。逐日观察接毒后细胞与空白对照细胞形态,连续观察 3 d,记录细胞病变孔数。按 Reed-Muench 方法计算病毒滴度,结果以 lg TCID₅₀/mL 表示。

试验结果用 Origin 8.0 软件进行数据分析,统计计算及绘图。

2 结果与分析

2.1 Marc-145 细胞微载体悬浮培养的分批换液式操作

一次性将细胞和微载体投入反应器进行悬浮培养是一种常用的简单培养方式,增加微载体的用量即可增加细胞生长表面,进而收获更多的细胞,但试验结果表明,采用相同的初始细胞密度 3.0×10^5 cells/mL 进行 Marc-145 细胞接种培养,微载体的浓度直接影响最终的培养效果(图 1)。3 g/L 的微载体用量可获得较好的细胞生长效果,培养 3 d 通过换液操作使得 Marc-145 细胞在培养 6 d 获得最大活细胞密度 23.8×10^5 cells/mL。而 9 g/L 的微载体用量条件下细胞不能正常生长,虽然其提供了最大的细胞生长表面,但 3.0×10^5 cells/mL 的初始接种密度过低,分配在每个微载体上的初始细胞个数太少,细胞生长的延迟期维持了 3 d 之久,虽然在培养 3、6 d 进行了 2 次换液操作,细胞仍然生长缓慢。此外 9 g/L 的微载体浓度使得细胞培养液的流动性变差,气体及热量的传递无法按照牛顿流体的线性控制完成,影响了最终的培养效果,同时也说明该生物反应器的最大混合能力不能支持动物细胞在 9 g/L 的微载体使用浓度上进行生长。通过 2 次换液操作,6 g/L 微载体在 3.0×10^5 cells/mL 的初始接种密度下,可以达到 27.2×10^5 cells/mL 的最大活细胞密度;但通过显微镜观察,微载体表面依然有较多的空隙,并没有达到细胞生长的最大效能,这可能就是分批换液式培养工艺的局限性。

2.2 Marc-145 细胞微载体悬浮培养的消化传代放大式操作

Marc-145 细胞分别在 2 g/L 和 3 g/L 的微载体浓度下

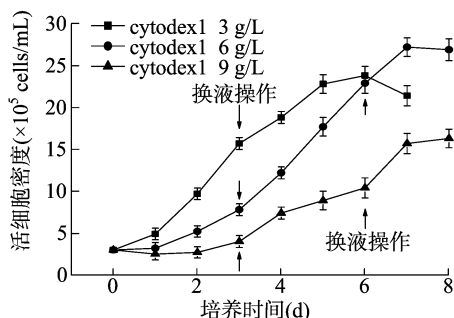


图1 Marc-145细胞在不同浓度的微载体上生长情况的比较

进行初始培养,分别在培养后3、4 d通过胰酶消化作用,使得细胞从微载体上脱落,形成细胞与微载体的混悬液。该混合物再重新接种于16 g和12 g新微载体中,培养体积均为4 L,进行消化传代后放大再培养,结果如图2所示。该试验的实际目的就是利用消化传代的方式将 Marc-145 细胞最终接种在6 g/L的微载体用量上进行培养(便于在整个研究中作比较),放大比例分别为1:3和1:2。结果表明,Marc-145 细胞在经过消化操作后,细胞活力有不同程度的损伤,活细胞密度降低,直接影响了细胞的重新爬球,使得细胞重新爬球后再生长的延迟期时间延长,最终最大活细胞密度在2个放大比例组别中没有明显差异,在 28×10^5 cells/mL左右。该试验说明,利用胰酶消化可以进行微载体培养的传代放大,但其消化工艺需要进行优化,尽量避免细胞经消化后的活力损伤,影响放大再爬球生长的效果。

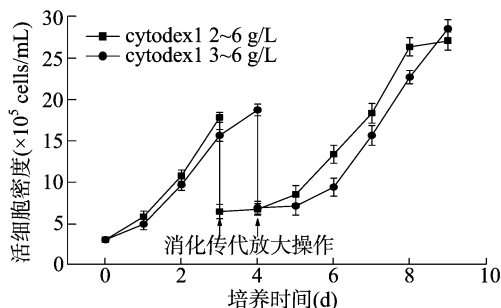


图2 不同放大比例下Marc-145细胞微载体培养的生长情况比较

2.3 Marc-145 细胞微载体悬浮培养的循环灌注式操作

利用循环灌注的培养方式进行 Marc-145 细胞微载体悬浮培养,结果如图3所示。根据前面试验的结果,适度提高初始接种细胞密度达到 3.5×10^5 cells/mL,微载体用量为6 g/L(便于在整个研究中作比较),同时在培养1 d后开始进行连续循环灌注操作,灌注速率为0.5个培养体积/d,随着培养时间的延长,灌注速率逐步在培养2~4 d提高到1.0~1.5个培养体积/d,在培养4~7 d提高到1.5~3.0个培养体积/d。通过这种方式,Marc-145 细胞获得比较好的培养效果,细胞进入快速生长的时间缩短,培养过程中没有频繁的罐上操作,利用变速蠕动泵将培养上清进行连续的密闭循环流动,为细胞提供相对较好的生长环境,培养6~7 d活细胞密度达到 59.4×10^5 cells/mL,观察微载体生长表面基本都被细胞所覆盖,细胞层生长致密并维持较高的存活率。

2.4 3种培养方式条件下 Marc-145 细胞在微载体上生长、生理代谢的比较

3种培养方式对 Marc-145 细胞微载体悬浮培养的生

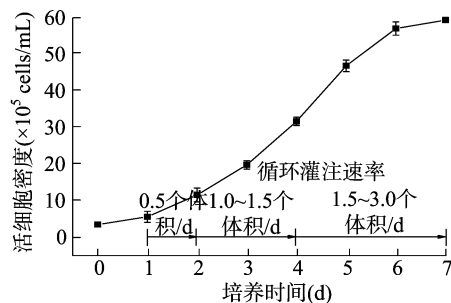


图3 循环灌注式操作对Marc-145细胞微载体悬浮培养的影响

长、生理代谢产生不同结果(表1)。细胞在微载体上展开生长的延迟期长短与初始接种密度和微载体用量的比例有关, 3.0×10^5 cells/mL的初始细胞密度对于3 g/L的微载体用量来说是比较适合的,表现为大致13 h的延迟期,提高微载体用量会造成延迟期的延长。如果适当提高初始细胞密度到 3.5×10^5 cells/mL,在6 g/L微载体用量下也可获得较快的初始生长。

循环灌注培养的 Marc-145 细胞平均倍增时间明显小于其他2种培养方式,大致为13 h。同时培养周期也仅为最少的6~7 d,即可获得最大的细胞密度 59.4×10^5 cells/mL,平均比生长速率 0.479 d^{-1} ,高于其他组别。

随着培养时间的延长,考察培养液渗透压的变化,结果表明,在经过较长时间的利用,虽然营养成分还没有利用完,换液前或传代前的培养液渗透压已经达到或接近400 mOsm/kg,这样的渗透压对细胞生长极为有害,这可能是分批换液培养和消化传代放大培养不能获得高密度培养的原因之一。而直到循环灌注培养结束,培养液的渗透压才达到391.5 mOsm/kg,因为利用循环灌注及时稀释了细胞代谢出的副产物(乳酸和氨),同时也减少了培养过程中为了维持培养pH值而进行的补碱用量(NaHCO_3),为细胞生长提供了相对较好的培养环境。

循环灌注培养为 Marc-145 细胞微载体悬浮生长提供了较好的培养环境,使得细胞生长代谢较为旺盛。测定各组别细胞的营养物质和代谢副产物浓度,发现循环灌注培养的 Marc-145 细胞对葡萄糖和谷氨酰胺的利用率高于其他组别,表现为葡萄糖比消耗速率为 $2.065 \text{ mmol}/(10^9 \text{ cells} \cdot \text{d})$,谷氨酰胺比消耗速率为 $0.174 \text{ mmol}/(10^9 \text{ cells} \cdot \text{d})$,均高于其他组别,同时乳酸对葡萄糖的得率系数为 $1.228 \text{ mmol}/\text{mmol}$,低于其他组别,说明 Marc-145 细胞在循环灌注培养过程中能够充分利用营养物质,同时其代谢副产物乳酸的生成较少,葡萄糖代谢途径部分减弱了乳酸生成的通量,而转向用于生理代谢和细胞生物量的增加,进而表现为细胞对葡萄糖和谷氨酰胺的得率系数提高,分别达到 $0.081 \times 10^9 \text{ cells}/\text{mmol}$ 和 $0.958 \times 10^9 \text{ cells}/\text{mmol}$,均高于其他组别。

2.5 Marc-145 细胞微载体一级、二级悬浮培养及 PRRSV 接毒增殖全过程

根据上述研究结果,设计出 Marc-145 细胞微载体悬浮培养、消化传代放大、PRRSV 接毒增殖的全过程:(1) Marc-145 细胞冻存细胞复苏之后,经2~3代的滚瓶扩增,接种至5 L动物细胞反应器,提高微载体的用量为6 g/L,采用循环灌注的培养方式进行一级培养,在短时间内获得高密度的 Marc-145 细

表 1 3 种培养方式条件下 Marc-145 细胞在微载体上生长、生理代谢的比较

项目	Marc-145 细胞不同培养模式				
	分批换液培养		消化传代放大培养		循环灌注培养
	3 g/L	6 g/L	2~6 g/L	3~6 g/L	6 g/L
延迟期持续时间(h)	13	18	22(消化后)	22(消化后)	16
平均倍增时间(h)	18	21	21	20	13
接种细胞密度(×10 ⁵ cells/mL)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.5
最大细胞密度(×10 ⁵ cells/mL)	23.8±1.2	27.2±1.1	27.2±1.1	28.7±1.2	59.4±1.8
细胞平均比生长速率(d ⁻¹)	0.346±0.014	0.312±0.011	0.271±0.012	0.284±0.009	0.479±0.008
培养周期(d)	6~7	7~8	8~9	8~9	6~7
培养液总量(L)	8	12	12	12	16
渗透压(mOsm/kg)	换液前或传代前		413.8	387.3	390.1
	培养结束		400.7	409.4	401.1
葡萄糖比消耗速率[mmol/(10 ⁹ cells·d)]	1.791±0.002	1.885±0.006	1.872±0.005	1.891±0.007	2.065±0.005
谷氨酰胺比消耗速率[mmol/(10 ⁹ cells·d)]	0.157±0.000 5	0.143±0.000 5	0.142±0.000 6	0.159±0.000 5	0.174±0.000 6
乳酸比生成速率[mmol/(10 ⁹ cells·d)]	2.474±0.004	2.628±0.003	2.580±0.005	2.619±0.009	2.536±0.004
氨比生成速率[mmol/(10 ⁹ cells·d)]	0.116±0.002	0.115±0.001	0.105±0.001	0.118±0.003	0.078±0.001
乳酸对葡萄糖的得率系数(mmol/mmol)	1.381±0.002	1.394±0.003	1.378±0.002	1.385±0.002	1.228±0.001
细胞对葡萄糖的得率系数(×10 ⁹ cells/mmol)	0.079±0.001	0.076±0.002	0.067±0.002	0.066±0.004	0.081±0.003
细胞对谷氨酰胺的得率系数(×10 ⁹ cells/mmol)	0.909±0.001	0.874±0.002	0.880±0.002	0.789±0.002	0.958±0.003

胞种子细胞,达到 50×10⁵ cells/mL,并保持较高的细胞存活率。(2)采用消化传代操作工艺,使得种子细胞从旧微载体上脱落、分散,直接接入 60 L 动物细胞反应器中,与新微载体及新鲜培养液混合均匀,完成消化放大过程。整个消化及转移放大过程在 30 min 内完成。(3)在 60 L 动物细胞反应器中,微载体用量为 3 g/L,培养体积为 45~50 L,采用分批式培养方式,根据细胞实际生长情况,适度更换培养液可完成 Marc-145 细胞的 60 L 反应器二级微载体悬浮培养过程,细胞密度达到 25×10⁵~30×10⁵ cells/mL 即可进行 PRRSV 接种操作。以 MOI=0.05 进行 PRRSV 接种,完成 PRRSV 的增殖过程,在接种后 2 d 收毒,获得最大增殖毒价为 10^{8.3} TCID₅₀/mL(图 4)。整个 5 L→60 L Marc-145 细胞放大培养及 PRRS 病毒增殖过程控制在 12 d 左右,生产周期较短,操作简单。接种前和接种后细胞在微载体上生长形态如图 5 所示。

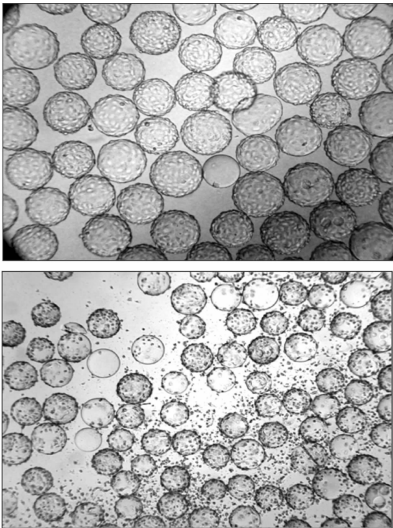


图 5 60 L 生物反应器中 Marc-145 细胞接种前(上)和接种后(下)在微载体上的形态

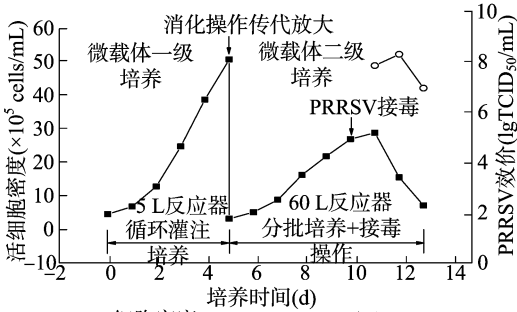


图 4 Marc-145 细胞微载体一级培养、二级培养及 PRRSV 接种增殖的生物过程

3 讨论

动物细胞进行微载体悬浮培养,其贴壁型生长特性没有改变,所以在分批式培养中提高微载体的用量,供应更大的细胞生长表面,即可获得更高的细胞密度。但对于类似 Marc-145 细胞这样对初始细胞密度有一定依赖性的细胞,过度提高微载体用量会造成细胞无法正常启动生长,使得细胞生长的延迟期大大延长,培养周期也随之延长,在培养后期无法获

得较好的培养效果。此外,每台搅拌式生物反应器的混合供氧效能是基本一定的,即在细胞能够忍受的最大搅拌和通气条件下,其搅拌混合微载体培养物的能力是一定的,盲目提高微载体的用量会使得培养环境中搅拌混合的效果变差,直接导致传氧、传质的效果变差,细胞无法正常生长。所以选用适宜的微载体用量及与之相匹配的细胞初始接种密度,可以获得较好的培养效果,同时也缩短培养周期。

消化传代放大培养方式模拟了工业生产中细胞培养放大再培养的过程,如何让细胞从旧微载体表面有效脱落,并保持再次“爬球生长”的能力,进一步在新微载体上黏附生长是微载体培养工程放大的难点^[10]。文献表明,利用“球到球”的传代方式,细胞不通过消化脱落,而是直接让细胞从旧微载体以“细胞桥”的方式向新微载体上转移^[11],虽然可以有部分细胞能够完成此种放大过程,但其放大效率不高,放大比率有限,一般是 1:1 或 1:2 进行放大^[12],同时也造成较高的“空球率”,培养效果不佳,浪费培养资源^[13]。采用胰酶消化的方

式,将细胞从微载体上消化下来后,再与新微载体混合重新黏附,可以使得传代后的细胞均匀黏附于新微载体表面,充分利用生长空间,可获得较好的培养效果。

循环灌注培养方式是传统灌注培养方式的一种优化方式^[14]。传统的灌注培养方式是指在新鲜培养液流入的同时,用过的培养液以相同的速度流出。该方式虽然可以获得不错的培养效果,但存在诸多弊端,如新鲜培养液的利用率不高,细胞在没有完全利用完培养液中营养成分时可能已经被抽离出反应器造成浪费;培养液预备量较大的同时,废液处理量也较大,通常在传统灌注培养周期内会造成 10~20 倍培养体积的液体处理量^[15]。而循环灌注方式完全克服了传统灌注方式的缺点,灌注量仅为培养体积的 3 倍,通过控制灌注液的灌注速率配合细胞的生长速率,供应充足的营养,并有效稀释代谢副产物的浓度,细胞的培养效果在本研究 3 种培养工艺中是最好的。

根据本研究中 3 种培养方式的特点及从 5 L 反应器至 60 L 反应器规模放大的实际应用结果,可以设计出如下工艺流程:(1) Marc-145 细胞的种子培养可以在小规模生物反应器(15~30 L)中进行高微载体用量的循环灌注培养,充分利用微载体的生长表面,在较短的时间内能够获得最多的种子细胞,为放大培养规模提供细胞准备。(2) 利用胰酶消化传代工艺进行种子细胞的传代放大,通过至少 1:3 的放大比例将种子接种于 60~120 L 动物细胞反应器中进行再培养。(3) 在传代放大后,控制 Marc-145 细胞的接种细胞密度,维持细胞与微载体之间合适的接触比例,采用分批换液的培养方式,简化反应罐上操作及所需设备,使得细胞均匀分布在微载体表面,迅速生长,达到接毒要求,进行病毒增殖。上述流程已在该疫苗生产企业得到实际应用,企业生产过程数据未标出。

综上所述,本研究比较了 3 种培养方式对 Marc-145 细胞微载体悬浮培养的实际效能,由此制定并实施可能的应用流程,为我国 PRRS 疫苗的规模化生产提供了研究基础。

参考文献:

- [1] Meulenberg J J. PRRSV, the virus[J]. Veterinary Research, 2000, 31(1): 11-21.
- [2] Cafruny W A, Duman R G, Wong G H, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection spreads by cell-to-cell transfer in cultured MARC-145 cells, is dependent on an intact

cytoskeleton, and is suppressed by drug-targeting of cell permissiveness to virus infection[J]. Virology Journal, 2006, 3(1): 1-17.

- [3] van Wezel A L. The large-scale cultivation of diploid cell strains in microcarrier culture. Improvement of microcarriers[J]. Developments in Biological Standardization, 1976, 37: 143-147.
- [4] Hacker D L, De Jesus M, Wurm F M. 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells - where do we go from here? [J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(6): 1023-1027.
- [5] Wurm F M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(11): 1393-1398.
- [6] Rourou S, van der Ark A, Majoul S, et al. A novel animal-component-free medium for rabies virus production in Vero cells grown on Cytodex 1 microcarriers in a stirred bioreactor [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 85(1): 53-63.
- [7] 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.
- [8] Souza M C, Freire M S, Schulze E A, et al. Production of yellow fever virus in microcarrier-based Vero cell cultures[J]. Vaccine, 2009, 27(46): 6420-6423.
- [9] 冯磊, 褚轩, 吴培培, 等. Marc-145 细胞微载体悬浮培养及 PRRSV 增殖工艺的建立[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(3): 598-603.
- [10] Bock A, Sann H, Schulze-Horsel J, et al. Growth behavior of number distributed adherent MDCK cells for optimization in microcarrier cultures[J]. Biotechnology Progress, 2009, 25(6): 1717-1731.
- [11] Wang Y, Ouyang F. Bead-to-bead transfer of Vero cells in microcarrier culture[J]. Cytotechnology, 1999, 31(3): 221-224.
- [12] Xiao C, Huang Z, Li W, et al. High density and scale-up cultivation of recombinant CHO cell line and hybridomas with porous microcarrier Cytopen[J]. Cytotechnology, 1999, 30(1/2/3): 143-147.
- [13] Ohlson S, Branscomb J, Nilsson K. Bead-to-bead transfer of Chinese hamster ovary cells using macroporous microcarriers[J]. Cytotechnology, 1994, 14(1): 67-80.
- [14] Rourou S, van der Ark A, van der Velden T, et al. A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions [J]. Vaccine, 2007, 25(19): 3879-3889.
- [15] Trabelsi K, Rourou S, Loukil H, et al. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 121(2): 261-271.

(上接第 223 页)

参考文献:

- [1] 卿平勇, 弓弼, 赵政阳. 我国观光果园的发展现状、存在问题与对策[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(2): 188-192.
- [2] 王志良, 胡岱. 关于观光休闲农业的思考和建设[J]. 农村经济, 1998(3): 7-8, 11.
- [3] 姚允聪, 付占芳, 李雄, 等. 观光果树的建设: 理论、实践与鉴赏[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [4] 曹艳英, 马润花, 徐民英. 论我国观光农业存在的问题与发展方向[J]. 福建地理, 2004, 19(3): 21-24.
- [5] 沈向, 毛志泉. 观赏果树的兴起与发展[J]. 落叶果树, 2005,

37(2): 58-59.

- [6] 吴晓华. 关于发展观光果园的几点探讨[J]. 福建果树, 2004(3): 41-42.
- [7] 付占芳, 张瑞. 京郊果树产业发展建设的思考[J]. 绿化与生活, 2004(5): 4-5.
- [8] 张瑞, 付占芳. 观光果园建设情况及发展设想[J]. 绿化与生活, 2003(5): 12-13.
- [9] 王浩, 程红波, 谷康, 等. 农业观光园规划与经营[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.
- [10] 章镇, 房经贵, 乔玉山, 等. 论观光果园的建设与发展[J]. 果农之友, 2001, 1(3): 3-5.
- [11] 刘静波, 李卫东, 陈鹏, 等. 观赏果树发展历史及研究进展[J]. 湖南农业科学, 2015(5): 149-151.