

# 利用生物反应器和 Vero 细胞培养鸡传染性 法氏囊病病毒的研究

石 岗, 王宏俊, 孙惠玲

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100089)

摘要:通过对血清、pH、接毒量和收毒时间等培养条件的优化,确定鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)在 Vero 细胞上增殖的最佳培养条件为:血清 2%, pH 7.0, 接毒量 5:10 000, 收毒时间为接毒后培养 108 h。250 ml 自制搅拌瓶和 5 L 搅拌式生物反应器研究结果表明,在 2 g/L 微载体的 Vero 细胞悬浮培养系统中,待细胞刚长满微载体时,按照确定的 IBDV 最佳增殖条件换液培养,病毒可在较长一段时间维持高的病毒滴度,最高滴度分别可达 8.875 和 8.58 (-lgTCID<sub>50</sub>),比传统转瓶生产方法至少提高 1 个毒价,可用于 IBDV 规模化生产。

关键词:传染性法氏囊病病毒(IBDV);生物反应器;Vero 细胞;滴度;规模化生产

## Study on Propagation of Chicken Infectious Bursal Disease Virus on Vero Cells Using Microcarriers in Fermentor

SHI Gang, WANG Hong-jun, SUN Hui-ling

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Beijing Academy of  
Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089)

Abstract: In flask optimization tests it was proved that 2% serum, pH 7.0, 5:10 000 inoculation concentration of infectious bursal disease virus (IBDV) and 108 h cultivation for IBDV harvesting after its inoculation were the optimal conditions when IBDV was propagated on Vero cells. The results in 250 ml self-made spinner bottle and 5 L stirred fermentor tests indicated that IBDV could maintain higher titers for a long time and the highest titers of IBDV in spinner bottle and fermentor were 8.875 and 8.58 (-lgTCID<sub>50</sub>) respectively when IBDV was proliferated on Vero cells using 2 g/L microcarriers in spinner bottle and fermentor and was cultivated on the optimum conditions of flask tests after Vero cells had developed a monolayer on microcarriers, which were at least one titer higher than that in the traditional roller bottle. All these results suggest that this technology can be applied to large scale production of IBDV.

Key words: Infectious bursal disease virus (IBDV); Fermentor; Vero cell; Titer; Large scale production

传染性法氏囊病病毒(infectious bursal disease virus, IBDV)是双 RNA 病毒科(Birnaviridae)禽双 RNA 病毒属(*Avibirnavirus*)的代表成员<sup>[1]</sup>,主要引起鸡和火鸡的一种急性、高度接触性传染病。该病主要侵害 3~12 周龄的雏鸡和青年鸡,破坏中枢免疫系统法氏囊中的 B 淋巴细胞,导致免疫抑制,给

养鸡业造成严重危害<sup>[2]</sup>。目前,有关鸡传染性法氏囊病(IBD)疫苗的生产主要是通过鸡胚和鸡胚成纤维细胞(CEF)转瓶培养。自从 1967 年 Wezel<sup>[3]</sup>用 DEAE-Sephadex A-50 作载体成功实现兔原代细胞、人二倍体细胞等的悬浮培养以来,世界各国都把注意力集中到细胞的微载体培养研究方面。在生物反

收稿日期:2001-12-17

基金项目:北京市科技合同资助项目(951502300)

作者简介:石 岗(1963-),男,内蒙古呼和浩特人,助研,博士研究生,主要从事兽医微生物和生物活性肽研究。Tel:010-51503475; Fax:010-88450010; E-mail:gangshii@sohu.com

反应器中,利用 Vero 细胞微载体系统已成功培养了脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、乙型脑炎病毒和牛呼吸道合胞体病毒<sup>[4-7]</sup>等。张立等<sup>[8]</sup>在 1.5L 生物反应器中,利用 CEF 微载体培养技术已成功培养 IBDV,病毒滴度最高为 7.50。目前,WHO 已批准用 Vero 细胞培养病毒生产疫苗。为了改变传统生产方式,简化生产,降低疫苗的生产成本,笔者进行了 IBDV 的 Vero 细胞微载体生物反应器培养技术研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 种毒 BJ836(本所保存)经鸡胚壮 8 代,在 Vero 细胞连传 2 代获得,毒价 7.75(-lgTCID<sub>50</sub>)。

1.1.2 Vero 细胞 由中国科学院化工冶金研究所提供,试验用为 Vero 细胞 160~170 代。

1.1.3 培养基 Medium 199(Gibco),除特别指明外,细胞培养液为 Medium 199 加 6%小牛血清,维持液为 Medium 199 加 2%小牛血清,pH 7.0~7.2。

1.1.4 SPF 种蛋 购于中国兽药监察所。

1.1.5 CEF 细胞悬液 取 9~11 日龄 SPF 鸡胚按常规程序制备。

1.1.6 小牛血清 杭州市四季青生物工程材料研究所,批号 920922。

### 1.2 病毒滴定

用 96 孔平底微量细胞培养板,每孔加入 0.1 ml 细胞数为 100 万~120 万/ml 的 CEF 细胞悬液,培养液为 Earle 氏盐液,内含 0.5%水解乳蛋白,2%血清,1%青链双抗,pH 7.2。将待测病毒样品用含 0.5%水解乳蛋白的 Earle 氏盐液以 10 倍递增稀释,每个稀释度接种 4 孔,每孔 0.1 ml 病毒。测定时病毒与细胞同时加入,用涤纶胶带封好培养板后轻轻振动 2 min,置 37℃培养 4~5 d,观察结果,根据 Behrens - Kaber 法<sup>[9]</sup>计算,以半数细胞感染量(TCID<sub>50</sub>)表示。

### 1.3 血清对 IBDV 在 Vero 细胞上增殖的影响试验

取 100 ml 细胞培养瓶 12 个,分为 4 组,1:3 传代(待 1 瓶细胞长满后,用胰酶消化下来后传成 3 瓶细胞)。待细胞长满后,1 2 3 4 组分别加入 0、2%、6%和 8%小牛血清的 M199 培养液,每瓶 13 ml,按毒液与培养液体积比 5:1 000 接毒量接种,37℃培养,定时将每组的 3 个培养瓶的毒液取出,混匀,取样 2×0.4 ml,再将取样后剩余毒液均分到该组 3 个培养瓶中,继续培养,如此反复取毒,测定毒价。

### 1.4 pH 对 IBDV 在 Vero 细胞上增殖的影响试验

取 100 ml 细胞培养瓶 9 个,分为 3 组。方法同血清试验,pH 为每天上午、下午各调 1 次。

### 1.5 不同接毒量和收毒时间对 IBDV 增殖的影响试验

取 500 ml 大柯氏瓶 6 个,分为 3 组,1:3 传代,待细胞长满后加 2%血清维持液 50 ml。1 2 3 组分别按毒液培养液体积比 5:1 000、1:1 000 和 5:10 000 接毒,定时将每组 2 培养瓶的毒液取出,混匀,取样 2×0.4 ml,再将取样后剩余毒液均分到该组 2 个培养瓶中,继续培养,如此反复取毒,测定毒价。

### 1.6 微载体及其处理

Cytodex-3 购于 Sigma Chemical Co.。使用时将干微载体加入经二甲基二氯硅烷(Sigma Chemical Co.)硅化的容器中,用 PBS 溶液在室温下充分浸泡,弃去上清,用 PBS 溶液洗涤 2 次,更换新的 PBS,在 115℃下灭菌 20 min,吸去上清,用含 6%血清的培养基洗涤 1 次,更换新培养基,置培养箱中平衡过夜。

### 1.7 搅拌瓶和生物反应器细胞培养

在自制的经硅化处理的 250 ml 搅拌瓶或 5L 搅拌式生物反应器中,按 2g/L 加入经处理的微载体,接入 Vero 细胞,补足培养基至所需体积,37℃培养。在开始 3h 内,采用 60r/min 搅拌 5 min、静止 25 min 的间歇搅拌方式进行培养;然后将搅拌速率保持在 80r/min 进行培养,定时取样、计数。

### 1.8 搅拌瓶和生物反应器病毒培养

待 Vero 细胞在 250 ml 搅拌瓶或 5L 搅拌式反应器中微载体上均匀长满后,停止搅拌,使微载体沉降,抽去上清,补足维持液,接种病毒,37℃培养,定时取样,滴定病毒。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒培养条件的优化

2.1.1 血清浓度对 IBDV 增殖的影响 从图 1 结果可以看出,血清浓度对病毒增殖影响很大。血清浓度为 2%对病毒增殖最快,滴度最高,且到达最高值的时间最早;不加血清病毒滴度的最高值与加 2%血清时的值相同但到达最高值的时间延迟;血清浓度为 6%和 8%时,病毒的滴度下降,到达最高值的时间延迟,病毒的增殖明显受到血清的抑制。从本试验看,2%血清浓度生产病毒最为合适。

2.1.2 pH 对 IBDV 增殖的影响 从图 2 结果可以看出,偏碱性环境对病毒增殖不利,在 pH7.6 时,病毒增殖很慢,且病毒滴度不高,最高值为 7.0;中性

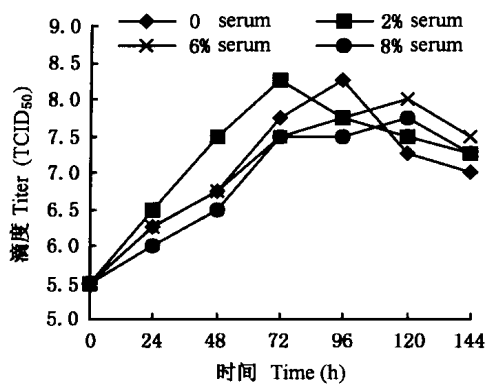


图 1 血清浓度对 IBDV 增殖的影响

Fig.1 Effect of serum concentration on propagation of IBDV

pH 对病毒增殖最为有利,在 pH7.0 时病毒增殖速度快,出现高滴度的时间较早(48h 开始)且达到最高滴度 8.0;酸性条件和碱性条件相比,在偏酸性环境中病毒增殖较偏碱性环境中好,在 pH6.6 时病毒的最高滴度为 7.75,要比 pH7.6 时值高,但与 pH7.0 相比最高滴度值要低一些。综上所述,在法氏囊病毒的增殖阶段,pH 控制在 7.0 为宜。

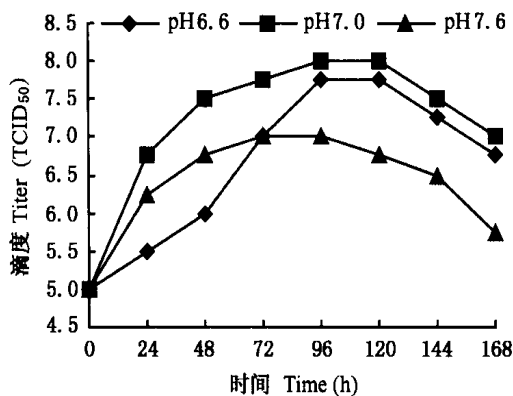


图 2 pH 对 IBDV 增殖的影响

Fig.2 Effect of pH on propagation of IBDV

**2.1.3 不同接毒量和收毒时间对 IBDV 增殖的影响** 由图 3 结果可以看出,病毒的接毒量和收获时间对病毒的增殖滴度影响较大。在一定的范围内,病毒的接毒量减少,病毒的最高增殖滴度增加,但到达最高滴度的时间推迟。在本试验中,IBDV 的接毒量以 5:10 000 接毒,以接毒后培养 108h 收获病毒毒价最高,为 8.25。

综上所述,IBDV 的最佳增殖条件为:pH7.0,血清浓度 2%,接毒量 5:10 000,收毒时间为接种病毒后培养 108h。

**2.2 病毒在微载体 250ml 搅拌瓶培养系统中的增殖**

**2.2.1 Vero 细胞在搅拌瓶系统的生长曲线** 由图

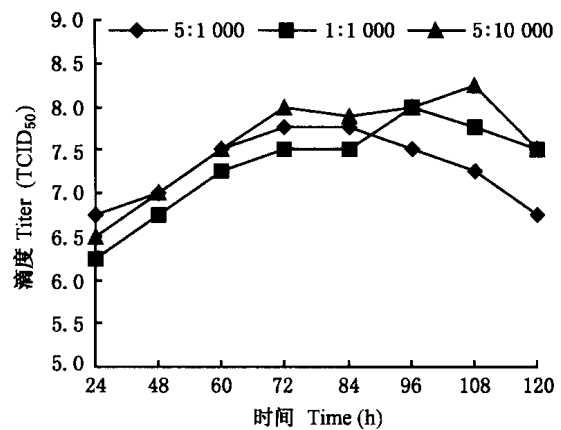


图 3 接毒量和收毒时间对 IBDV 增殖的影响

Fig.3 Effect of inoculation concentration and harvest time on propagation of IBDV

4 可知,在 250 ml 搅拌瓶中,Vero 细胞接种密度为  $2.4 \times 10^5$  cells/ml 时,Vero 细胞在微载体上生长初期比较缓慢,48h 后开始迅速扩展,144h 到达最高值  $1.28 \times 10^6$  cells/ml,随后基本维持在这一水平,此时细胞在微载体上已经长满,细胞进入对数生长后期,接种病毒有利于病毒的增殖。

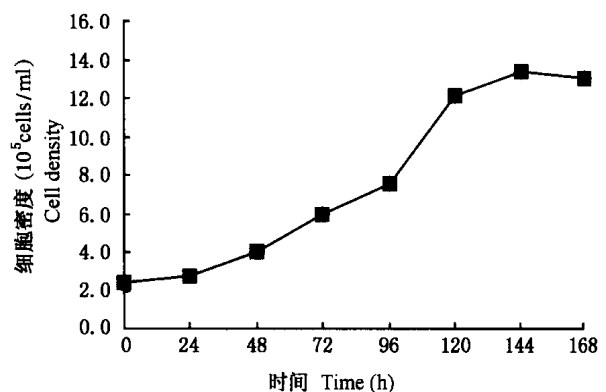


图 4 Vero 细胞在搅拌瓶中的生长

Fig.4 Growth of Vero cells on microcarriers in spinner bottle

**2.2.2 IBDV 在搅拌瓶系统的增殖** 按照病毒培养条件优化所确定的最佳 IBDV 增殖条件,利用 250 ml 搅拌瓶进行了 IBDV 在 Vero 细胞微载体系统的增殖研究,图 5 为 IBDV 在微载体搅拌瓶悬浮培养系统的增殖过程曲线。由图 5 可知,在搅拌瓶中,待 Vero 细胞生长到对数后期,以 5:10 000 接毒,2%血清维持,pH 7.0 培养,IBDV 的增殖滴度在 60~120h 之间都较高,毒价一直维持在 7.875 以上,其中以 108h 毒价最高,滴度达 8.875。该试验表明:在微载体 250 ml 搅拌瓶悬浮培养系统中,IBDV 在 Vero 细胞上可较快增殖到高的滴度水平,并在较长一段时间内维持这一高滴度水平。

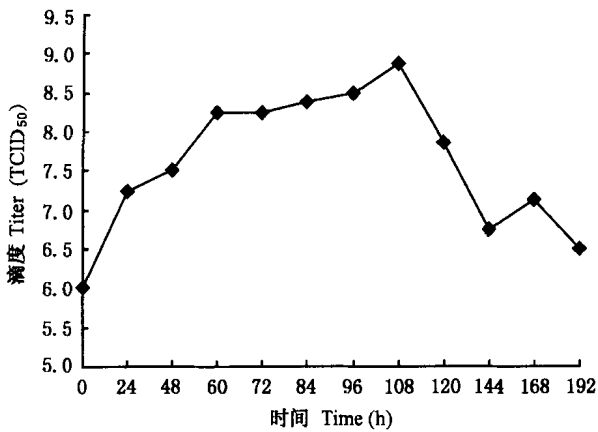


图 5 IBDV 在搅拌瓶中的增殖

Fig.5 Propagation of IBDV on Vero cells in spinner bottle after inoculation

### 2.3 病毒在微载体 5L 搅拌式生物反应器培养系统中的增殖

**2.3.1 Vero 细胞在微载体生物反应器系统的生长曲线** 由图 6 可知,在 5L 搅拌式生物反应器中, Vero 细胞接种密度为  $2.8 \times 10^5$  cells/ml 时, Vero 细胞在微载体上生长在 24h 前比较缓慢,24h 后开始迅速扩展,144h 到达最高值  $1.34 \times 10^6$  cells/ml,随后基本维持在这一水平,此时细胞在微载体上已经长满,细胞进入对数生长后期。

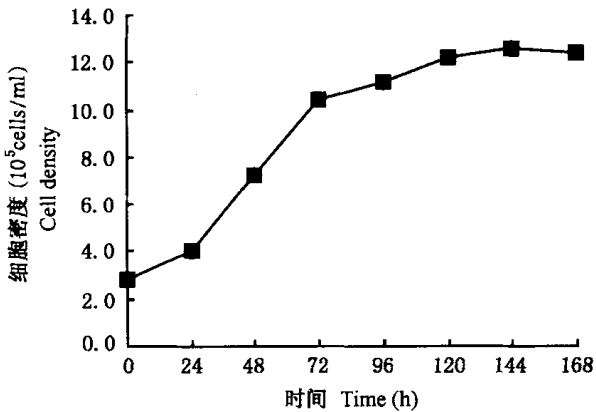


图 6 Vero 细胞在 5L 生物反应器中的生长

Fig.6 Growth of Vero cells on microcarries in 5L fermentor

### 2.3.2 IBDV 在 5L 搅拌式生物反应器系统的增殖

按照培养条件优化及搅拌瓶培养确定的 IBDV 最佳增殖条件,在 5L 搅拌式生物反应器中,待 Vero 细胞在微载体上生长到对数后期,以 5:10 000 接毒,2%血清维持,pH7.0 培养,由图 7 可知,在 5L 搅拌式生物反应器悬浮培养过程中,IBDV 的滴度在 48~192h 之间都较高,毒价一直维持在 8.0 以上,其中以 72h 毒价最高,滴度达 8.58,比我们利用

BJ836 和传统转瓶培养系统生产 IBDV 的最高滴度 (7.50) 高 1.08 个滴度,表明该技术可用于 IBDV 大规模生产。

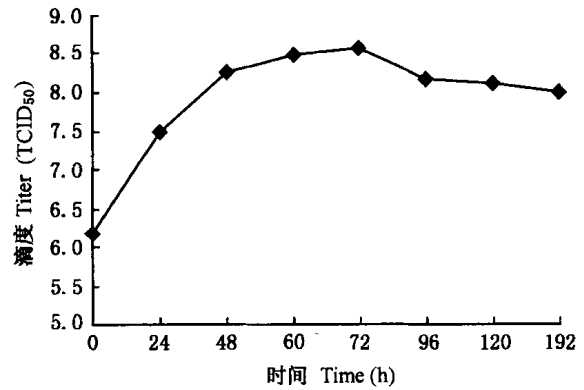


图 7 IBDV 在 5L 生物反应器中的增殖

Fig.7 Propagation of IBDV on Vero cells in 5L fermentor after inoculation

## 3 讨论

有关血清浓度对 IBDV 在细胞上增殖的影响,于大海等人报道,小牛血清对 IBDV 的增殖有抑制作用<sup>[10]</sup>。他们用 CEF 证明血清中含有抑制因子,这些抑制因子附着于 CEF 表面,占据了细胞的病毒受体,阻止了病毒附着于细胞,从而抑制了病毒的增殖,这一结果与笔者的培养条件优化结果一致。在 Vero 细胞上,血清浓度为 2% 对 IBDV 增殖最快,滴度最高,且到达最高值的时间最早;不加血清病毒滴度的最高值与加 2% 血清时的值相同,但到达最高值的时间延迟;血清浓度高达 6% 和 8% 时,病毒的滴度下降,到达最高值的时间延迟,病毒的增殖明显受到血清的抑制。因此,在病毒生产中应降低血清浓度,这一方面可降低血清对病毒增殖的抑制作用,提高病毒的产量;另一方面又可以避免细胞快速老化,降低病毒收获液中杂蛋白的含量,提高疫苗的质量,同时还可以降低生产成本。

有关 IBDV 的生物反应器培养,张立等人报道,在 1.5L CelliGen 生物反应器中成功培养 CEF,使 IBDV 的滴度达到 7.50 (-lgTCID<sub>50</sub>),比转瓶培养提高 1 个数量级<sup>[8]</sup>。我们利用微载体 Vero 细胞培养系统,在 5L 生物反应器中,使 IBDV 的最高滴度达 8.58 (-lgTCID<sub>50</sub>),比传统的转瓶生产和 CEF 生物反应器培养系统都高 1.08 个滴度,说明该系统优于转瓶生产和 CEF 生物反应器培养系统,适用于 IBDV 的大规模生产。

目前,限制利用生物反应器 Vero 细胞系统生产

IBDV的主要因素是微载体和血清的成本高。在研究过程中发现,细胞不脱落,病毒较长时间维持一个较高滴度水平,这就为以后连续收毒培养提供了可能。通过连续收毒培养,1次培养可以收获1罐以上的毒液,这样就可以大大降低生产成本,使IBDV的规模化生产更加可行。

## References

- [ 1 ] Yin Z, Liu J H. *Animal Virology* (2nd Edition). Beijing: Science and Technology Press, 1997:578 - 587. (in Chinese)  
殷震,刘景华. 动物病毒学(第2版). 北京:科学出版社, 1997:578 - 587.
- [ 2 ] Lukert P D, Saif Y M. *Diseases of Poultry*. 10th ed. Iowa: Iowa State University Press, 1997:721 - 738.
- [ 3 ] Van Wezel. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers. *Nature*, 1967,216:64 - 65.
- [ 4 ] Merten O W, Wu R, Couve E, Crainic R. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors. *Cytotechnology*, 1997,25:35 - 44.
- [ 5 ] Wang D L, Xiao C Z, Chen Z L, Huang Z C. Studies on high density cultivation of Vero cells with microcarriers. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1996,12(2):164 - 170. (in Chinese)  
王佃亮,肖成祖,陈昭烈,黄子才. 微载体高密度培养 Vero 细胞的研究. 生物工程学报, 1996,12(2):164 - 170.
- [ 6 ] Zeng R F, Song J L, Gu M, Chen W L, Shao Y B. Study on Vero cell rabies vaccine. *Virologica Sinica*, 1997,12(1):43 - 49. (in Chinese)  
曾蓉芳,宋家骊,顾鸣,陈文兰,邵益斌. Vero 细胞狂犬疫苗的研制. 中国病毒学, 1997,12(1):43 - 49.
- [ 7 ] Enda Moran. A microcarrier-based cell culture process for the production of a bovine respiratory syncytial virus vaccine. *Cytotechnology*, 1999, 29:135 - 148.
- [ 8 ] Zhang L, Zhang Y X, Yan C, Yu J T. The culture of chicken embryo fibroblast cells on microcarriers to produce infectious bursal disease virus. *Journal of East China University of Science and Technology*, 1996,22(6):382 - 386. (in Chinese)  
张立,张元兴,严春,俞俊棠. 用微载体培养鸡胚细胞生产法氏囊病病毒. 华东理工大学学报, 1996,22(6):382 - 386.
- [ 9 ] Purchase H G, Arp L H, Domermuth C H, Person J E. *A Laboratory Manual for The Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 3rd. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1993:236 - 264. (in Chinese)  
Purchase H G, Arp L H, Domermuth C H, Person J E. 禽病原分离鉴定实验室手册. 第3版. 北京:北京农业大学出版社, 1993:236 - 264.
- [ 10 ] Yu D H, Chen G C, Wang X M. Mechanism of inhibitor activity of bovine serum on the growth of infectious bursal disease virus. *Chinese Journal of Virology*, 1988,4(1):33 - 37. (in Chinese)  
于大海,陈冠春,王笑梅. 小牛血清对鸡传染性法氏囊病病毒增殖的抑制机制. 病毒学报, 1988,4(1):33 - 37.