

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.11.06

大熊猫犬瘟热病毒(CDV-PA-1421株) 微载体悬浮培养工艺研究

刘静,李艳玲,朱明媛,谷孝玉,李润*

(唐山怡安生物工程有限公司,河北唐山 063020)

[收稿日期] 2020-07-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 11-0039-05 [中图分类号] S852.65

[摘要] 根据正交试验对大熊猫犬瘟热病毒(CDV-PA-1421株)在生物反应器中的培养工艺进行优化,确定关键技术参数。结果表明,大熊猫犬瘟热病毒悬浮培养最佳组合条件为:Vero细胞长成单层后,接种到生物反应器,细胞接种浓度为 $0.2 \times 10^6/\text{mL} \sim 0.4 \times 10^6/\text{mL}$,微载体浓度为 8.0 g/L ,加入MSVP培养基至工作体积。按 $0.01 \sim 0.1$ 感染复数(MOI)接种病毒,在 37°C pH7.2条件下培养 $96 \sim 120 \text{ h}$,细胞病变(CPE)达 $70\% \sim 80\%$ 时收获病毒上清液,即可获得高滴度病毒液。3批培养结果显示病毒培养工艺稳定,收获液病毒含量均在 $10^{7.0} \sim 10^{7.5} \text{ TCID}_{50}/0.1\text{mL}$ 之间。

[关键词] 大熊猫犬瘟热;微载体悬浮培养;生物反应器

Study on Giant Panda Canine Distemper Virus (CDV-PA-1421 Strain) Microcarrier Suspension Culture

LIU Jing, LI Yan-ling, ZHU Ming-yuan, GU Xiao-yu, LI Run*

(Tangshan Yian Biological Engineering Co. Ltd., Tangshan, Hebei 063020, China)

Corresponding author: LI Run, E-mail: lr@yian-bio.cn

Abstract: The orthogonal design was used to optimize the culture conditions of giant panda canine distemper virus (CDV-PA-1421 strain) in bioreactor, and key technical parameters were determined. Results showed that the best combined conditions for suspension culture of giant panda canine distemper virus were: Vero cells were grown into monolayers and inoculated to the bioreactor at a concentration of $0.2 \times 10^6/\text{mL} \sim 0.4 \times 10^6/\text{mL}$ and a microcarrier concentration of 8.0 g/L . MSVP culture medium was added to the working volume. The virus was inoculated at $0.01 \sim 0.1$ MOI and cultured at 37°C , pH 7.2 for $96 \sim 120$ hours. When the CPE was up to $70\% \sim 80\%$, the virus supernatant was harvested to obtain the high-titer virus venom. The results of three batches of culture showed that the virus culture process was stable, and the virus content in the harvest solution was in the range of $10^{7.0} \sim 10^{7.5} \text{ TCID}_{50}/0.1\text{mL}$.

Key words: giant panda canine distemper virus; microcarrier suspension culture; bioreactor

基金项目:国家重点研发计划子课题(2017YFD0501705)

作者简介:刘静,硕士,兽医师,从事兽用生物制品研发。

通讯作者:李润。E-mail: lr@yian-bio.cn

犬瘟热 (Canine distemper, CD) 是由犬瘟热病毒 (Canine distemper virus, CDV) 引起的一种急性、高度接触性传染病, 有较高发病率和病死率, 临床上以厌食、双相热、结膜炎、严重的胃肠炎和神经症状为典型特征。大熊猫是我国重点保护濒危珍稀野生动物, 随着犬瘟热感染宿主范围的日益扩大, 从 1983 年开始, 享有“活化石”之称的国宝大熊猫也相继有感染犬瘟热死亡报道。2014 年 12 月至 2015 年楼观台秦岭大熊猫繁育基地, 6 只被 CDV 感染的大熊猫中有 5 只死亡, 幸存的 1 只因早前接种过 CDV 疫苗, 体内存在 CDV 中和抗体, 未表现临床症状, 这表明中和抗体可以使大熊猫免受 CDV 强毒的致死性攻击^[1-2]。因此, 及时进行疫苗免疫是防控犬瘟热病的关键措施, 可提高大熊猫的抵抗力^[3-4]。

目前, 国内外用于大熊猫 CDV 免疫预防的疫苗主要有三类: (1) 弱毒疫苗。弱毒疫苗已在国内外普遍应用并取得了一定的效果, 但弱毒疫苗接种后保护效果较弱或安全性不足^[5]。(2) 基因工程疫苗。基因工程疫苗相对而言比较安全, 仅能在哺乳类动物机体发生复制, 不能产生感染^[6], 但免疫持续期短, 不能产生足够的记忆细胞维持长期免疫力^[7]。(3) 灭活疫苗。国内部分动物园使用该苗作为大熊猫的预防疫苗, 多年来未发现任何临床 CDV 病例, 也未出现疫苗源性的安全问题, 但目前还没有熊猫源性的犬瘟热灭活疫苗, 多联苗在疫病防控上效果欠佳, 因此, 研发大熊猫犬瘟热专用灭活疫苗迫在眉睫。本研究采用正交试验确定 Vero 细胞培养、MOI、pH 值、温度、收获时间等工艺参数, 建立大熊猫犬瘟热灭活疫苗 (CDV - PA - 1421 株) 的悬浮培养工艺, 制备高质量的大熊猫犬瘟热灭活疫苗。

1 材料和方法

1.1 试验材料 Vero 细胞, 批号 Vero - B0402 - 002, 130 代, 由唐山怡安生物工程有限公司制备并贮存。大熊猫犬瘟热病毒 (CDV - PA - 1421 株), 保

存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (保藏号: 18179)。MSVP 培养基购于上海源培生物科技股份有限公司, 胰蛋白酶购于 GIBCO, 新生牛血清购于兰州民海生物公司, 谷氨酰胺购于 Invitrogen, 微载体 Cytodex 1 购于 GE。生物反应器 (C - 10 - 2 CC 型) 购自德国 Sartorius。实验动物, 18 ~ 22 g 小鼠 10 只, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Vero 细胞微载体培养参数 采用正交试验, 选择细胞接种浓度、微载体浓度、细胞生长液 3 个影响细胞增殖的因素, 每个因素设置 3 个水平条件 (表 1)。通过选择的条件进行 Vero 细胞培养, 37 °C 培养 96 ~ 168 h 后进行计数, 根据最高细胞密度, 比较不同因素对细胞增殖的影响。

表 1 Vero 细胞微载体培养正交试验设计表

Tab 1 Orthogonal experiment design table of Vero cell microcarrier culture

水平 (条件)	因素		
	细胞接种浓度	微载体浓度	细胞生长液
1	$0.1 \times 10^6 \sim 0.2 \times 10^6$	6.0 g/L	MSVP
2	$0.2 \times 10^6 \sim 0.4 \times 10^6$	8.0 g/L	MSVP + 0.5% 牛血清
3	$0.4 \times 10^6 \sim 0.6 \times 10^6$	10.0 g/L	MSVP + 1% 牛血清

1.2.2 病毒培养条件 采用正交试验确定病毒培养条件, 选择不同 MOI、pH 值、温度、收获时间 4 个因素, 每个因素分别设置不同水平 (表 2)。根据最高病毒含量, 比较不同因素和水平对病毒增殖的影响。

表 2 大熊猫犬瘟热病毒正交试验设计表

Tab 2 Orthogonal experiment design table of giant panda canine distemper virus

水平	因素			
	MOI	pH 值	温度	收获时间
1	0.01	7.2	34.0 °C	72
2	0.03	7.4	37.0 °C	96
3	0.1	/	/	120
4	0.3	/	/	144

1.2.3 10L 反应器病毒培养工艺验证 根据确定培养条件,将长成单层的 Vero 细胞消化,接种到 10L 反应器中,加入细胞生长液至工作体积。待细胞长成单层后,接种大熊猫犬瘟热(CDV-PA-1421 株)毒种,在 37 ℃ pH7.2 条件下培养 96 ~ 120 h,观察细胞病变(CPE)。CPE 达到 70% ~ 80% 时收获上清液,按 Reed - Muench 法计算其半数细胞感染量(TCID₅₀),检测病毒含量。连续培养 3 批病毒,验证工艺的稳定性。

1.2.4 疫苗制备及检验 将收获液过滤去除细胞碎片后,经澄清、浓缩、灭活、配比、分装等工序,获得大熊猫犬瘟热病毒灭活疫苗(CDV-PA-1421 株),参照《中国兽药典》(2015 年版)进行性状、装量、无菌、pH 值、安全检验。

2 结果与分析

2.1 Vero 细胞微载体培养条件 对正交试验结果进行极差分析可知(表 3),影响细胞增殖的因素细胞接种浓度 > 微载体浓度 > 细胞生长液,优水平组合为 A2B2C3,即细胞接种浓度 0.2 × 10⁶ ~ 0.4 × 10⁶/mL、微载体浓度 8.0 g/L、细胞生长液 MSVP。方差分析结果显示(表 4),细胞接种浓度、微载体浓度对试验结果的影响高度显著,细胞生长液无显著影响。

表 3 Vero 细胞微载体培养极差分析

Tab 3 Range analysis of Vero cell microcarrier culture

试验号	细胞接种浓度 A	微载体浓度 B	细胞生长液 C	最高细胞 密度
1	1	1	1	394 × 10 ⁴
2	1	2	2	423 × 10 ⁴
3	1	3	3	432 × 10 ⁴
4	2	1	2	459 × 10 ⁴
5	2	2	3	482 × 10 ⁴
6	2	3	1	469 × 10 ⁴
7	3	1	3	457 × 10 ⁴
8	3	2	1	467 × 10 ⁴
9	3	3	2	469 × 10 ⁴
k1	416.333	436.667	443.333	/
k2	470.000	457.333	450.333	/
k3	464.333	456.667	457.000	/
极差 R	53.667	20.666	13.667	/

表 4 Vero 细胞微载体培养方差分析

Tab 4 Variance analysis of Vero cell microcarrier culture

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
细胞接种浓度	5216.222	2	176.486	19.000	<0.05
微载体浓度	827.556	2	28.000	19.000	<0.05
细胞生长液	280.222	2	9.481	19.000	>0.05

2.2 病毒培养条件 对正交试验结果进行极差分析可知(表 5),优水平组合为 A1B1C2D3,即 MOI 0.01、温度 37 ℃、pH 7.2、收获时间 96 ~ 120 h,影响病毒增殖的因素,收获时间 > MOI > 温度 > pH 值。方差分析结果显示(表 6),MOI、温度、收获时间对试验结果高度显著,pH 值无显著影响。

表 5 大熊猫犬瘟热病毒培养极差分析

Tab 5 Range analysis of giant panda canine distemper virus

试验号	MOI A	PH 值 B	温度 C	收获时间 D	病毒滴度 TCID ₅₀ /0.1ML
1	1	1	1	1	10 ^{5.4}
2	1	2	2	2	10 ^{6.5}
3	1	1	1	3	10 ^{7.1}
4	1	2	2	4	10 ^{6.2}
5	2	1	2	3	10 ^{7.3}
6	2	2	1	4	10 ^{5.5}
7	2	1	2	1	10 ^{6.3}
8	2	2	1	2	10 ^{6.1}
9	3	1	1	4	10 ^{5.6}
10	3	2	2	3	10 ^{6.7}
11	3	1	1	2	10 ^{6.3}
12	3	2	2	1	10 ^{5.5}
13	4	1	2	2	10 ^{6.2}
14	4	2	1	1	10 ^{4.8}
15	4	1	2	4	10 ^{5.8}
16	4	2	1	3	10 ^{5.2}
K1	6.300	6.100	5.600	5.500	/
K2	6.275	5.875	6.250	6.275	/
k3	6.025	/	/	6.550	/
k4	5.500	/	/	5.775	/
极差 R	0.800	0.625	0.750	1.050	/

表 6 大熊猫犬瘟热病毒培养方差分析

Tab 6 Variance analysis of giant panda canine

distemper virus culture

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
MOI	1.655	3.000	14.391	9.280	<0.05
PH	0.905	1.000	7.870	9.280	>0.05
温度	1.410	1.000	12.261	9.280	<0.05
收获时间	2.705	3.000	23.522	9.280	<0.05

2.3 工艺重复性验证 如图 1 所示,3 批收获液病毒含量达到 $10^{7.0} \sim 10^{7.5} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ mL}$ 。

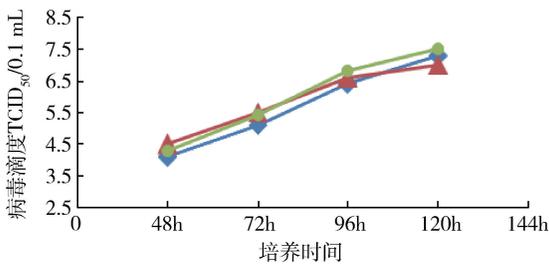


图 1 大熊猫犬瘟热疫苗工艺重复性验证

Fig 1 The repeatability test of the culture craft for canine distemper vaccine of giant pandas

2.4 疫苗检验 经检验,大熊猫犬瘟热灭活疫苗(CDV-PA-1421 株)性状为乳白色至淡红色液体,静置后底部有白色沉淀,轻轻振摇,呈均匀悬液,pH 值为 7.2。使用 18~22 g 小鼠 10 只,腹腔注射,每只 0.5 mL,观察 21 d,小鼠全部健活,没有出现任何的局部和全身不良反应。

3 结论与讨论

犬瘟热病毒自 1809 年报道以来,在世界范围内广泛流行^[8]。随着 CDV 毒株基因的不断变异,宿主范围已由犬和猫扩大到其他哺乳动物,尤其是濒危的大熊猫^[9]。犬瘟热已经成为威胁大熊猫种群数量和生命安全的第一大烈性传染病^[10-11],然而现有犬瘟热疫苗的免疫效果有所降低,针对熊猫源的专用疫苗更是欠缺,迫切需要研发更为有效的疫苗制剂。本研究所用大熊猫犬瘟热病毒(CDV-PA-1421 株)是陈德坤团队 2015 年提取分离的大熊猫犬瘟热病毒陕西株,属强毒株,与已

发表 CDV SD(14) 11 毒株(亚洲-1 型)同源性为 98%^[12],毒株十分宝贵。本试验基于已有的大熊猫犬瘟热搅拌瓶工艺参数,利用正交试验对培养基、细胞接种浓度、微载体浓度、pH 值、病毒 MOI 等关键参数进行研究,从而确定大熊猫犬瘟热病毒(CDV-PA-1421 株)微载体悬浮培养工艺。

Vero 细胞微载体培养方差分析结果显示:微载体浓度、细胞接种密度对试验结果影响高度显著,但并不是细胞接种密度及微载体浓度越高越好。微载体浓度低时,细胞增殖受限,最高细胞密度较低。微载体浓度过高,搅拌速度较大,对细胞造成损伤,不仅不利于细胞生长,微载体成本也较高。此外,细胞接种密度为 $0.4 \times 10^6/\text{mL} \sim 0.6 \times 10^6/\text{mL}$ 反而比 $0.2 \times 10^6/\text{mL} \sim 0.4 \times 10^6/\text{mL}$ 的最高细胞密度低。这是由于过高的接种密度,会造成营养物质过快耗竭,影响细胞增殖,更不利于后期的病毒繁殖。细胞生长液优选条件为 MSVP + 1% 血清,但是否添加血清对最高细胞密度影响较小,方差分析也显示细胞生长液对细胞增殖的影响不显著。此外,血清的添加也存在诸多问题:无论是进口或国产血清均可能在外源病毒污染的风险,影响疫苗产品的安全性;血清白蛋白易吸附在微载体表面,细胞贴附率明显下降;杂蛋白、激素、多肽等多种杂质增大下游分离纯化的难度。因此,本试验选择 MSVP 无血清培养基作生产培养基。

病毒培养方差分析显示:MOI 对病毒增殖影响显著,但 0.01、0.03、0.1 结果差异较小,显著性主要来自 0.3 MOI 水平与其他水平的差距。当 MOI 大于 0.3 时,细胞病变过快,细胞维持时间短,影响病毒增殖,最终收获液的病毒含量偏低,从而确定最适 MOI 为 0.01~0.1。温度对病毒增殖影响显著,37 °C 条件下的病毒含量明显高于 34 °C。收获时间对病毒增殖影响高度显著,培养 96~120 h 病毒滴度高于 $10^{7.0} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ mL}$,与水貂犬瘟热(CDV3-CL 株)在 100~120 h 获得高滴度病毒液一致^[13]。

本研究确定大熊猫犬瘟热病毒(CDV-PA-1421 株)培养工艺为:将长成单层的 Vero 细胞消化,接种到

10L 生物反应器中,细胞接种浓度为 $0.2 \times 10^6/\text{mL} \sim 0.4 \times 10^6/\text{mL}$,微载体浓度为 8.0 g/L ,细胞生长液为 MSVP 培养基。按 $0.01 \sim 0.1\text{MOI}$ 接毒, 37°C pH 值 7.2 条件下培养 96 ~ 120 h 收获上清液,即可获得高于 $10^{7.0} \text{ TCID}_{50}/0.1\text{mL}$ 的收获液。连续进行 3 批重复性验证结果显示,病毒培养工艺稳定,收获液病毒含量在 $10^{7.0} \sim 10^{7.5} \text{ TCID}_{50}/0.1\text{mL}$,批间差异小,为大熊猫犬瘟热灭活疫苗的研究奠定良好基础。由于大熊猫的保护限制,无法对其进行犬瘟热攻毒试验研究,难以确定大熊猫犬瘟热特异性抗体保护效价,本研究将继续利用制备的灭活疫苗免疫其他动物,进行异源精制抗体的研究,以期为大熊猫犬瘟热的治疗提供更多的解决方案。

参考文献:

- [1] Zhao N, Li M, Luo J, *et al.* Impacts of canine distemper virus infection on the giant panda population from the perspective of gut microbiota[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1 - 10.
- [2] Feng N, Yu Y, Wang T, *et al.* Fatal canine distemper virus infection of giant pandas in China[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27518.
- [3] 赵鹏鹏, 韩学利, 沈洁娜, 等. 大熊猫犬瘟热的诊治及预防对策[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(9): 115 - 118.
- Zhao P P, Han X L, Shen J N, *et al.* Diagnosis, treatment and prevention of canine distemper in giant pandas[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2017, 38(9): 115 - 118.
- [4] 邵伟庚, 江峰, 黄利亚, 等. 现实与未来情景下大熊猫分布区内犬瘟热风险评估[J]. *经济动物学报*, 2017, 21(4): 39 - 41.
- Shao W G, Jiang F, Huang L Y, *et al.* Risk assessment of canine distemper in the distribution areas of giant panda under real and future scenarios [J]. *Journal of Economic Animal*, 2017, 21(4): 39 - 41.
- [5] 王成东, 张志和. 大熊猫和小熊猫犬瘟热病与疫苗免疫现状[J]. *四川动物*, 2006, 25(3): 668 - 672.
- Wang C D, Zhang Z H. Canine distemper of giant panda and red panda and current status of vaccine immunity[J]. *Sichuan*

Journal of Zoology, 2006, 25(3): 668 - 672.

- [6] Bronson E, Deem S L, Sanchez C, *et al.* Serologic response to a canarypox - vectored canine distemper virus vaccine in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) [J]. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2007, 38(2): 363 - 366.
- [7] Geng Y, Shen F, Wu W, *et al.* First demonstration of giant panda's immune response to canine distemper vaccine [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 102(1): 103489.
- [8] De Vries R D, Ludlow M, Verburgh R J, *et al.* Measles vaccination of nonhuman primates provides partial protection against infection with canine distemper virus [J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(8): 4423 - 4433.
- [9] Jin Y, Zhang X, Ma Y, *et al.* Canine distemper viral infection threatens the giant panda population in China. [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(69): 113910 - 113919.
- [10] 胡彦博, 秦晓东, 梁晚枫. 大熊猫犬瘟热研究进展[J]. *吉林畜牧兽医*, 2016, 37(02): 12 - 15.
- Hu Y B, Qin X D, Liang W F. The Advances of giant panda's canine distemper [J]. *Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2016, 37(02): 12 - 15.
- [11] Shao W, Jiang F, Huang L, *et al.* Risk assessment of canine distemper in the distribution area of giant panda in Sichuan, Shaanxi and Gansu provinces, China [J]. *Journal of Risk Analysis and Crisis Response*, 2017, 7(4): 225 - 229.
- [12] 岳进华, 刘鹤媛, 周铭, 等. 大熊猫犬瘟热病毒 LG 株的分离鉴定[J]. *动物医学进展*, 2016, 37(10): 60 - 63.
- Yue J H, Liu H Y, Zhou M, *et al.* Identification of canine virus LG strain isolated from giant panda [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016, 37(10): 60 - 63.
- [13] 冯二凯, 程悦宁, 罗国良, 等. 生物反应器悬浮培养 Vero 细胞制备水貂犬瘟热活疫苗 [J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53(6): 41 - 47.
- Feng E K, Cheng Y N, Luo G L, *et al.* Suspension culture of vero cells in bioreactor for preparation of mink canine distemper attenuated live vaccine [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2019, 53(6): 41 - 47.

(编辑:李文平)