

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.4.08

一株 MDBK 细胞的低血清悬浮驯化研究

王磊, 杨承槐, 刘莹*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-09-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 04-0057-06 [中图分类号] Q813.11

[摘要] 研究选取一株背景清晰、纯净的 MDBK 贴壁细胞, 通过直接驯化和逐级降低血清相结合的办法, 获得了一株可以在低血清培养基中全悬浮培养的 MDBK 细胞。该细胞在含 0.5% 胎牛血清的培养基中悬浮培养 48 h 后的细胞密度稳定在 $5.0 \times 10^6/\text{mL}$ 以上, 培养 72 h 后细胞密度最高可达 $1.16 \times 10^7/\text{mL}$, 且细胞形态良好, 活力在 93% 以上, 具有良好的传代稳定性。应用筛选获得的悬浮培养 MDBK 细胞株分别接种伪狂犬病毒和传染性牛鼻气管炎病毒后, 检测病毒敏感性。细胞在 24 h 均发生了皱缩, 72 h 大部分死亡。悬浮培养的 MDBK 细胞对传染性牛鼻气管炎病毒的滴度在 24 h 达到最大值 $10^{7.6}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, 对伪狂犬病毒的滴度在 48 h 达到最大值 $10^{7.6}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, 说明虽然细胞的培养方式发生了改变, 但并没有影响上述两种病毒在该细胞上的增殖特性。对 MDBK 细胞的全悬浮驯化研究可为相关病毒类疫苗规模化生产及工艺的升级改进提供细胞学基础资料。

[关键词] MDBK 细胞; 全悬浮培养; 低血清; 细胞驯化

Domestication of a MDBK Cell Line to Suspension Culture by Low - Serum Medium

WANG Lei, YANG Cheng - Huai, LIU Ying*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: LIU Ying, E - mail: liuying8943@163.com

Abstract: In this study, a well - defined and pure adherent bovine kidney cells (MDBK) was acclimated to the suspension condition though direct reducing serum and gradually reducing serum. The results showed that the MDBK cell density proliferated to $5 \times 10^6/\text{mL}$ after 48 h of suspension culture in low serum medium, and reached highest cell density to $1.16 \times 10^7/\text{mL}$ after 72 h with good morphology, viability over 93%, well generational stability. In order to test virus sensitivity, the suspension MDBK cell lines were inoculated with pseudorabies virus (PRV) and infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV). The results showed that the cells were all shrunk in

基金项目: 中国兽医药品监察所级课题(201808)

作者简介: 王磊, 助理研究员, 从事细胞株鉴定、质控和保藏管理工作。

通讯作者: 刘莹。E - mail: liuying8943@163.com

24 h and most of them died in flakes at 72 h. The titer of IBR reached the maximum value $10^{7.6}$ TCID₅₀/mL at 24 h; the titer of PRV reached the maximum $10^{7.6}$ TCID₅₀/mL at 48 h. The result indicated that although the culture mode had changed, it did not affect the proliferation characteristics of the two viruses. In this research, the full suspension domestication of MDBK cells study can provide basic cytological data for scale production of related viral vaccines.

Key words: MDBK cells; suspension; low serum; cell domestication

MDBK 细胞 (Madin - Darby Bovine Kidney Cells, MDBK) 是由 S H Madin 和 N B Darby 于 1953 年从美国一头健康的成年公牛肾脏组织中分离培养建立的贴壁培养型传代细胞系^[1]。该细胞系对多种病原(牛病毒性腹泻病毒、传染性牛鼻气管炎病毒、伪狂犬病毒等)易感^[2-3], 被广泛用于病毒感染、检测和培养领域, 尤其用于传染性牛鼻气管炎病毒的增殖, 病毒感染效率高、增殖快且不易变异, 是公认的适合生产传染性牛鼻气管炎疫苗的细胞基质^[4]。但是, 以 MDBK 细胞作为生产基质的相关疫苗, 由于其贴壁生长特性的限制, 多采用转瓶培养方式和微载体培养方式进行生产, 生产周期长, 下游工艺相对复杂, 工业化大规模生产的难度较大。因此驯化全悬浮的 MDBK 细胞具有十分重要的现实意义。

悬浮细胞是指生长不依赖支持物表面, 可在液体培养基中呈悬浮状态生长的细胞。与贴壁细胞相比, 悬浮细胞尽量减少或避免了动物源性血清的添加, 使其具有更好的传代稳定性和安全性^[5], 同时还具备了可线性放大培养的优势, 是实现生物反应器大规模、高效率生产的前提条件^[6-7]。悬浮培养基的使用还彻底摆脱了细胞贴附基质, 可以有效地简化下游分离纯化工艺的难度, 节约设备空间, 缩短生产时间, 降低生产成本^[8]。本试验对一株贴壁的 MDBK 细胞进行了全悬浮驯化研究, 以期对相关产品生产工艺的升级改进提供细胞学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和毒株 MDBK 细胞(第 9 代, 批号

20170623)、伪狂犬病毒(Bartha - K61 株)、传染性牛鼻气管炎病毒(AV21 株)由国家兽医微生物菌种中心鉴定保藏。

1.1.2 主要试剂和耗材 DMEM (Gibco, 批号 8119416)、0.25% 胰蛋白酶(Gibco, 批号 1953147)、悬浮培养基(MDBK - SLM)、胎牛血清(PAN, 批号 ST170802)、台盼蓝染液(sigma, 批号 RNBG9718)。

1.1.3 主要仪器 Hettich 离心机(型号 320R)、Thermo CO₂ 培养箱(型号 Heracell 240i)、Nikon 倒置显微镜(型号 TS100)、Biomedical 多通道生化分析仪(型号 NOVA400)、inforS 振荡型 CO₂ 培养箱(型号 Minitron)、Countstar 细胞计数仪(型号 Auto T4)。

1.2 方法

1.2.1 贴壁 MDBK 细胞在低血清培养基中悬浮驯化培养 取培养成良好单层的 MDBK 细胞, 消化后收集细胞培养物悬液进行细胞计数, 1000 r/min 离心 10 min, 收集细胞沉淀。将细胞沉淀按照初始密度 1×10^6 /mL 用 40 mL 低血清培养基(含 2% 胎牛血清)重悬, 置于 125 mL 三角摇瓶中, 110 r/min、37 °C、5% CO₂ 条件下培养。每 24 h 取样计数, 培养至 48 h 处理, 若 48 h 细胞密度高于 2×10^6 /mL, 使用含 2% 胎牛血清的培养基稀释细胞至 1×10^6 /mL, 若 48 h 细胞密度低于 2.0×10^6 /mL, 1000 r/min 离心 10 min 后, 更换新鲜培养基, 直至每 48 h 可以正常稀释传代, 连续 5 代保持 48 h 的细胞密度是初始密度的两倍以上, 且细胞活率高于 90%, 可以认为驯化成功。待细胞在含 2% 胎牛血清的培养基中生长稳定后, 采用上述方法逐级降低培养基中血清用量(1%、0.5% 胎牛血清含量)。降血清过程中细胞

密度稳定 5 代以上方可进行下一步降血清适应。

1.2.2 悬浮细胞的批培养生长曲线绘制及代谢物含量测定 细胞密度测定方法采用台盼蓝(TB)染色法,具体操作如下:取 200 μL 细胞悬液,用台盼蓝染液等体积稀释细胞悬液后,吹打均匀,取 20 μL 加入细胞计数板中,放入 Countstar 细胞计数器中计数,每个样品取 4 个视野计数,结果求平均值,计算细胞密度。

将悬浮细胞按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的初始密度接种 40 mL 培养基后置于 125 mL 三角摇瓶中,110 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。在传代后 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 分别测定细胞密度并绘制生长曲线。在计数期间,同时每 24 h 取 1 mL 细胞悬液,3000 r/min 离心 10 min,吸取培养基上清液,使用 NOVA 400 多通道生化分析仪测定葡萄糖、乳酸、 NH_4^+ 、谷氨酰胺的含量。

1.2.3 倍增时间的测定 取驯化传代稳定的细胞,每天取样计数,绘制细胞生长曲线,计算细胞倍增时间。取驯化传代稳定细胞峰值前一天的细胞计数(Y)、接种细胞数(X)及生长时间(T)计算细胞倍增时间 Δt ,计算公式为: $\Delta t = T/A$; $A = \log_2 Y/X$

1.2.4 细胞传代稳定性测定 将处于对数生长期的悬浮 MDBK 细胞按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的初始密度接种 40 mL 培养基后,置于 125 mL 三角摇瓶中,110 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。每 48 h 传代一次,即用新鲜培养基将细胞液稀释至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。将细

胞进行 22 d 的连续传代培养,对比每次传代时的细胞密度和细胞活率的差异。

1.2.5 病毒增殖实验 取低血清培养基中生长良好的悬浮 MDBK 细胞,离心后按 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞密度接种至三角摇瓶,每瓶 40 mL 细胞悬液。同时按体积比的 1% 分别接入伪狂犬病毒和传染性牛鼻气管炎病毒。培养 24 h、48 h、72 h 分别收获病毒并测定病毒滴度,同时设阴性对照和贴壁细胞接毒对照。

用 DMEM 无血清培养基将待检病毒液在灭菌管作 1:10 系列稀释,取 $10^{-4} \sim 10^{-7}$ 4 个稀释度病毒液,分别接种已在 96 孔板中生长良好的检验用细胞(贴壁生长的 MDBK 细胞),每个稀释度 6 个孔,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,同时设正常细胞对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下静置培养 96 h,按 Reed - Muench 法计算 TCID_{50} 。

2 结果与分析

2.1 贴壁 MDBK 细胞在低血清培养基中悬浮驯化培养 结果见表 1。MDBK 细胞在贴壁状态至 2% 血清全悬浮阶段时,细胞容易受到血清的影响而发生结团现象。采用细胞沉降的办法,自然沉降 2~4 min 后尽可能吸取上层细胞悬液,转移到等体积的新鲜培养基中。经过 8 代左右,MDBK 细胞逐渐可以适应 2% 血清的全悬浮培养。再连续传 7 代,保证每代在 48 h 的细胞密度是初始密度的两倍,细胞活率稳定在 90% 以上,可以认为细胞已经初步适应了悬浮培养条件。

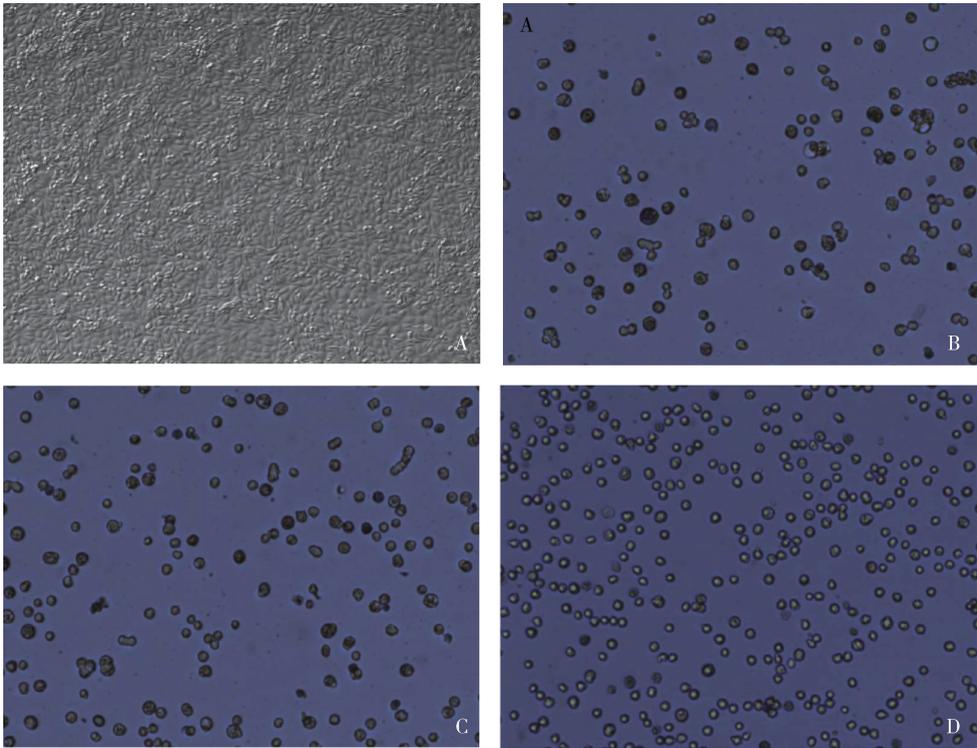
表 1 贴壁 MDBK 细胞全悬浮驯化情况

Tab 1 Acclimation of adherent MDBK cells in complete suspension

驯化阶段	传代次数	培养容器	接种密度/mL	培养时间/h	细胞数量/mL	细胞活率	结团情况
贴壁细胞至 2% 血清悬浮	15	三角瓶	$\geq 1 \times 10^6$	48	$\geq 2 \times 10^6$	$\geq 90\%$	结团较多且大
2% 血清至 1% 血清悬浮	10	三角瓶	$\geq 1 \times 10^6$	48	$\geq 2 \times 10^6$	$\geq 93\%$	少
1% 血清至 0.5% 血清悬浮	10	三角瓶	$\geq 1 \times 10^6$	48	$\geq 5 \times 10^6$	$\geq 93\%$	无

随着细胞对低血清的逐步适应,进一步降低血清可以有效改善细胞的结团问题(图 1),同时显著提高了生长能力,即在 0.5% 血清培养基中培养 4 d 细胞密度最高可达 $1.16 \times 10^7/\text{mL}$ 。经过 35 代左

右的驯化,得到了一株可以在 0.5% 血清培养基中全悬浮生长的形态均一、分散均匀、生长密度稳定的 MDBK 细胞(以下称 MDBK -0.5% FBS 细胞)。



A: 贴壁 MDBK 细胞形态; B: MDBK 细胞在 2% 血清培养基悬浮培养 72 h 形态;

C: MDBK 细胞在 1% 血清悬浮培养 72 h 形态; D: MDBK 细胞在 0.5% 血清悬浮培养 72 h 形态

A: Morphology of adherent MDBK cells; B: MDBK cells cultured in 2% serum medium for 72 h;

C: MDBK cells cultured in 1% serum medium for 72 h; D: MDBK cells cultured in 0.5% serum medium for 72 h

图 1 MDBK 细胞在不同血清浓度培养基中悬浮培养状态

Fig 1 Suspension culture of MDBK cells in different serum concentrations mediums

2.2 在不同血清浓度中驯化的 MDBK 细胞的批生长曲线与倍增时间测定结果 在不同血清浓度中驯化的 MDBK 细胞在有限营养环境中批培养情况存在明显差异(图 2)。在 2% 血清中悬浮适应的 MDBK 细胞培养 5 d 时最大细胞密度达到 $7.08 \times 10^6/\text{mL}$, 倍增时间为 32.33 h; 在 1% 血清中悬浮适应的 MDBK 细胞 5 d 时最大细胞密度达到 $7.64 \times 10^6/\text{mL}$, 倍增时间为 30.15 h; 在 0.5% 血清中悬浮适应的 MDBK 细胞 3 d 时最大细胞密度达到 $11.6 \times 10^6/\text{mL}$, 倍增时间为 17.32 h。

2.3 MDBK - 0.5% FBS 细胞批培养过程中代谢物的含量变化 为考察 MDBK - 0.5% FBS 细胞在有限营养环境中的代谢物变化情况, 取处于对数生长期的细胞以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 初始密度进行为期 6 d 的

批培养实验, 定时检测培养基中葡萄糖、乳酸、 NH_4^+ 、谷氨酸胺的含量变化(图 2、图 3)。结果发现, 初始的 1~2 d 细胞处于对数生长期快速增长, 同时葡萄糖作为重要的碳来源被快速消耗; 第 3 天后, 当培养基中葡萄糖量快消耗殆尽, 同时产生大量的 NH_4^+ 、乳酸等副代谢产物时, 细胞停止增殖, 生长密度达到了最大值。

2.4 MDBK - 0.5% FBS 细胞的传代稳定性测定 为研究 MDBK - 0.5% FBS 悬浮细胞的传代稳定性, 取处于对数生长期的悬浮 MDBK 细胞以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的初始密度连续传代, 在多次传代过程中, 各个代次的细胞密度均维持在稳定水平(48 h 后细胞密度 $\geq 5 \times 10^6/\text{mL}$), 细胞活率保持在 93% 以上(图 4)。

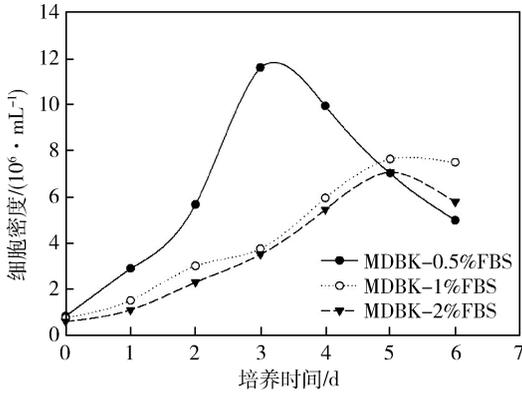


图2 不同血清浓度培养基中 MDBK 细胞悬浮生长的批生长曲线

Fig 2 Batch growth curve of MDBK cells in different serum concentrations mediums

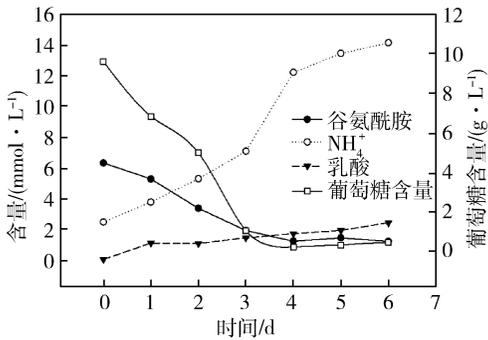


图3 MDBK-0.5% FBS 细胞批培养过程中培养基葡萄糖、乳酸、NH₄⁺、谷氨酰胺的含量变化

Fig 3 Changes of glucose, lactic acid, NH₄⁺, glutamine in MDBK-0.5% FBS batch culture

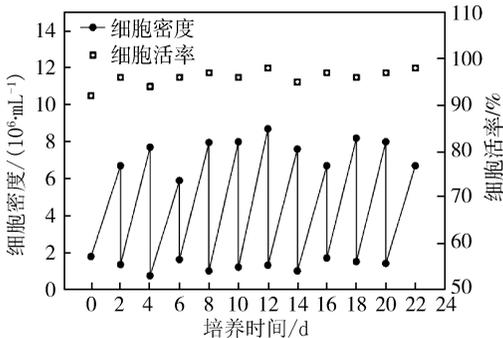


图4 MDBK 细胞在 0.5% 血清悬浮培养基中传代密度以及细胞活率

Fig 4 Passage density and cell viability of MDBK cells in 0.5% serum suspension medium

2.5 MDBK-0.5% FBS 细胞对伪狂犬病毒和传染性牛鼻气管炎病毒的敏感性测定 MDBK-0.5% FBS 细胞分别接种伪狂犬病毒和传染性牛鼻气管炎病毒后,24 h 均发生了皱缩,72 h 大部分细胞死亡。传染性牛鼻气管炎病毒滴度在 24 h 达到最高,为 $10^{7.6}$ TCID₅₀/mL;伪狂犬病毒滴度在 48 h 达到最高,为 $10^{7.6}$ TCID₅₀/mL(表 2)。两种病毒分别接种贴壁对照细胞后每 24 h 观察一次,传染性牛鼻气管炎病毒接种后 24 h 开始出现病变,48 h 全部脱落;伪狂犬病毒接种后 24 h 开始出现病变,72 h 全部脱落。

表2 MDBK-0.5% FBS 细胞增殖传染性牛鼻气管炎病毒和伪狂犬病毒结果

Tab 2 Result of infectious IBRV and PRV in MDBK-0.5% FBS cells

病毒	不同收毒时间的病毒滴度/ (TCID ₅₀ · mL ⁻¹)			贴壁 MDBK 细胞接种对照
	24 h	48 h	72 h	
传染性牛鼻气管炎病毒	$10^{7.6}$	$10^{6.8}$	$10^{6.5}$	$10^{7.6}$
伪狂犬病毒	$10^{7.3}$	$10^{7.6}$	$10^{7.4}$	$10^{7.3}$

3 讨论与结论

利用全悬浮的细胞系作为疫苗的生产基质,不仅可以实现在疫病爆发初期短时间内大规模应急生产的需要,还尽可能规避了大量使用动物源性血清所带来不确定性外源因子的风险^[9]。

细胞的悬浮驯化关键点在于悬浮培养基种类以及驯化过程中策略的选择。低血清或无血清悬浮培养基中通常使用酵母水解物配合成分明确的动物源生长因子来代替动物源性血清的营养作用^[10]。糖类是细胞利用的重要能量和碳源,也是维持细胞生长重要能量供给。谷氨酰胺作为培养基添加剂可以有效地促进细胞生长和抗体的产生^[11]。针对不同细胞的营养代谢特性选择合适的培养基显得尤为重要^[12]。理想的悬浮培养基,可以使细胞有效利用葡萄糖,支持细胞的快速增长,同时延迟乳酸以及 NH₄⁺ 等副产物的积累,从而达到细胞高密度培养的目标。反之会使细胞在培养

过程中对培养基中的糖类物质利用率偏低,使乳酸、 NH_4^+ 等代谢副产物的量快速积累,细胞过早地进入生长维持期,同时产生大量的细胞结团现象,无法实现细胞的高密度培养。

在细胞的悬浮驯化过程中一般采用将消化的细胞直接接入低血清/无血清悬浮培养基驯化,或者在贴壁或悬浮状态下逐级替换原有培养基并降低血清的悬浮驯化方法^[13]。逐级替代培养基降低血清的方法要比直接驯化法耗时多,但是相对柔和,适用于难以直接驯化的细胞。本实验中 MDBK 细胞的悬浮驯化结合上述两种方法,采用在低血清悬浮培养基中直接驯化,然后再逐级降低血清的策略,成功得到了一株可在 0.5% 血清浓度下悬浮生长,传代稳定性好,可在三角摇瓶中实现较高密度生长,最高密度可达 $1.16 \times 10^7/\text{mL}$ 的悬浮细胞。病毒敏感性实验表明,虽然 MDBK 的培养方式发生了改变,但并没有影响细胞对特定病毒的增殖特性。

参考文献:

[1] 栾海萍, 杨素霞, 陈红岩. MDBK 细胞传代中染色体畸变发生的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(6): 30-32.
Luan H P, Yang S X, Chen H Y. The study on MDBK cells which were passaged in chromosomal aberration [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredit, 2015, 23(6): 30-32.

[2] 王树成, 赵祥平, 董志珍, 等. 用 PK-15、Vero 和 MDBK 三种细胞增殖猪伪狂犬病病毒的比较[J]. 畜牧与兽医, 1996, 28(2): 80.
Wang S C, Zhao X P, Dong Z Z, et al. Comparison of porcine pseudorabies virus proliferation by PK-15, Vero and MDBK cells [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 1996, 28(2): 80.

[3] 张志飞, 徐丽媛, 周伟光, 等. IBRV 在 MDBK 细胞中的增殖规律研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, 13(07): 46-49.
Zhang Z F, Xu L Y, Zhou W G, et al. Study on the proliferation rule of IBRV in MDBK cells [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016, 13(07): 46-49.

[4] 刘瑞宁, 邓明亮, 刘玉辉, 等. 牛传染性气管炎疫苗研究进展[J]. 动物医学进展, 2016, 37(2): 85-90.
Liu R N, Deng M L, Liu Y H, et al. Advance in vaccines of infectious bovine rhinotracheitis [J]. Progress in Veterinary, 2016, 37(2): 85-90.

[5] 阿尔祖古丽·阿依丁, 卢美琳, 李自良, 等. Marc-145 细胞低血清适应培养传代稳定性和无血清驯化研究[J]. 浙江农业学报, 2020, 32(3): 415-420.

Ayiding A, Liu M, Li Z L, et al. Study on subculture stability and serum-free acclimation of Marc-145 cells in low serum adaptation culture [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2020, 32(3): 415-420.

[6] 吴熠潇, Thomas Bissinger, Yvonne Genzel, 等. 基于 MDCK 悬浮细胞灌注培养的流感病毒生产过程开发[J]. 生物技术通报, 2020, 36(10): 89-97.
Wu Y X, Thomas B, Yvonne G, et al. Perfusion process development of MDCK suspension cells for influenza virus production [J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(10): 89-97.

[7] 刘萍, 崔燕. MDCK 细胞悬浮培养驯化及其在增殖禽流感病毒 H9 亚型中的初步应用[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(1): 184-190.
Liu P, Cui Y. Conversion of MDCK cells to suspension culture and preliminary application in the proliferation of avian influenza virus H9 subtype [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(1): 184-190.

[8] 李自良, 王家敏, 赵彩红, 等. MDCK 悬浮细胞制备及流感病毒敏感性研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(11): 981-988.
Li Z L, Wang J M, Zhao C H, et al. Establishment of new MDCK suspension cell line and its sensitivity study on influenza virus [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(11): 981-988.

[9] 白春丽, 叶倩, 姬阿美, 等. 生产禽流感病毒的悬浮 MDCK 细胞稳定性的研究[J]. 生物技术通报, 2020, 36(11): 1-8.
Bai C L, Ye Q, Ji A M, et al. Stability of suspended MDCK cells for avian influenza virus production [J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(11): 1-8.

[10] 刘天伦, 郎洪彬, 孔飒. PK-15 细胞的无血清全悬浮驯化研究[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(9): 12-18.
Liu T L, Lang H B, Kong S. Domestication of a PK15 cell line to suspension culture by serum-free medium [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(9): 12-18.

[11] Flickinger M C, Goebel N K, Bibila T, et al. Evidence for posttranscriptional stimulation of monoclonal antibody secretion by l-glutamine during slow hybridoma growth [J]. Journal of Biotechnology, 1992, 22: 201-226.

[12] 赵彩红, 王家敏, 李自良, 等. 不同培养基中 MDCK 细胞生长及代谢动力学研究[J]. 生物技术, 2019, 29(5): 485-491.
Zhao C H, Wang J M, Li Z L, et al. Study on MDCK cell growth and metabolic dynamics in different medium [J]. Biotechnology, 2019, 29(5): 485-491.

[13] 张良艳, 姚志东, 邢丽, 等. MDCK 细胞的悬浮驯化及初步应用[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(3): 382-384.
Zhang L Y, Yao Z D, Xing L, et al. Conversion of MDCK cell line to suspension culture and its application for influenza virus production [J]. Letters in Biotechnology, 2013, 24(3): 382-384.