



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102453698 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 16

(21) 申请号 201010517551. 7

(22) 申请日 2010. 10. 18

(71) 申请人 北京清大天一科技有限公司

地址 102200 北京市昌平区科技园区白浮泉  
路 11 号

(72) 发明人 王建超 陈文庆 张韧

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限  
公司 11243

代理人 钟晶

(51) Int. Cl.

*C12N 5/10* (2006. 01)

*C12Q 1/68* (2006. 01)

*G01N 33/53* (2006. 01)

*A61K 39/12* (2006. 01)

*A61P 31/14* (2006. 01)

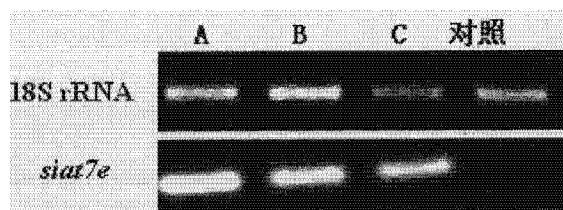
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

悬浮培养传代细胞及利用其生产猪瘟疫苗的方法

### (57) 摘要

本发明提供一种悬浮培养传代细胞的方法, 其包括如下步骤: (1) 利用包含能减弱细胞粘附性能基因序列的表达载体稳定转染猪睾丸细胞或猪肾细胞; (2) 筛选并分离稳定转染细胞克隆; (3) 检测稳定转染细胞克隆中的基因表达; (4) 稳定转染细胞克隆的悬浮培养。本发明进一步涉及利用所述悬浮培养的猪睾丸细胞或猪肾细胞生产猪瘟疫苗的方法。



1. 一种悬浮培养猪睾丸细胞或猪肾细胞的方法,其包括如下步骤:
  - (1) 利用包含能减弱细胞粘附性能基因序列的表达载体稳定转染猪睾丸细胞或猪肾细胞;
  - (2) 筛选并分离稳定转染细胞克隆;
  - (3) 检测稳定转染细胞克隆中的基因表达;
  - (4) 稳定转染细胞克隆的悬浮培养。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述步骤(1)中利用含有 siat7e 基因的表达载体稳定转染猪睾丸细胞或猪肾细胞。
3. 根据权利要求1所述的方法,所述转染的方法包括二乙氨基-葡聚糖介导法,磷酸钙介导法,脂质体介导法,聚阳离子-DMSO 转染法,生物粒子介导法,电穿孔转染法,显微注射法,病毒介导法。
4. 根据权利要求3所述的方法,所述转染的方法为脂质体介导法。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述的步骤(2)包括如下步骤:细胞转染24-48h后,细胞培养瓶中的完全培养基更换为选择性培养基,以后每2-4天更换一次培养基,持续培养14-21天,观察是否形成细胞克隆,分离、扩增独立细胞克隆。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述的步骤(3)包括如下步骤:利用RNA水平检测方法或蛋白水平检测方法检测稳定转染细胞克隆中的基因表达,其中,所述的RNA水平检测方法包括反转录聚合酶链式扩增反应、荧光定量聚合酶链式扩增反应、Northern杂交;所述的蛋白水平检测方法包括Western杂交、酶联免疫吸附试验、免疫荧光检测、免疫组织化学技术检测。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述的步骤(4)的悬浮培养的条件为:
  - 容器:悬浮培养容器;
  - 细胞接种密度: $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$ ;
  - 细胞培养温度:33-38℃;
  - pH值:6.0-7.5;
  - 溶氧:20%-100%。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述的悬浮培养容器为摇瓶、生物反应器;所述细胞接种密度为 $2 \times 10^5$ - $6 \times 10^5$ ;所述细胞培养温度为36-37℃;所述pH为6.8-7.2;所述溶氧为30%-80%。
9. 一种采用权利要求1-8中任意一项所述的方法得到的猪睾丸细胞或猪肾细胞生产猪瘟疫苗的方法。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中,生产疫苗的条件为:
  - 用病毒感染猪睾丸细胞或猪肾细胞;
  - 病毒感染复数:0.001-5;
  - 病毒培养温度:33-38℃;
  - pH值:6.5-8.0;
  - 溶氧:20%-100%。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中,所述猪睾丸细胞或猪肾细胞的培养密度至少为 $1 \times 10^6$ ;所述病毒感染复数为0.01-1;所述病毒培养温度为36-37℃;所述pH为7.2-7.8;

所述溶氧为 30% -80%。

## 悬浮培养传代细胞及利用其生产猪瘟疫苗的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药生物领域,具体涉及悬浮培养传代细胞的方法,所述传代细胞包括猪睾丸细胞或猪肾细胞;进一步涉及利用该细胞生产猪瘟疫苗的方法。

### 背景技术

[0002] 体外细胞的培养方法包括贴壁培养和悬浮培养,其中悬浮培养又可分为微载体悬浮培养及全悬浮培养。与贴壁培养相比,悬浮培养具有如下优点:(1)可连续扩大生产量;(2)有利于细胞培养基中的营养物质和气体充分接触,而且易于控制培养条件(温度、pH、氧分压和CO<sub>2</sub>等);(3)培养条件稳定,趋于均一,便于进行定量研究;(4)易于在连续密闭的系统中进行,减少了操作步骤和污染的机会;(5)可以长期连续培养,既可节省人力,又使细胞能持续维持在对数生长期;(6)悬浮培养的细胞仍保持原先对病毒的敏感性和生物学特性。而与微载体悬浮培养相比,全悬浮培养有以下优势:无需昂贵的微载体,从而有效降低生产成本;可省去微载体培养中附加步骤如消化收获细胞等,从而简化生产过程,缩短生产时间,提高生产效率,并易于进行扩大培养。

[0003] 现有研究已发现影响细胞粘附的一些基因。例如人类 siat7e 基因被认为在控制细胞贴附程度中起着一定的作用,增加的 siat7e 基因的表达可减少细胞粘附 (Jaluria P, Betenbaugh M, Konstantopoulos K, Frank B, Shiloach J (2007) Application of microarrays to identify and characterize genes involved in attachment dependence in HeLa cells. *Metab Eng* 9:241-251.)。

[0004] 猪瘟疫 (HC) 是由猪瘟疫病毒 (Hog cholera virus, HCV) 引起的猪的一种高度传染性疾病,它流行广泛,发病率高、死亡率高,给养猪业造成了严重的经济损失。现有预防和控制猪瘟疫的最有效的方法是接种猪瘟疫疫苗

[0005] 现用于猪瘟疫病毒培养的细胞基质主要有牛睾丸原代细胞 (BT 细胞)、猪肾细胞 (PK 细胞或 IBRS-2 细胞)、猪睾丸细胞 (ST 细胞) 等。由于我国牛群较普遍存在 BVD/MBV 病,用牛睾丸细胞原代细胞制苗,易造成细胞外源病毒污染,且产毒滴度不高,批间差异大,给疫苗产量、效力的提高带来困难。而且牛睾丸细胞为原代细胞,细胞的寿命有限,每次制苗需重新获得细胞。而猪肾细胞、猪睾丸细胞为连续传代细胞系,取材容易易于放大进行规模化培养,有逐渐取代牛睾丸细胞生产猪瘟疫疫苗的趋势。非专利文献 1 表明 PK、ST、MPK 细胞对猪瘟疫病毒敏感,多种猪瘟疫疫苗株在猪肾细胞或猪睾丸细胞上适应而得到疫苗株。

[0006] 非专利文献 1:猪瘟疫病毒及其疫苗研究进展,中国病毒学,第 11 卷第 3 期第 201 ~ 207 页,1996 年 9 月。

[0007] 但是,现有以猪睾丸细胞或猪肾细胞作为细胞基质的猪瘟疫疫苗生产工艺均为转瓶贴壁培养或微载体悬浮培养,还未能实现细胞全悬浮培养,在生产成本、生产效率以及满足市场需求方面都具有较大局限性。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的在于解决现有技术中培养猪睾丸细胞或猪肾细胞的方法中存在的问题,提供一种大规模悬浮培养猪睾丸细胞或猪肾细胞的方法。

[0009] 本发明的悬浮培养猪睾丸细胞或猪肾细胞的方法包括如下步骤:

[0010] (1) 利用包含能减弱细胞粘附性能基因序列的表达载体稳定转染猪睾丸细胞或猪肾细胞;

[0011] (2) 筛选并分离稳定转染细胞克隆;

[0012] (3) 检测稳定转染细胞克隆中的基因表达;

[0013] (4) 稳定转染细胞克隆的悬浮培养。

[0014] 本发明进一步的目的是提供一种悬浮培养猪睾丸细胞或猪肾细胞以生产疫苗的方法。

#### 附图说明

[0015] 图 1 表示实施例 1 中稳定转染猪睾丸细胞克隆的 RT-PCR 检测图。其中,GAPDH 和 18s RNA 为内参基因,对照为未经转染的猪睾丸细胞。A、B 和 C 分别为分离到的稳定转染细胞克隆。RT-PCR 结果显示,A、B 和 C 三个稳定转染细胞克隆中均有 *siat7e* 基因的表达。

[0016] 图 2 表示实施例 1 中稳定转染猪睾丸细胞克隆的细胞生长曲线。结果显示稳定转染猪睾丸细胞克隆的生长特性正常。

#### 具体实施方式

[0017] 通过对猪睾丸细胞或猪肾细胞基因组进行基因改造,获得适于悬浮培养的猪睾丸细胞或猪肾细胞,结合细胞培养工艺,实现通过大规模悬浮培养猪睾丸细胞或猪肾细胞以生产疫苗。

[0018] 本发明的悬浮培养猪睾丸细胞或猪肾细胞的方法包括如下步骤:

[0019] (1) 利用包含能减弱细胞粘附性能基因序列的表达载体稳定转染猪睾丸细胞或猪肾细胞;

[0020] (2) 筛选并分离稳定转染细胞克隆;

[0021] (3) 检测稳定转染细胞克隆中的基因表达;

[0022] (4) 稳定转染细胞克隆的悬浮培养。

[0023] 在所述的步骤(1)中,所述的基因序列为 *siat7e* 基因;载体可以是本技术领域内常规的表达载体,例如质粒。所述的表达载体既可以根据本领域的常规技术手段自行制备,还可以购买获得。

[0024] 将 DNA 导入真核细胞的方式有两种:瞬时转染与稳定转染。在瞬时转染中重组 DNA 导入感染性强的细胞系以获得目的基因暂时但高水平的表达。转染的 DNA 不必整合进宿主染色体,当有大量样品需要在短时间内分析时,尤其是在转染后的 1 到 4 天内收获细胞,所得的溶解产物用于检测目的基因的表达时,可以采用瞬时转染的方式。瞬时转染中 DNA 的暂时表达即为瞬时表达。

[0025] 稳定或持久的转染用于建立克隆的细胞系,这种细胞系中转染的目的基因整合到染色体 DNA 中并指导适量目的蛋白的合成。一般来说(由细胞类型决定),形成稳定转染细胞的效率比瞬时转染的效率低 1 到 2 个数量级。利用可选择的遗传标记物有利于在非转染

细胞的背景中分离出稀少的稳定转染体。稳定转染中整合基因的表达即为稳定表达。

[0026] 将基因导入真核细胞的方法有许多种,包括生化方法转染,物理方法转染以及病毒介导的转化等。具体而言包括 DEAE(二乙氨基)-葡聚糖介导法,磷酸钙介导法,脂质体介导法,聚阳离子-DMSO 转染法,生物粒子介导法,电穿孔转染法,显微注射法,病毒介导法等,优选采用脂质体介导法。

[0027] 所述的步骤(1)进一步包括如下步骤:

[0028] (a) 用全长人类 *siat7e* 基因表达载体转染大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,纯化质粒;纯化质粒的方法可以是本领域常规的技术手段,可以采取试剂盒或非试剂盒的方法;

[0029] (b) 转接  $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  猪睾丸细胞或猪肾细胞于细胞培养板中,孵育细胞 20-24h,约 40-90% 汇合度;所述猪睾丸细胞或猪肾细胞可以是例如商品名为 ATCC, Cat. No. CCL-34 的市售商品;

[0030] (c) 取 1-10  $\mu$ g 的质粒 DNA 稀释于 250  $\mu$ L 转染培养基(如 Opti-MEM 培养基)中,混匀;2-50  $\mu$ L 脂质体稀释于 250  $\mu$ L 转染培养基中,轻轻混匀,静置 5-15min;

[0031] (d) 将上述制备的溶液混合,室温静置 10-20min;将步骤(b)中所述的细胞培养板中各个孔换成无血清无抗生素的 0.5-2mL 转染培养基;将上述步骤(c)中的混合物转入步骤(b)所述的孵育细胞的细胞培养板孔中,轻轻前后晃动混匀;

[0032] (e) 37 $^{\circ}$ C 培养,1-24h 后,将各个孔中的培养基换成完全培养基于 37 $^{\circ}$ C 培养;

[0033] (f) 24h 后,将细胞从细胞培养板中传至细胞培养瓶中。

[0034] 在所述步骤(2)中,由于摄取、整合和表达外源 DNA 是小概率事件,通常根据新表型筛选稳定转染体。一般情况下,这种表型由共同转染的编码抗生素抗性的基因提供。表达一个 DNA 分子上的基因标记的细胞经常也表达另一 DNA 分子携带的基因标记。因此,稳定表达选择性标记(如抗生素抗性)的细胞很可能也表达载体 DNA 上的其他 DNA 序列。这种物理上不相连的基因被整合到同一转化细胞内表达的现象叫做共转化。现有常用筛选标记包括氨基葡萄糖苷磷酸转移酶(对 G418 或新霉素有抗性)、潮霉素-B 磷酸转移酶(对潮霉素-B 有抗性)、黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(对霉酚酸、氨嘌呤有抗性)与嘌呤霉素-N-乙酰基转移酶(对嘌呤霉素有抗性)。本发明优选采用 G418 加压筛选。

[0035] 所述的步骤(2)进一步包括如下步骤:

[0036] 细胞转染 24-48h 后,将细胞培养瓶中的完全培养基更换为选择性培养基,以后每 2-4 天更换一次培养基,持续培养 14-21 天,观察是否形成克隆,分离、扩增独立细胞克隆。所述筛选的标记可以是本领域技术人员所熟知的筛选标记,包括但不限于 G418 筛选标记,所述的选择性培养基优选为 G418 选择性培养基。利用选择性培养基促进抗性细胞生长,无抗性细胞即死亡。

[0037] 所述的步骤(3)进一步包括如下步骤:

[0038] 待形成克隆后,挑取克隆进行鉴定,所述鉴定方法主要为对获得的克隆在插入基因的 RNA 水平和蛋白水平表达的检测,其中 RNA 水平的检测方法主要有:RT-PCR(反转录聚合酶链式扩增反应)、荧光定量 PCR(荧光定量聚合酶链式扩增反应)、Northern 杂交等。蛋白水平的检测方法主要有:Western 杂交、ELISA(酶联免疫吸附试验)、免疫荧光检测、免疫组织化学技术检测等。

[0039] 在所述步骤(4)中,将筛选获得并经过检测证明人类 *siat7e* 基因稳定表达的细胞

克隆在细胞培养瓶中（方瓶或摇瓶）驯化至悬浮培养。将驯化悬浮培养细胞取一部分冻存，另一部分在细胞培养瓶中继续培养。当细胞在细胞培养瓶中生长形态正常、活力大于 90% 时接种至摇瓶中。在摇瓶及生物反应器中扩增培养细胞，最后按适宜细胞接种密度接种至生产规模的生物反应器中，调节生物反应器的温度、培养液 pH 值、溶氧浓度等参数，使细胞生长于最适宜环境进行细胞培养。

[0040] 所述的步骤 (4) 的悬浮培养的条件为：

[0041] 容器：悬浮培养容器，优选为摇瓶 (shake bottle)、搅拌瓶 (Spinner Bottle)、生物反应器等；

[0042] 细胞接种密度： $1 \times 10^5$ – $1 \times 10^6$ ，优选  $2 \times 10^5$ – $6 \times 10^5$ ；

[0043] 细胞培养温度：33–38℃，优选 36–37℃；

[0044] pH 值：6.0–7.5，优选 6.8–7.2；

[0045] 溶氧浓度：20%–100%，优选 30%–80%。

[0046] 细胞培养方式可为批培养、流加培养与灌注培养。

[0047] 所述生物反应器包括但不限于搅拌式生物反应器、气升式生物反应器、固定床和流化床生物反应器、中空纤维反应器、膜生物反应器、一次性生物反应器等。

[0048] 在本发明的各种实施方式中，所选用的细胞培养基并不是关键的，原则上所有能够用于猪睾丸细胞或猪肾细胞悬浮培养所用的细胞培养基都可以使用，优选为无血清细胞培养基。很多培养基都已经是商业化产品，可以通过商业途径获得。

[0049] 本发明还涉及悬浮培养猪睾丸细胞或猪肾细胞以生产猪瘟疫苗的方法。

[0050] 大规模悬浮培养稳定转染的猪睾丸细胞或猪肾细胞，待猪睾丸细胞或猪肾细胞的细胞密度增殖至  $1 \times 10^6$  细胞 /mL 以上时，将细胞培养液更换为维持培养液，用病毒悬液接种猪睾丸细胞或猪肾细胞。其条件如下：

[0051] 用病毒感染增殖的猪睾丸细胞或猪肾细胞（细胞密度为至少约  $1 \times 10^6$ ）

[0052] 病毒感染复数 (m. o. i)：0.0001–10，优选 0.001–5，更优选 0.01–1；

[0053] 病毒培养温度：33–38℃，优选 36–37℃；

[0054] pH：6.5–8.0，优选 7.2–7.8；

[0055] 溶氧：20%–100%，优选 30%–80%。

[0056] 可采用批培养、流加培养与灌注培养方式培养细胞繁殖病毒，并可适时一次性或连续收获细胞培养毒液。优选流加培养或灌注培养。即在病毒感染猪睾丸细胞或猪肾细胞一段时间后，比如 6–18hr 后，可以采用流加或灌注的连续培养方式往生物反应器中添加病毒维持液，不断收获上清病毒液。收获的病毒液置于  $-15^\circ\text{C}$  以下保存。可以采用各种方法进一步制备疫苗，例如收获病毒液放置于  $2$ – $8^\circ\text{C}$  中，并保存在  $-20^\circ\text{C}$ ，冻融 1 次，过滤、灭活、乳化和后制备疫苗。

[0057] 在本文中，术语“病毒感染复数 MOI (multiplicity of infection)”是指每一个细胞上所感染病毒的数量。MOI = 有感染力的病毒量 / 细胞总量。

[0058] 在本发明的各种实施方式中，所选用的病毒株为生产或研制所述疫苗的常用病毒株，可由疫苗生产厂家或研究机构获得。

[0059] 本发明实现了悬浮培养猪睾丸细胞或猪肾细胞并利用该细胞生产猪瘟疫苗，与现有贴壁培养细胞或微载体悬浮培养生产工艺相比具有如下有益效果：

[0060] (1) 实现猪睾丸细胞及猪肾细胞的全悬浮培养, 无需购置微载体, 极大降低了猪瘟疫苗生产成本;

[0061] (2) 可省去微载体悬浮培养中附加步骤如消化收获细胞等, 从而简化生产过程, 缩短生产时间, 提高生产效率;

[0062] (3) 在生物反应器微载体培养工艺中, 微载体放大工艺具有较大技术难度, 且增加了生产工艺的复杂性。而实现猪睾丸细胞及猪肾细胞悬浮培养, 则细胞的放大培养工艺较为简单, 易于实现且极大简化了生产工艺。

[0063] (4) 生产工艺改进可满足猪瘟疫苗不断增长的市场需求。

[0064] 实施例

[0065] 以下通过实施例和对比例对本发明作进一步具体的说明, 但不作为对本发明的限制。

[0066] 实施例 1 利用基因改造悬浮培养 ST 细胞

[0067] 1) 利用含有 *siat7e* 基因的表达载体稳定转染 ST 细胞;

[0068] (1) 用全长人类 *siat7e* 基因表达载体 (Cat. No. EX-V1581-M03, Genecopoeia) 转染大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。利用无内毒素质粒抽提试剂盒 (QIAGEN) 提取质粒 DNA。

[0069] (2) 第一天: 转接  $5 \times 10^5$  ST 细胞 (中国兽医药品监察所提供) 于 6 孔板中, 孵育 24h 细胞约 90% 汇合度。

[0070] (3) 第二天, 取  $10 \mu\text{g}$  的质粒 DNA 稀释于  $250 \mu\text{L}$  Opti-MEM 培养基中, 混匀;  $50 \mu\text{L}$  脂质体稀释于  $250 \mu\text{L}$  Opti-MEM 培养基中, 轻轻混匀, 静置 15min。

[0071] (4) 将上述制备的溶液混合, 室温静置 20min; 将步骤 (2) 中所述的 6 孔板中各个孔换成无血清无抗生素的 2mL Opti-MEM 培养基; 将上述步骤 (3) 中的混合物  $500 \mu\text{L}$  转入 6 孔板孔中, 轻轻前后晃动混匀。

[0072] (5)  $37^\circ\text{C}$  培养 24h 后将各个孔中的培养基换成完全培养基 DMEM (含 10% 小牛血清),  $37^\circ\text{C}$  于  $\text{CO}_2$  培养箱培养。

[0073] (6) 24h 后, 将其从 6 孔板中传至细胞培养瓶中。

[0074] 2) G418 加压筛选以获得稳定表达细胞株;

[0075] 48h 后, 将细胞培养瓶中的完全培养基更换为 G418 选择性培养基, 以后每 4 天换一次液, 持续培养 14 天, 每天观察, 看是否形成克隆。当有抗性克隆出现后, 按照单细胞分离培养方法 (鄂征, 组织培养和分子细胞学技术, 北京出版社. 100 ~ 107, 2001 年 1 月) 单细胞分离培养得到 5 株单克隆细胞株, 分别扩大培养。

[0076] 3) 验证基因的 stable 转染;

[0077] 利用 RNA 提取试剂盒 (Qiagen 公司) 提取获得单克隆细胞及对照 ST 细胞的总 RNA。根据 *siat7e* 基因序列设计引物如下:

[0078] 正向引物:  $5' - \text{ttactcgccacaagatgctg} - 3'$

[0079] 反向引物:  $5' - \text{gcaccatgccataaacattg} - 3'$

[0080] 利用 superscript 反转录 - 聚合酶式反应试剂盒 (invitrogen 公司) 进行反转录 - 聚合酶式反应检验所获单克隆细胞中 *siat7e* 基因的表达。证明所获单克隆细胞中 *siat7e* 基因均有表达 (如图 1 所示)。

[0081] 将筛选获得并经过检测证明人类 *siat7e* 基因稳定表达的细胞克隆在细胞培养瓶

中（方瓶或摇瓶）驯化悬浮培养。

[0082] 绘制细胞生长曲线；细胞可稳定悬浮培养后，取生长状态良好的细胞，制成细胞悬液；以  $4 \times 10^5$  细胞/mL 将细胞接种于摇瓶中置于  $37^\circ\text{C}$  培养箱进行培养，每天取出细胞进行计数，计算均值。以培养时间为横轴，细胞密度为纵轴（对数），绘制细胞生长曲线（如图 2 所示）。

[0083] 实施例 2-4

[0084] 除了按照表 1 改变实验条件以外，进行与实施例 1 相同的操作。

[0085] 表 1

[0086]

步骤	步骤	参数	实施例 2	实施例 3	实施例 4
步骤 1)	步骤 (1)				
	步骤 (2)	动物细胞种类	ST 细胞	PK 细胞	IBRS-2 细胞
		细胞接种密度 (个/mL)	$1 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
		孵育时间 (h)	20	22	23
		细胞汇合度 (%)	40	60	70
	步骤 (3)	质粒 DNA 重量 ( $\mu\text{g}$ )	1	3	5
		脂质体体积 ( $\mu\text{L}$ )	2	30	20
		静置时间 (min)	15	10	10
	步骤 (4)	静置时间 (min)	10	12	15
		Opti-MEM 体积 ( $\mu\text{L}$ )	0.5	1	1.5
	步骤 (5)	培养时间 (h)	1	10	7
	步骤 (6)				
步骤 2)		更换培养基时间 (h)	24	48	36
		单克隆细胞株数	10	5	12
步骤 3)					

[0087]

[0088] 实施例 5 利用大规模培养基改造悬浮培养的 ST 细胞生产猪瘟疫苗的方法

[0089] 将经过悬浮培养验证细胞 (ST 细胞, 实施例 1) 取一部分冻存, 另一部分在细胞培养瓶中继续培养。当细胞在细胞培养瓶中生长形态正常、活力大于 90% 时接种至摇瓶中。在摇瓶中扩增培养细胞, 按  $3 \times 10^5$  细胞/mL 细胞密度接种至 650L 生物反应器 (北京清大天一科技有限公司) 中, 其中细胞培养条件如下:

[0090] 工作体积: 300L

[0091] 细胞培养温度:  $37^\circ\text{C}$

[0092] pH:7.0

[0093] 溶氧:40% ;

[0094] 细胞培养液:改良 MEM 细胞培养基 MD611(北京清大天一科技有限公司)+5%血清

[0095] 培养 4 天,当细胞密度为  $3 \times 10^6$  细胞/mL 时,将细胞培养液更换为维持培养液,按病毒感染复数 MOI 为 0.1 的量接种猪瘟病毒:中国兔化弱毒疫苗株(CSFV C 株)。

[0096] 病毒培养条件:温度:37℃;pH:7.4;溶氧:40%。

[0097] 培养 3 天后收获所得疫苗,检测病毒滴度  $1gTCID_{50}/mL$  为 8.9。

[0098] 实施例 6~9、比较例 1

[0099] 除了按照表 2 改变实验条件以外,进行与实施例 5 相同的操作,并接种不同疫苗,疫苗的滴度结果一并示于表 2。其中比较例 1 为未经转染的对照 ST 细胞,进行生物反应器微载体悬浮培养。

[0100] 表 2

[0101]

	参数	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	比较例 1
细胞培养条件	动物细胞种类	ST 细胞	PK 细胞	PK 细胞	IBRS-2 细胞	ST 细胞
	细胞接种密度 (个/mL)	$6 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$3 \times 10^5$
	工作体积(L)	600	70	200	700	300
	温度(℃)	38	36	33	36.5	37
	pH 值	6.8	6.0	7.5	7.2	7.0
	溶氧浓度(%)	80	30	100	20	40
	微载体	/	/	/	/	Cytodex-1
	微载体用量(g/L)	/	/	/	/	10
病毒培养条件	病毒感染复数 (M.O.I)	0.001	1	5	0.01	0.1
	温度(℃)	38	36	33	36.5	37
	pH 值	8.0	6.5	7.2	7.8	7.4
	溶氧浓度(%)	80	30	100	20	40
	病毒滴度 ( $1gTCID_{50}/mL$ )	8.3	9.1	9.3	8.8	8.6

[0102] 通过上述实施例和比较例可以看出,实施例和比较例得到的病毒滴度相近,从而说明,通过基因改造得到的适于悬浮培养的猪睾丸细胞或猪肾细胞,应用于疫苗的大规模培养,在节约生产成本、提高生产效率以及简化生产步骤的同时,保持了对病毒的敏感性。

---

本发明在悬浮培养猪睾丸细胞或猪肾细胞大规模生产疫苗方面具有很高的应用价值。

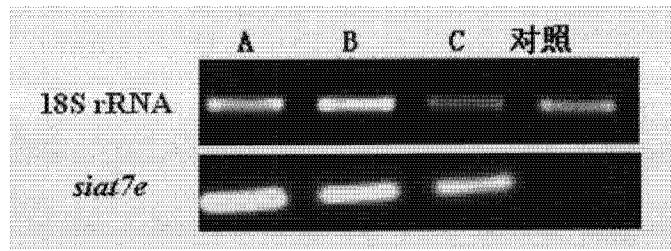


图 1

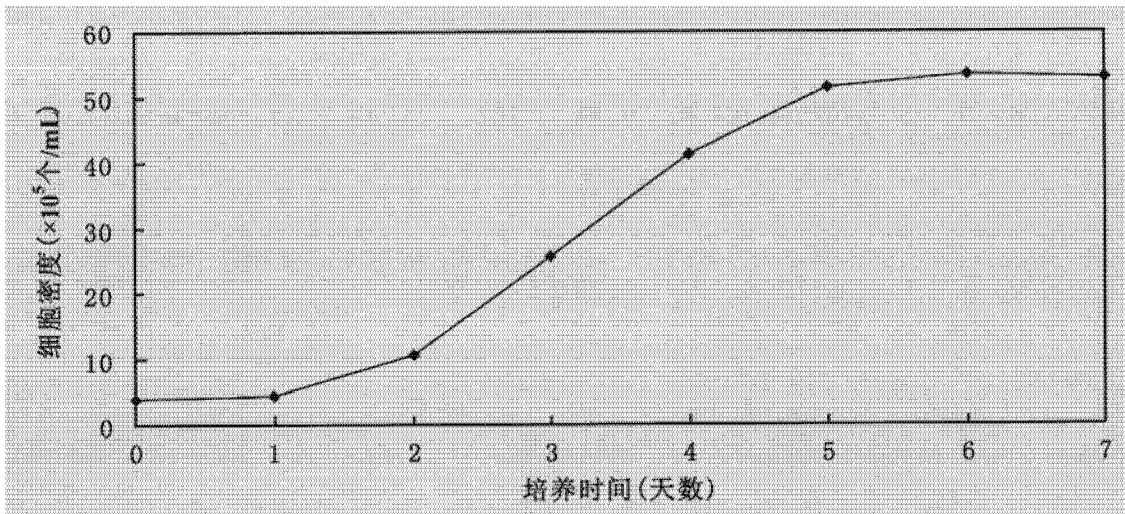


图 2

专利名称(译)	悬浮培养传代细胞及利用其生产猪瘟疫苗的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102453698A</a>	公开(公告)日	2012-05-16
申请号	CN201010517551.7	申请日	2010-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	北京清大天一科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京清大天一科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京清大天一科技有限公司		
[标]发明人	王建超 陈文庆 张韧		
发明人	王建超 陈文庆 张韧		
IPC分类号	C12N5/10 C12Q1/68 G01N33/53 A61K39/12 A61P31/14		
代理人(译)	钟晶		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种悬浮培养传代细胞的方法，其包括如下步骤：(1)利用包含能减弱细胞粘附性能基因序列的表达载体稳定转染猪睾丸细胞或猪肾细胞；(2)筛选并分离稳定转染细胞克隆；(3)检测稳定转染细胞克隆中的基因表达；(4)稳定转染细胞克隆的悬浮培养。本发明进一步涉及利用所述悬浮培养的猪睾丸细胞或猪肾细胞生产猪瘟疫苗的方法。

