

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102453700 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 16

(21) 申请号 201010517566. 3

(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 张韧 陈文庆 王建超 高飞

(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)

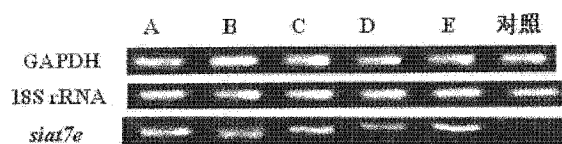
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

悬浮培养 MDCK 细胞及利用其生产病毒疫苗的方法

(57) 摘要

本发明提供一种悬浮培养 MDCK 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 MDCK 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 MDCK 细胞生产病毒疫苗的方法。



1. 一种悬浮培养 MDCK 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 MDCK 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 MDCK 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乙基-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: 1×10^5 - 1×10^6 ;

细胞培养温度:33-40°C;

pH 值:6.0-7.8;

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、搅拌瓶、生物反应器;所述细胞接种密度为 2×10^5 - 5×10^5 ;所述细胞培养温度为 36-38°C;所述 pH 为 6.8-7.8;所述溶氧为 20%-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 MDCK 细胞生产病毒疫苗的方法。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中,所述的病毒选自流感病毒,RSV,副流感病毒 1、2 和 3,呼吸道合胞病毒,乳多空病毒,水泡性口膜炎病毒,痘苗病毒,柯萨奇病毒,呼肠弧病毒,细小病毒,腺病毒,脊髓灰质炎病毒,麻疹病毒,狂犬病病毒和疱疹病毒。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述的病毒为流感病毒。

12. 根据权利要求 9-11 中任意一项所述的方法,其中,生产病毒疫苗的条件为:

用病毒感染 MDCK 细胞;

病毒感染复数:0.0001-10;

病毒培养温度:30-37°C;

pH 值:6.5-8.0;

溶氧 :20% -100%。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中,所述 MDCK 细胞的培养密度至少为 1×10^6 ;所述病毒感染复数为 0.001-5;所述病毒培养温度为 30-35°C;所述 pH 为 7.2-7.6;所述溶氧为 20% -80%。

悬浮培养 MDCK 细胞及利用其生产病毒疫苗的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医药生物领域,具体涉及悬浮培养 MDCK 细胞的方法,进一步涉及利用该细胞生产病毒疫苗的方法。

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 CO₂ 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] MDCK 细胞(Mardin Darby canine kidney cells)指 Mardin Darby 犬肾细胞。MDCK 细胞系由 S. H. Madin 和 N. B. Darby 于 1958 年从成体考克斯班尼犬(cocker spaniel)的肾脏组织分离培育而建立,最初的 MDCK 细胞系(NBL-2)保藏在 ATCC(目录编号 ATCC CCL 34)。MDCK 细胞系可以用于多种病毒的繁殖和纯化,如:流感病毒,RSV,副流感病毒 1、2 和 3,呼吸道合胞病毒,乳多空病毒,水泡性口膜炎病毒,痘苗病毒,柯萨奇病毒,呼肠弧病毒,细小病毒,腺病毒,骨髓灰质炎病毒,麻疹病毒,狂犬病病毒,和疱疹病毒。尤其可用于流感病毒增殖。从 MDCK 用于生产兽用疫苗的历史来看,它也可以生产安全有效的人疫苗,且具有很高的产毒能力。所以开展 MDCK 大规模生产和制备疫苗的研究具有重要意义。

[0004] 但是,由于 MDCK 细胞无法进行悬浮培养,限制了其在疫苗生产中的使用。MDCK 细胞不同于中国仓鼠卵巢细胞、非洲绿猴肾细胞、转染腺病毒 E1A 基因的人肾上皮细胞系等可以很容易在驯化过程中失去粘附性能的贴壁细胞系,MDCK 细胞的紧密连接蛋白的形成和弥合与血清无太大关系,黏附能力受钙镁离子的影响不大,而且 MDCK 细胞培养过程中存在很严重的“失巢凋亡”现象(Anoikis,是一种细胞程序死亡形式,是由于细胞与细胞外基质和其他细胞脱离接触而诱发的,即细胞一旦不黏附其它基质就会发生凋亡),故而用传统的悬浮驯化手段-有血清和无血清培养反复适应的方法很难得到稳定的 MDCK 悬浮细胞。

[0005] 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. *MetabEng* 9:241-251.)。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于解决现有技术中 MDCK 细胞培养方法中存在的问题,提供一种悬浮培养 MDCK 细胞的方法。

[0007] 本发明的悬浮培养 MDCK 细胞的方法包括如下步骤:

[0008] (1) 利用包含能减弱细胞粘附性能基因序列表达载体稳定转染 MDCK 细胞;

[0009] (2) 筛选并分离稳定转染细胞克隆;

[0010] (3) 检测稳定转染细胞克隆中的基因表达;

[0011] (4) 稳定转染细胞克隆的悬浮培养。

[0012] 本发明进一步的目的是提供一种大规模悬浮培养 MDCK 细胞以生产病毒疫苗的方法。

附图说明

[0013] 图 1 表示实施例 1 中稳定转染 MDCK 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 MDCK 细胞。A、B、C、D 和 E 分别为分离到的稳定转染细胞克隆。RT-PCR 结果显示, A、B、C、D 和 E 五个稳定转染细胞克隆中均有 *siat7e* 基因的表达。

[0014] 图 2 表示实施例 1 中稳定转染 MDCK 细胞克隆的细胞生长曲线。结果显示稳定转染 MDCK 细胞克隆的生长特性正常。

具体实施方式

[0015] 通过对 MDCK 细胞基因组进行基因改造,获得适于悬浮培养的 MDCK 细胞,结合细胞培养工艺,实现通过大规模悬浮培养 MDCK 细胞以生产病毒疫苗。

[0016] 本发明的悬浮培养 MDCK 细胞的方法包括如下步骤:

[0017] (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 MDCK 细胞;

[0018] (2) 筛选并分离稳定转染细胞克隆;

[0019] (3) 检测稳定转染细胞克隆中的基因表达;

[0020] (4) 稳定转染细胞克隆的悬浮培养。

[0021] 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。

[0022] 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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 所述的步骤(1)进一步包括如下步骤:

[0026] (a) 用全长人类 *siat7e* 基因表达载体转染大肠杆菌 DH5 α 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;

[0027] (b) 转接 1×10^5 - 5×10^5 MDCK 细胞于细胞培养板中,孵育细胞 20-24h,约 40-90% 汇合度;所述 MDCK 细胞可以是例如商品名为 ATCC, Cat. No. CCL-34 的市售商品;

[0028] (c) 取 1-10 μ g 的质粒 DNA 稀释于 250 μ L 转染培养基(如 Opti-MEM 培养基)中,混匀;2-50 μ L 脂质体稀释于 250 μ L 转染培养基中,轻轻混匀,静置 5-15min;

[0029] (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;

[0030] (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;

[0031] (f) 24h 后,将细胞从细胞培养板中传至细胞培养瓶中。

[0032] 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。

[0033] 所述的步骤(2)进一步包括如下步骤:

[0034] 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。

[0035] 所述的步骤(3)进一步包括如下步骤:

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 所述的步骤(4)的悬浮培养的条件为:

[0039] 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;

[0040] 细胞接种密度: 1×10^5 - 1×10^6 ,优选 2×10^5 - 5×10^5 ;

[0041] 细胞培养温度:33-40℃,优选 36-38℃;

[0042] pH 值:6.0-7.8,优选 6.8-7.4;

[0043] 溶氧浓度:20%-100%,优选 20%-80%。

[0044] 细胞培养方式可为批培养、流加培养与灌注培养。

[0045] 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。

[0046] 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 MDCK 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。

[0047] 本发明还涉及悬浮培养 MDCK 细胞以生产病毒疫苗的方法。可在本发明的 MDCK 细胞中生长的病毒包括所有对 MDCK 细胞敏感的病毒,其包括但不限于:流感病毒,RSV,副流感病毒 1、2 和 3,呼吸道合胞病毒,乳多空病毒,水泡性口膜炎病毒,痘苗病毒,柯萨奇病毒,呼肠弧病毒,细小病毒,腺病毒,骨髓灰质炎病毒,麻疹病毒,狂犬病病毒疱疹病毒。优选为流感病毒。所述流感病毒包括人、马、猪或者禽类株。

[0048] 大规模悬浮培养稳定转染的 MDCK 细胞,待 MDCK 细胞密度增殖至 1×10^6 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 MDCK 细胞。其条件如下:

[0049] 用病毒感染增殖的 MDCK 细胞(细胞密度为至少约 1×10^6)

[0050] 病毒感染复数(m. o. i):0.0001-10,优选 0.001-5,更优选 0.002-2;

[0051] 病毒培养温度:30-37℃,优选 30-35℃;

[0052] pH:6.5-8.0,优选 7.2-7.6;

[0053] 溶氧:20%-100%,优选 20%-80%。

[0054] 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 MDCK 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℃ 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℃ 中,并保存在 -20℃,冻融 1 次,过滤、灭活、乳化后制备疫苗。

[0055] 由于血清对流感病毒在细胞上的增殖具有抑制作用,为了提高病毒滴度,应严格控制维持培养液中血清的含量,优选使用无血清维持培养液。同时,由于在流感病毒复制过程中需要胰蛋白酶,以使不具有感染性的非裂解型血凝素变为具感染性血凝素,故优选在维持培养液中加入适量胰蛋白酶。

[0056] 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。 $MOI = \text{有感染力的病毒量} / \text{细胞总量}$ 。

[0057] 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。

[0058] 本发明实现了悬浮培养 MDCK 细胞并利用该细胞生产对 MDCK 细胞敏感的病毒疫苗如流感疫苗等,与现有鸡胚培养或贴壁培养细胞生产工艺相比具有如下有益效果:

[0059] (1) 易于进行质量控制和保证,降低疫苗安全隐患;

[0060] (2) 易于实现生产过程自动化,生产效率高,产量高;

[0061] (3) 减少了疫苗生产后期纯化度,提高疫苗安全性;

[0062] (4) 生产工艺改进可满足病毒疫苗需求,例如流感大流行和突发性流感爆发时对流感疫苗的需求。

[0063] (5) 实现 MDCK 细胞的全悬浮培养,无需购置微载体,极大降低了疫苗生产成本;

[0064] (6) 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 MDCK 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。

[0065] 实施例

[0066] 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。

[0067] 实施例 1 利用基因改造悬浮培养 MDCK 细胞

[0068] 1) 利用含有 *siat7e* 基因的表达载体稳定转染 MDCK 细胞;

[0069] (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 α 感受态细胞。利用无内毒素质粒抽提试剂盒 (QIAGEN) 提取质粒 DNA。

[0070] (2) 第一天:转接 4×10^5 MDCK 细胞 (ATCC, Cat. No. CCL-34) 于 6 孔板中,孵育 24h 细胞约 80% 汇合度。

[0071] (3) 第二天,取 $4.0 \mu\text{g}$ 的质粒 DNA 稀释于 $250 \mu\text{L}$ Opti-MEM 培养基中,混匀; $10 \mu\text{L}$ 脂质体稀释于 $250 \mu\text{L}$ Opti-MEM 培养基中,轻轻混匀,静置 5min。

[0072] (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。

[0073] (5) 37°C 培养 5h 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°C 于 CO_2 培养箱培养。

[0074] (6) 24h 后,将其从 6 孔板中传至细胞培养瓶中。

[0075] 2) G418 加压筛选以获得稳定表达细胞株;

[0076] 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 3 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。

[0077] 3) 验证基因的 stable 转染;

[0078] 利用 RNA 提取试剂盒 (Qiagen 公司) 提取获得单克隆细胞及对照 MDCK 细胞的总 RNA。根据 *siat7e* 基因序列设计引物如下:

[0079] 正向引物: $5' - \text{ttactcgccacaagatgctg} - 3'$

[0080] 反向引物 :5' -gcaccatgccataaacattg-3'

[0081] 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)。

[0082] 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。

[0083] 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 2×10^5 细胞 /mL 将细胞接种于摇瓶中置于 37°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)。

[0084] 实施例 2-4

[0085] 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。

[0086] 表 1

[0087]

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)	细胞接种密度 (个/mL)	1×10^5	5×10^5	3×10^5
		孵育时间 (h)	20	24	22
		细胞汇合度 (%)	40	90	60
	步骤 (3)	质粒 DNA 重量 (μg)	1.0	10	6.0
		脂质体体积 (μL)	2	50	30
		静置时间 (min)	15	5	10
	步骤 (4)	静置时间 (min)	10	20	15
		Opti-MEM 体积 (μL)	0.5	2	1.5
	步骤 (5)	培养时间 (h)	1	24	12
步骤 (6)					
步骤 2)		更换培养基时间 (h)	24	48	36
		单克隆细胞株数	11	8	6
步骤 3)					

[0088] 实施例 5 利用大规模培养基改造悬浮培养的 MDCK 细胞生产流感疫苗的方法

[0089] 将经过悬浮培养验证细胞取一部分冻存,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。在摇瓶中扩增培养细胞,按 2×10^5 细胞 /mL 细胞密度接种至 100L 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 :50L

[0091] 细胞培养温度 :37℃

[0092] pH :7.0

[0093] 溶氧 :60% ;

[0094] 细胞培养液 :改良 MEM 细胞培养基 (Cat. No. 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 1×10^6 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 的量接种甲型流感病毒株 A/PR/8/34(H1N1)

[0096] 病毒培养条件 :温度 :35℃ ;pH :7.6 ;溶氧 :60%。

[0097] 培养 3 天后收获所得疫苗,检测病毒滴度 $TCID_{50}$ 为 8.7。

[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 MDCK 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	细胞接种密度 (个/mL)	5×10^5	1×10^5	1×10^6	3×10^5	2×10^5
	工作体积 (L)	400	200	800	80	50
	温度(℃)	38	33	38	36	37
	pH 值	6.8	7.8	7.4	6.0	7.0
	溶氧浓度(%)	80	100	20	20	60
	微载体	/	/	/	/	Cytodex-1
	微载体用量 (g/L)	/	/	/	/	8
病 毒	病毒感染复数 (M.O.I)	2	5	0.002	0.001	0.1

[0102]

培 养 条 件	病毒	乙型流感病毒 株 B/Shangdong/7/ 97	禽流感 H9 亚型 SD696s 株	禽流感 H5N1 亚型 Rel 株	甲型流感病毒株 A/PR8/34(H1N1)	甲型流感病毒株 A/PR8/34(H1N1)
	温度(°C)	35	30	34	32	35
	pH 值	8.0	7.2	7.6	6.5	7.6
	溶氧浓度(%)	80	100	20	20	60
	病毒滴度 (lgTCID ₅₀ /mL)	9.2	9.4	7.8	7.9	8.3

[0103] 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 MDCK 细胞,应用于病毒疫苗的大规模培养,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 MDCK 细胞大规模生产病毒疫苗方面具有很高的应用价值。

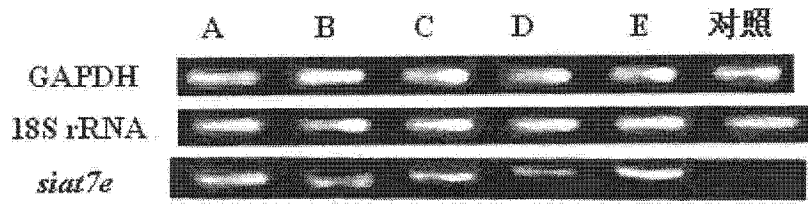


图 1

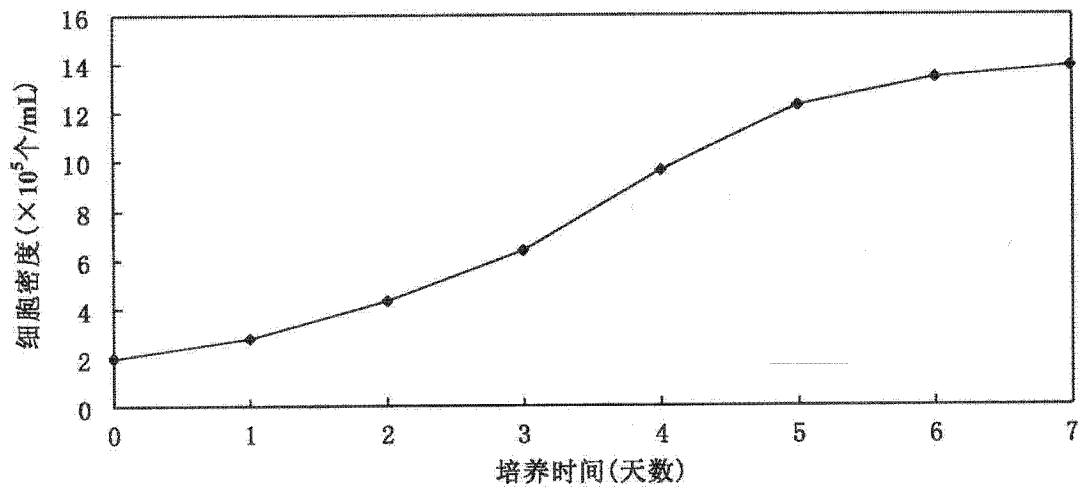


图 2

专利名称(译)	悬浮培养MDCK细胞及利用其生产病毒疫苗的方法		
公开(公告)号	CN102453700A	公开(公告)日	2012-05-16
申请号	CN201010517566.3	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	张韧 陈文庆 王建超 高飞		
发明人	张韧 陈文庆 王建超 高飞		
IPC分类号	C12N5/10 C12Q1/68 G01N33/53 A61K39/12		
CPC分类号	Y02A50/466		
代理人(译)	钟晶		
外部链接	SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种悬浮培养MDCK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MDCK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MDCK细胞生产病毒疫苗的方法。

