

细胞面积与风疹单次病毒收获液病毒滴度关系的探讨

解通, 郑仲, 李宏强, 汪立, 张思远, 公殿力

北京民海生物科技有限公司, 北京

收稿日期: 2021年10月19日; 录用日期: 2021年11月25日; 发布日期: 2021年12月2日

摘要

目的: 探讨细胞面积与风疹单次病毒收获液病毒滴度的关系。方法: 使用不同细胞面积接种风疹病毒, 制备风疹单次病毒收获液, 进行病毒滴定。结果: 不同细胞面积制备的风疹单次病毒收获液病毒滴度没有差异。结论: 在一定范围内, 细胞面积与风疹病毒滴度不存在正比关系。

关键词

细胞面积, 病毒滴度, 风疹单次病毒收获液

Study on the Relationship between Cell Area and Virus Titer of Rubella Virus Single Harvest Fluid

Tong Xie, Zhong Zheng, Hongqiang Li, Li Wang, Siyuan Zhang, Dianli Gong

Beijing Minhai Biotechnology Co., Ltd., Beijing

Received: Oct. 19th, 2021; accepted: Nov. 25th, 2021; published: Dec. 2nd, 2021

Abstract

Objective: To investigate the relationship between cell area and virus titer of rubella virus single harvest fluid. **Method:** Rubella virus was inoculated in different cell areas to prepare rubella virus single harvest fluid for virus titration. **Result:** There was no difference in virus titer of rubella virus single harvest fluid from different cell areas. **Conclusion:** In a certain range, there was no direct correlation between cell area and rubella virus titer.

Keywords

Cell Area, Virus Titer, Rubella Virus Single Harvest Fluid

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

制备病毒类疫苗, 目前普遍认为单个培养容器内细胞面积越大, 病毒滴度越高, 因此, 发明了各种扩大细胞培养面积的容器及培养方法。从静止培养、旋转培养、细胞工厂培养到反应器培养等。本试验数据表明: 单个培养容器内细胞面积在一定范围内, 并不是面积越大, 病毒滴度就越高, 它们之间不存在正比关系, 本文就此做一报道。

2. 材料与方法

风疹单次病毒收获液制备分为 MRC-5 细胞复苏、传代培养、洗换、接种病毒、单次病毒收获液收获等步骤。合格的单次病毒收获液配制原液、半成品, 半成品分装、冻干, 制备疫苗成品。通过使用不同细胞培养容器、不同工艺制备风疹单次病毒收获液, 来说明不同细胞面积培养病毒对病毒滴度的影响。

2.1. MRC-5 细胞和风疹病毒 RA27/3 株

购自美国 ATCC。

2.2. 复苏液和培养液

复苏液为 20% 新生牛血清 MEM 液, NaHCO_3 调至适宜 pH 值, 用于细胞复苏。培养液为 10% 新生牛血清 MEM 液, NaHCO_3 调至适宜 pH 值, 用于细胞传代培养。新生牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司。MEM 购自上海源培生物科技股份有限公司。 NaHCO_3 购自自贡鸿鹤制药有限责任公司。

2.3. 维持液

用于病毒培养。199 培养基溶液, NaHCO_3 调至适宜 pH 值, 用于静止培养与旋转培养的比较。MEM 液, NaHCO_3 调至适宜 pH 值, 用于旋转培养与细胞工厂培养的比较。199 培养基和 MEM 培养基均购自上海源培生物科技股份有限公司。

2.4. 培养瓶

5 L 瓶静止培养细胞面积为 600 cm^2 , 5 L 瓶旋转培养细胞面积为 1500 cm^2 。5 L 刻度血清瓶购自四川蜀玻集团有限责任公司。

2.5. 细胞工厂

10 层细胞工厂细胞面积为 6360 cm^2 。10 层细胞工厂购自康宁公司。

2.6. MRC-5 细胞复苏、传代培养

将 26 代细胞复苏, 按 1:2 或 1:4 的比例传代至 33 代, 分别接种 5 L 瓶(进行静止培养和旋转培养)和

10 层细胞工厂。静止培养是将 5 L 培养瓶放置到台面上, 于 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 进行培养, 让细胞贴到瓶壁上生长, 细胞在有培养液的瓶壁上生长, 其面积为 600 cm^2 。旋转培养是将 5 L 培养瓶放置转瓶机上, 于 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 进行培养。培养瓶随着转瓶机的运行而旋转, 因此, 称为转瓶, 细胞就贴到瓶壁上生长, 其面积为 1500 cm^2 。细胞工厂培养是将 10 层细胞工厂, 放置到 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 进行静止培养, 细胞贴到向上的面上生长, 其面积为 6360 cm^2 。

2.7. 5 L 瓶静止培养与旋转培养的比较

细胞长成致密单层后, 洗换, 洗去牛血清, 接种风疹病毒。5 L 瓶接种病毒后, 换入 199 维持液, 进行静止培养与旋转培养(转瓶)。两种方法每瓶液量均为 1500 mL, 放置 $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养。定期观察细胞, 根据细胞状态及病变形态, 确定病毒液收获时间。

2.8. 5 L 瓶旋转培养与 10 层细胞工厂培养的比较

细胞长成致密单层后, 洗换, 洗去牛血清, 接种风疹病毒。5 L 转瓶(旋转培养)与 10 层细胞工厂接种病毒后, 换入 MEM 维持液, 液量均为 2000 mL, 放置 $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养。定期观察细胞, 根据细胞状态及病变形态, 确定病毒液收获时间。

2.9. 单次病毒收获液收获

一般病毒培养 6、2、1 天分别进行收获, 第一、二次收获后, 换入新的维持液继续培养。将风疹病毒液加入稳定剂, 即为单次病毒收获液, 混合均匀, 取样, 进行病毒滴定。

5 L 瓶静止培养与旋转培养的比较试验, 两种方法单次病毒收获液收获时, 病毒液与稳定剂的比例均为 4:1, 即每个 5 L 瓶每次可以收获单次病毒收获液 1875 mL。

5 L 瓶旋转培养与 10 层细胞工厂培养的比较试验, 两种方法单次病毒收获液收获时, 病毒液与稳定剂的比例均为 4:1, 即每个 5 L 转瓶和每个 10 层细胞工厂每次可以收获单次病毒收获液 2500 mL。

2.10. 风疹单次病毒收获液病毒滴定

采用微量细胞病变法[1]。

2.11. 统计学方法

资料的统计分析由 Excel 统计软件完成。

3. 结果

3.1. 5 L 瓶静止培养与旋转培养的比较

5 L 瓶静止培养与旋转培养制备风疹单次病毒收获液, 病毒滴度结果“见表 1”。

Table 1. Statistics of single virus harvest fluid

表 1. 单次病毒收获液统计

批次	静止培养(IgCCID ₅₀ /ml)	旋转培养(IgCCID ₅₀ /ml)
1	5.2	5.5
2	5.1	5.4
3	5.0	5.3
4	5.3	5.6

Continued

5	5.3	5.5
6	5.7	5.4
7		5.3
8		5.1
9		5.0
10		5.1
11		5.5
12		5.5
13		5.1
14		5.3
15		5.0
16		5.0
17		5.2
18		5.3
平均	5.3 ± 0.2	5.3 ± 0.2

由表 1 可见，两种方法制备的单次病毒收获液病毒滴度相同，经统计学分析，P 值为 0.867，>0.05，差别无显著性。

3.2. 5 L 瓶旋转培养与 10 层细胞工厂培养的比较

5 L 瓶旋转培养与 10 层细胞工厂培养制备风疹单次病毒收获液，病毒滴度结果“见表 2”。

Table 2. Statistics of single virus harvest fluid

表 2. 单次病毒收获液统计

批次	静止培养(lgCCID ₅₀ /ml)	旋转培养(lgCCID ₅₀ /ml)
1	6.1	5.5
2	6.2	5.6
3	5.3	5.4
4	5.7	5.6
5	5.3	5.5
6	5.6	5.5
7	6.0	5.7
8	6.0	5.6
9	5.5	5.6
10	5.2	5.7
11	5.3	5.6
12	5.5	5.4
13	5.7	5.7

Continued

14	5.8	5.6
15	5.4	5.3
16	5.5	5.6
17	5.6	5.6
18	5.0	5.3
平均	5.6 ± 0.2	5.5 ± 0.1

由表2可见,两种方法制备的单次病毒收获液病毒滴度相差不大,经统计学分析,P值为0.551,>0.05,差别无显著性,即病毒滴度相同。

4. 讨论

病毒类疫苗生产使用细胞培养病毒,为了扩大产量,往往采取增加细胞面积的方法。增加细胞面积的方法,一个是增加培养容器的数量,一个是增加单个容器的细胞面积来实现。虽然增加培养容器的数量可以提高疫苗产量,但是此方法有一定的局限性,受制于厂房的规模,培养容器不可能无限增加,因此,又发明了增加容器培养面积的方法。将培养瓶从2 L、3 L发展到10 L、15 L。为了进一步增加单个容器的细胞面积,病毒培养从静止培养、旋转培养、细胞工厂培养到反应器培养[2]-[7]。静止培养、旋转培养、细胞工厂培养属于一个级别的,细胞面积相差不是特别悬殊,而反应器培养细胞面积与其他培养方法相差就不是一个级别了,在此不做探讨。

风疹病毒培养,5 L瓶静止培养细胞面积为600 cm²,5 L瓶旋转培养细胞面积为1500 cm²,10层细胞工厂培养细胞面积为6360 cm²。5 L瓶旋转培养细胞面积是静止培养的2.5倍,病毒滴度没有差别;10层细胞工厂细胞面积是5 L瓶旋转培养的4倍多,病毒滴度也没有差别,由此可以推断10层细胞工厂培养与5 L瓶静止培养,病毒滴度没有差别。10层细胞工厂培养细胞面积是5 L瓶静止培养的10倍多,因此,单个培养容器细胞面积相差在10倍以内,与病毒滴度不存在正比关系,即不是细胞面积越大,病毒滴度就越高。10 L瓶旋转培养细胞面积为2130 cm²,是5 L瓶旋转培养细胞面积的1.4倍。本公司曾经使用10 L瓶旋转培养制备风疹单次病毒收获液,后来改为5 L瓶旋转培养制备风疹单次病毒收获液,多年生产中,病毒滴度及产量均没有降低,也验证了上述试验结果[8]。

单个培养容器细胞面积相差10倍以内,细胞面积与病毒滴度不成正比关系的原因,有待于探讨。根据此试验结果,可以对现有病毒培养方法进行改良,既可以节省细胞,减少操作时间,降低污染风险,又可以增加单产,节约成本,提高效率。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020年版三部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 177.
- [2] 徐文青, 陈列胜, 朵煜涛, 等. 疫苗转瓶培养多次收液生产工艺的探索[J]. 中国生物制品学杂志, 1997, 10(1): 35-37.
- [3] 闫磊, 李海燕, 赵海波, 等. 麻疹减毒活疫苗细胞工厂多次收获工艺探索[J]. 国际生物制品学杂志, 2021, 44(2): 79-82.
- [4] 王亮, 杨月莲, 周锋, 等. 细胞工厂在水痘疫苗生产中的应用[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(10): 1178-1181.
- [5] 朱明媛, 刘静, 李艳玲, 等. 犬细小病毒 YA-16-C66 株纸片载体培养工艺优化及其与转瓶培养工艺的比较分析[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(12): 49-55.
- [6] 刘文凯, 王家敏, 乔自林. 生物反应器培养工艺的狂犬病毒疫苗研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医, 2020, 50(10): 9-11.

-
- [7] 李政蓉, 金宏丽, 黄培, 等. BHK-21 细胞悬浮培养狂犬病病毒(rCVS-11-dG 株)工艺的建立及病毒免疫原性评价[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(2): 129-134.
- [8] 公殿力, 苍天乐, 林新旭, 等. 风疹单次病毒收获液生产工艺的改进[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(3): 306.