



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105838683 A

(43)申请公布日 2016.08.10

(21)申请号 201610330193.6

(22)申请日 2016.05.18

(71)申请人 山东省滨州畜牧兽医研究院

地址 256600 山东省滨州市经济开发区黄
河二路169号

(72)发明人 庄金秋 梅建国 沈志强

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51)Int.Cl.

C12N 7/00(2006.01)

C12N 5/07(2010.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种应用新型细胞微载体增殖水貂犬瘟热
病毒的方法

(57)摘要

本发明公开了一种应用新型细胞微载体增殖水貂犬瘟热病毒的方法,通过应用新型微载体和大规模高密度细胞悬浮培养技术实现水貂犬瘟热病毒高效增殖,本发明具有细胞密度大、病毒滴度高、生产效率高、过程可控性强和产品质量均一稳定等优点,克服了传统转瓶生产工艺的产品批间差大、抗原含量低和生产效率低等诸多不足。

1. 一种应用新型细胞微载体增殖水貂犬瘟热病毒(CDV)的方法,其特征在于:包括以下步骤:

A)用Flask细胞培养瓶和3L转瓶逐级放大培养Vero或DF1细胞,当转瓶细胞数量达到所要求时,无菌收集转瓶细胞作为种子细胞。

b)选择新型Cephodex细胞培养微载体为细胞贴附生长的载体。按10g/L的用量,根据培养体积称取一定量的Cephodex微载体放入PBS中,用玻璃棒充分搅拌,使微载体于PBS中分散混悬。

c)将混悬好的微载体注入反应器中,安装完好后将罐体置于121℃高压蒸汽灭菌30min,待温度降至80℃后,以底部通气模式向罐体内以100cc/min的流量持续通气空气,开启搅拌桨,并以95rpm的速率连续搅拌,罐体温度设为37℃,静置24小时后,校正DO数据,向反应器中加入少量细胞生长液37℃孵育24-72h进行无菌检验。

d)将收集好的种子细胞按 3×10^5 cells/ML的密度接种接种入反应器罐体内并与微载体充分混悬。而后每搅拌2~3min,静置30-60min,持续6-8h,然后以能使微载体悬浮的最小搅拌速度连续搅拌培养。

e)细胞反应器内培养约72h,取样观察细胞生长状态,待细胞在微载体上汇合度达90%以上,且通过测定细胞糖耗水平,确定细胞密度达到最大,按M.O.I约为0.05接种入CDV病毒悬液。

f)接种病毒8h后将培养温度降至36℃。24h后每8~24h取样显微镜观察和培养液测糖含量,待微载体上的细胞80%脱落,细胞糖耗接近0时,停止搅拌,沉降微载体,收获上清。

2. 根据权利要求1所述的一种运用细胞微载体增殖水貂犬瘟热病毒(CDV)的方法,其特征在于:将f步骤残留在微载体中病毒液反复冻融三次,收集上清。

3. 根据权利要求1所述的一种运用细胞微载体增殖水貂犬瘟热病毒(CDV)的方法,其特征在于:所述应用的步骤为:将所述微载体灭菌后,去除PBS和检验液,注入含有体积百分浓度(v/v%)8-10%新生牛血清的细胞培养液和待培养细胞,进行细胞培养;优选地,在培养48~120小时后,更换成含2~5%新生牛血清的培养基继续培养或接种病毒。

4. 根据权利要求4或5所述的一种运用细胞微载体增殖水貂犬瘟热病毒(CDV)的方法,其特征在于:所述微载体的浓度为3-20g/L,所述待培养细胞的接种密度为 $3-5 \times 10^5$ cell/ml。

5. 根据权利要求6所述的一种运用细胞微载体增殖水貂犬瘟热病毒(CDV)的方法,其特征在于:所述微载体与所述待培养细胞的比例为15-30个细胞/1个微载体。

6. 根据权利要求1所述的一种运用细胞微载体增殖水貂犬瘟热病毒(CDV)的方法,其特征在于:所述细胞为ST细胞、CHO细胞、MDCK细胞、Vero细胞、Marc145细胞、BHK21细胞、MRC-5细胞和DF1细胞。

7. 根据权利要求1所述的一种运用细胞微载体增殖水貂犬瘟热病毒(CDV)的方法,其特征在于:所述微载体在细胞培养中使用时无需对细胞培养容器进行预先硅化处理。

一种应用新型细胞微载体增殖水貂犬瘟热病毒的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种增殖方法,尤其涉及一种应用新型细胞微载体增殖水貂犬瘟热病毒的方法。

背景技术

[0002] 传统转瓶生产工艺的产品批间差大、抗原含量低和生产效率低等诸多不足。同时,本发明使用的新型细胞培养微载体较传统微载体产品,其使用方法极为简便,细胞培养性能稳定可靠,工艺放大容易,极大地提高了工作效率且降低了生产成本。

发明内容

[0003] 本发明的目的就在于为了解决上述问题而提供一种应用新型细胞微载体增殖水貂犬瘟热病毒的方法。

[0004] 本发明通过以下技术方案来实现上述目的:

[0005] 本发明包括以下步骤:

[0006] A)用F1ask细胞培养瓶和3L转瓶逐级放大培养Vero或DF1细胞,当转瓶细胞数量达到所要求时,无菌收集转瓶细胞作为种子细胞。

[0007] b)选择新型Cephodex细胞培养微载体为细胞贴附生长的载体。按10g/L的用量,根据培养体积称取一定量的Cephodex微载体放入PBS中,用玻璃棒充分搅拌,使微载体于PBS中分散混悬。

[0008] c)将混悬好的微载体注入反应器中,安装完好后将罐体置于121℃高压蒸汽灭菌30min,待温度降至80℃后,以底部通气模式向罐体内以100cc/min的流量持续通气空气,开启搅拌桨,并以95rpm的速率连续搅拌,罐体温度设为37℃,静置24小时后,校正DO数据,向反应器中加入少量细胞生长液37℃孵育24-72h 进行无菌检验。

[0009] d)细胞微载体悬浮培养:将收集好的种子细胞按 3×10^5 cells/ML的密度接种接种入反应器罐体内并与微载体充分混悬。而后每搅拌2~3min,静置30-60min,持续6-8h,然后以能使微载体悬浮的最小搅拌速度连续搅拌培养。

[0010] e)CDV接种与增殖:细胞反应器内培养约72h,取样观察细胞生长状态,待细胞在微载体上汇合度达90%以上,且通过测定细胞糖耗水平,确定细胞密度达到最大,按M.O.I约为0.05接种入CDV病毒悬液。

[0011] f)CDV收获:接种病毒8h后将培养温度降至36℃。24h后每8~24h取样显微镜观察和培养液测糖含量。待微载体上的细胞80%脱落,细胞糖耗接近0时,停止搅拌,沉降微载体,收获上清。

[0012] 具体地,将f步骤残留在微载体中病毒液反复冻融三次,收集上清。

[0013] 进一步地,将所述d步骤微载体灭菌后,与待培养细胞一起接种至含有质量百分浓度8-10%新生牛血清的细胞培养液中,进行细胞培养;优选地,在培养48~120小时后,更换成含2~5%新生牛血清的培养基继续培养或接种病毒。

[0014] 具体地,所述微载体为Cephadex细胞微载体,用量为3-20g/L,所述待培养细胞的接种密度为 $3-5 \times 10^5$ cell/ml。

[0015] 进一步地,所述微载体与所述待培养细胞的比例为15-30个细胞/1个微载体。

[0016] 具体地,所述细胞为ST细胞、CHO细胞、MDCK细胞、Vero细胞、Marc145细胞、BHK21细胞、MRC-5细胞和DF1细胞。

[0017] 进一步地,所述微载体在细胞培养中使用时无需对细胞培养容器进行预先硅化处理。

[0018] 本发明的有益效果在于:

[0019] 本发明具有细胞密度大、病毒滴度高、生产效率高、过程可控性强和产品质量均一稳定等优点,克服了传统转瓶生产工艺的产品批间差大、抗原含量低和生产效率低等诸多不足。同时,本发明使用的新型细胞培养微载体较传统微载体产品,其使用方法简便,细胞培养性能稳定可靠,工艺放大容易,极大地提高了工作效率且降低了生产成本。

具体实施方式

[0020] 下面对本发明作进一步说明:

[0021] 在实施例1中,所述微载体在细胞培养中使用时无需对细胞培养容器进行预先硅化处理,用Flask细胞培养瓶和3L转瓶逐级放大培养Vero或DF1细胞,当转瓶细胞数量达到所要求时,无菌收集转瓶细胞作为种子细胞。

[0022] b)细胞培养微载体的选择与准备:选择新型Cephadex细胞培养微载体为细胞贴附生长的载体。按10g/L的用量,根据培养体积称取一定量的Cephadex微载体放入PBS中,用玻璃棒充分搅拌,使微载体于PBS中分散混悬。

[0023] c)生物反应器准备:将混悬好的微载体注入反应器中,安装完好后将罐体置于121℃高压蒸汽灭菌30min,待温度降至80℃后,以底部通气模式向罐体内以100cc/min的流量持续通气空气,开启搅拌桨,并以95rpm的速率连续搅拌,罐体温度设为37℃,静置24小时后,校正DO数据,向反应器中加入少量细胞生长液37℃孵育24-72h进行无菌检验。

[0024] d)细胞微载体悬浮培养:将收集好的种子细胞按 3×10^5 cells/ML的密度接种接种入反应器罐体内并与微载体充分混悬。而后每搅拌2~3min,静置30-60min,持续6-8h,然后以能使微载体悬浮的最小搅拌速度连续搅拌培养。

[0025] e)CDV接种与增殖:细胞反应器内培养约72h,取样观察细胞生长状态,待细胞在微载体上汇合度达90%以上,且通过测定细胞糖耗水平,确定细胞密度达到最大,按M.O.I约为0.05接种入CDV病毒悬液。

[0026] f)CDV收获:接种病毒8h后将培养温度降至36℃。24h后每8~24h取样显微镜观察和培养液测糖含量。待微载体上的细胞80%脱落,细胞糖耗接近0时,停止搅拌,沉降微载体,收获上清。

[0027] 将f步骤残留在微载体中病毒液反复冻融三次,收集上清。

[0028] 将所述d步骤微载体灭菌后,与待培养细胞一起接种至含有质量百分浓度8-10%新生牛血清的细胞培养液中,进行细胞培养;优选地,在培养48~120小时后,更换成含2~5%新生牛血清的培养基继续培养或接种病毒。

[0029] 所述微载体Cephadex细胞微载体的浓度为3-20g/L,所述待培养细胞的接种密度

为 $3-5 \times 10^5$ cell/ml。

[0030] 所述微载体与所述待培养细胞的比例为15-30个细胞/1个微载体。

[0031] 所述细胞为ST细胞、CHO细胞、MDCK细胞、Vero细胞、Marc145细胞、BHK21细胞、MRC-5细胞和DF1细胞。

[0032] 下表为不同反应条件对增殖CDV病毒悬液密度的数据分析表

[0033]

实施例	微载体浓度	所述待培养细胞接种密度	培养时间	CDV 接种前细胞密度	CDV 增殖时间	培养液中 CDV 滴度 (TCID ₅₀ /0.1ML)
1	5 g/L	3×10^5 cell/ml	72h	1.3×10^6 cell/ml	72h	$10^{-4.5}$
2	10 g/L	3×10^5 cell/ml	72h	2.5×10^6 cell/ml	72h	$10^{-4.9}$
3	15 g/L	3×10^5 cell/ml	72h	2.8×10^6 cell/ml	72h	$10^{-4.9}$

[0034] 由上表可以看出,较高的微载体浓度对增殖CDV病毒悬液滴度起到显著作用,但高于10g/L的微载体用量尽管对细胞密度有少量的提高,但对病毒滴度的提升并没有明显作用,因此本方法的最佳Cephodex微载体用量为10g/L。

[0035] 以上仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围内。