



Vero细胞最佳培养体系筛选

叶华跃^{1,2)} 井敏敏³⁾ 邵聪文⁴⁾ 朱凤才^{1,5)*}⁽¹⁾ 陆军军医大学药学院, 重庆 400038; ⁽²⁾ 泰州医药高新技术产业园区疫苗工程中心, 泰州 225300;⁽³⁾ 泰州赛华生物科技有限公司, 泰州 225300; ⁽⁴⁾ 无锡华派生物科技有限公司, 无锡 214000; ⁽⁵⁾ 江苏疾病预防控制中心, 南京 210009)

摘要 为了筛选出适合 Vero 细胞生长的最佳条件, 本研究分别对 Vero 细胞的培养液、传代比例和接种浓度进行了优化. 首先将 Vero 细胞在不同组合培养液中进行连续 3 代传代培养, 筛选出适宜 Vero 细胞连续稳定传代的最佳培养液组成. 然后分别在不同的传代比例和接种浓度下进行连续 3 代培养, 筛选出适宜 Vero 细胞连续稳定传代的最佳传代比例和接种浓度. 最终结果显示, Vero 细胞在 1.296% MEM 溶液与特级胎牛血清的组合优于其他组合, 可满足 Vero 细胞连续稳定传代. 并且在该培养基的培养下, 1:6 的传代比例为最适宜 Vero 细胞的传代比例, $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的接种密度为最适宜 Vero 细胞的接种密度. 本研究最终完成了 Vero 细胞最佳培养体系条件筛选, 并证实该条件满足 Vero 细胞连续稳定传代.

关键词 Vero 细胞, 最佳培养液, 传代比例, 接种密度

中图分类号 R331, Q253

DOI: 10.16476/j.pibb.20190.239

非洲绿猴肾细胞 (Vero) 是由 Yasumura 和 Kawakita 于 1962 年分离得到的一种异倍体永生细胞系^[1]. 自从世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 批准该细胞用于人用疫苗的生产后, 以该细胞为基质的乙型肝炎、肾综合征出血热、人用狂犬、脊髓灰质炎、EV71、轮状病毒、天花等疫苗先后上市销售^[2-4]. Vero 细胞为连续传代细胞系且具有广泛的病毒适应谱, 大大推进了生物制品开发的速度, 有以 Vero 细胞为基质的流感病毒、黄热病毒等疫苗在研发中^[5-7]. 但是 Vero 细胞在生物制品开发中的应用也面临细胞质量和密度的不稳定性及批间差异问题. 本研究从细胞培养液、细胞传代比例和细胞接种浓度三方面, 对 Vero 的最佳培养体系展开研究. 结果证实, 筛选到的最佳培养体系可满足 Vero 细胞连续稳定传代. 该研究结果对未来使用以 Vero 细胞为基质制备相关疫苗产品提供有效支撑, 同时也为其他细胞基质的研究提供了思路和方法.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

Vero 细胞购自美国 ATCC, 已分别构建主代

库, 细胞代次 P134 和工作库, 细胞代次 P137.

1.1.2 试剂、耗材、溶液及设备

两种 MEM 培养基分别购自 Gibco 公司 (以下简称 Gibco MEM) 和无锡市美迪生物制品有限公司 (以下简称 MD MEM); 血清分别购自 BI 公司、北京民海生物科技有限公司和浙江天杭生物科技有限公司; 胰蛋白酶及谷氨酰胺均购自 Sigma 公司; EDTA.2Na、氯化钠、氯化钾、十二水合磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氢氧化钠均购自国药集团化学试剂有限公司. 细胞培养瓶购 Corning 公司; $0.22 \mu\text{m}$ 一次性无菌滤杯、一次性无菌移液管和无菌吸头均购自 Thermo Fisher 公司. 洁净工作台购自苏州安泰净化工程有限公司; 三用恒温水箱购自上海精宏实验设备有限公司; pH 计购自赛多利斯科学仪器有限公司; 二氧化碳培养箱购自 Thermo Fisher 公司; 细胞计数仪购自 Invitrogen 公司.

1.1.3 溶液

0.96% MEM 溶液 (Gibco MEM)、1.296% MEM 溶液 (MD MEM)、10 mmol/L PBS 溶液、4% EDTA.2Na 溶液、1% 胰蛋白酶溶液、1 mol/L 氢

* 通讯联系人.

Tel: 0523-86200482, E-mail: js_zfc@sina.com

收稿日期: 2019-10-15, 接受日期: 2020-01-22

氧化钠溶液、3%谷氨酰胺溶液均为本公司自配溶液。

1.2 方法

1.2.1 Vero细胞复苏、传代培养

取一支工作库的Vero细胞种子,细胞代次P137,37℃水浴快速化冻后接种至1.296% MEM溶液(含10%BI胎牛血清)配制的完全培养液中,次日换液,长满单层后进行传代培养.使用细胞消化液将细胞分散,完全培养液终止培养,无菌移液管轻柔吹打使其充分分散,按照底面积1:4的比例接种至下一代,37℃培养箱中静置培养。

1.2.2 Vero细胞最佳培养液筛选研究

将1.2.1中长满单层的Vero细胞进行消化,接

种至表1所示的10种配方的培养液中,每种配方培养液按照 $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种至9个T25瓶,10 ml/瓶,37℃培养箱中培养.每24 h每组各取1瓶细胞,拍照后将细胞使用胰酶分散,计算活细胞和死细胞数量,统计每天活细胞数量和倍增情况变化趋势,使用单因素方差分析法比较最优组别与其余组别之间是否存在显著性差异(F 检验, $P < 0.01$).培养至第5天,每组剩余细胞消化后按照 $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 传代,作为培养液筛选的第二代细胞,处理方法同第一代,对于较差的组别可剔除.第三代与第二代方法相同.第三代培养至第5天,取较优组别进行最佳传代比例筛选研究。

Table 1 Composition and proportion of the culture medium in ten groups

Batch number	MEM /%	Serum classes	Serum concentration(v/v) ¹⁾	ρ (Glutamine) /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) ¹⁾	ρ (NaHCO_3) /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) ¹⁾
20180501/02/03-01	1.296	NBS	10%	0.62	0.6
20180501/02/03-02	1.296	Defined FBS	10%	0.62	0.6
20180501/02/03-03	1.296	Characterized FBS	10%	0.62	0.6
20180501/02-04	1.296	Defined FBS	10%	0.62	0.6
20180501/02-05	1.296	Characterized FBS	10%	0.62	0.6
20180501/02-06	0.96	NBS	10%	N/A ²⁾	2.2
20180501/02-07	0.96	Defined FBS	10%	N/A ²⁾	2.2
20180501/02-08	0.96	Characterized FBS	10%	N/A ²⁾	2.2
20180501/02-09	0.96	Defined FBS	10%	N/A ²⁾	2.2
20180501/02-10	0.96	Characterized FBS	10%	N/A ²⁾	2.2
20180503-04	0.96	NBS	10%	N/A ²⁾	2.2

¹⁾ The addition of glutamine, serum and sodium bicarbonate in each batch is according to the product manual instruction. ²⁾ N/A represent the item has already included in the medium, no need for addition.

1.2.3 Vero细胞最佳传代比例筛选研究

将1.2.1中长满单层的Vero细胞进行消化,使用1.2.2中筛选得到的最佳培养液,按照表2所示的3种传代比例进行传代培养,每种比例接种9个T25瓶,10 ml/瓶,37℃培养箱中培养.每24 h每组各取1瓶细胞,拍照后将细胞使用胰酶分散,计算活细胞和死细胞数量,统计每天活细胞数量和倍增情况变化趋势,使用单因素方差分析法比较最优组别与其余组别之间是否存在显著性差异(F 检验, $P < 0.01$).培养至第3天,1:4组别细胞进行消化后按照1:4比例传代,作为传代比例筛选的第二代细胞;1:6和1:8组分别在第4天和第5天进行1:6和1:8比例的传代,处理方法同第一代,对于生长较差的组别可剔除.第三代与第二代方法相同,取较优组别进行最佳接种浓度筛选研究。

1.2.4 Vero细胞最佳接种浓度筛选研究

将1.2.3中长满单层的Vero细胞进行消化,使用1.2.2中筛选得到的最佳培养液,按照表3所示的3种接种浓度进行传代培养^[8],每种浓度接种9个T25瓶,10 ml/瓶,37℃培养箱中培养.每24 h每组各取1瓶细胞,拍照后将细胞使用胰酶分散,计算活细胞和死细胞数量,统计每天活细胞数量和倍增情况变化趋势,使用单因素方差分析法比较最优组别与其余组别之间是否存在显著性差异(F 检验, $P < 0.01$).培养至第5 d,每组剩余细胞消化后按照对应浓度接种至8个T25瓶中,作为接种浓度筛选的第二代细胞,处理方法同第一代.第三代与第二代方法相同。

1.2.5 统计分析

使用绘图软件Prism 5.0对实验过程中的数据进行统计、绘图、分析.对所得数据进行 F 检验,

Table 2 Three passage ratios on subculture systems					
Batch number	Passaging ratio	MEM solution /%	Serum classes	Serum concentration (v/v)	Flask seeding area /cm ²
20180504-01	1 : 4	1.296	Defined FBS	10%	25
20180504-02	1 : 6	1.296	Defined FBS	10%	25
20180504-03	1 : 8	1.296	Defined FBS	10%	25

Table 3 Three density of subculture systems					
Batch number	Cell density/(10 ⁴ •cm ⁻²)	MEM solution /%	Serum classes	Serum concentration (v/v)	Flask seeding area /cm ²
20180505-01	3	1.296	Defined FBS	10%	25
20180505-02	4	1.296	Defined FBS	10%	25
20180605-03	5	1.296	Defined FBS	10%	25

$P<0.01$ 即具有统计学差异.

2 结 果

2.1 Vero细胞在10组培养液中适应性传代

通过比较 10 组培养液对 Vero 细胞增殖情况的影响, 筛选适宜 Vero 细胞生长的最佳培养液. 通过

对比 3 代后不同组别每天的活细胞数量、活细胞倍增数和细胞形态来判断该组培养液促生长能力及连续传代的稳定性. 结果发现, 20180503-02 组活细胞数量和倍增数量在 96 h 均显著性高于 20180503-01、03、04 这 3 组 ($P<0.01$) (图 1e, f), 因此, 确定最适宜的传代时间为 96 h. 对比 10 组培养液培

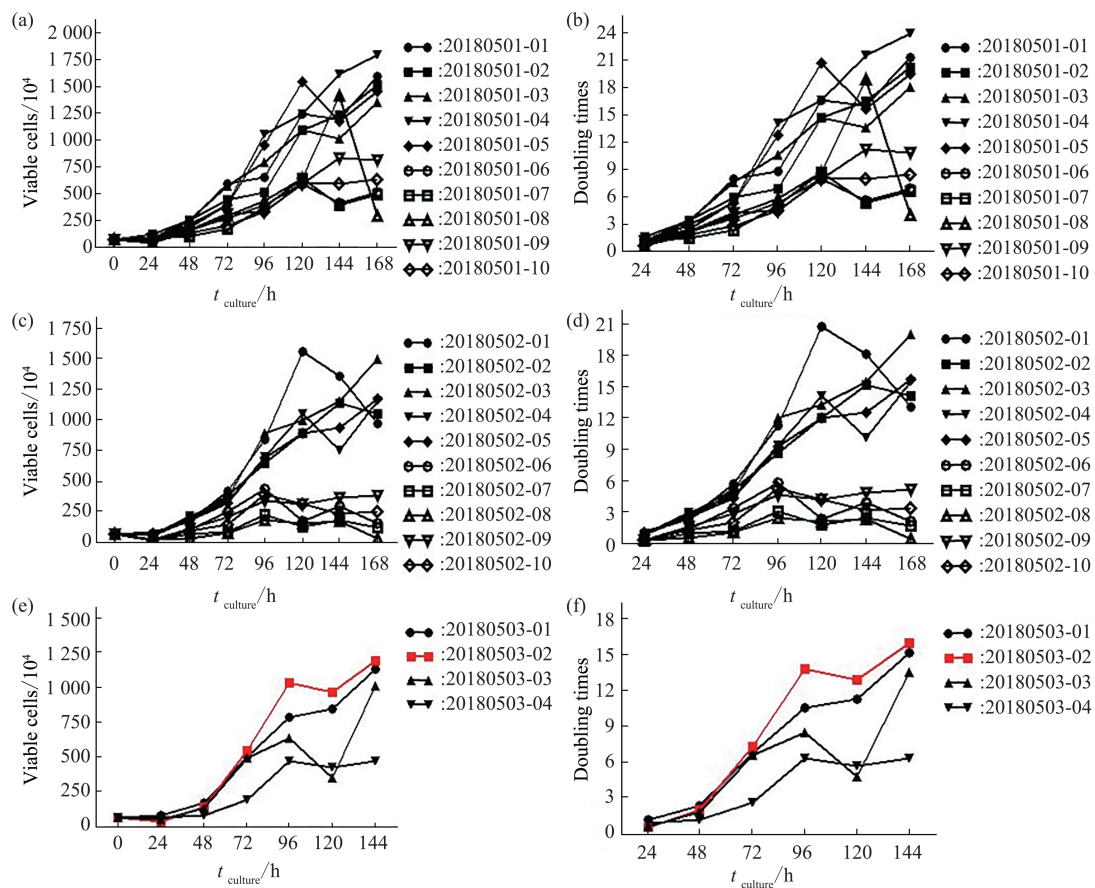


Fig. 1 Trends on the number of viable cell and doubling time for different culture systems
(a), (b) The viable cells and doubling times curve of Vero cell cultured in ten group culture medium on the first passage. (c), (d) The viable cells and doubling times of Vero cell cultured in ten group culture medium on the second passage. (e), (f) The viable cells and doubling times curve of Vero cell cultured in four group culture medium on the third passage.

养3代Vero细胞的活细胞数量和倍增数量的变化趋势, 20180503-02组的稳定性优于其他9组(图1)。因此, 确定最佳培养液为20180503-02组。从细胞形态和细胞汇合度看, 20180503-02组在传代72 h后最先铺满单层。另外, 20180503-04组细胞形态、细胞汇合度及细胞表面的死细胞与其他3组相

比无显著差异, 亦可满足Vero细胞正常传代培养(图2)。汇合度及观察结果显示, 1.296% MEM溶液与特级胎牛血清组优于其他组, 可满足Vero细胞连续稳定传代。0.96% MEM亦可满足Vero细胞连续稳定传代, 作为国外培养基中的首选品牌。

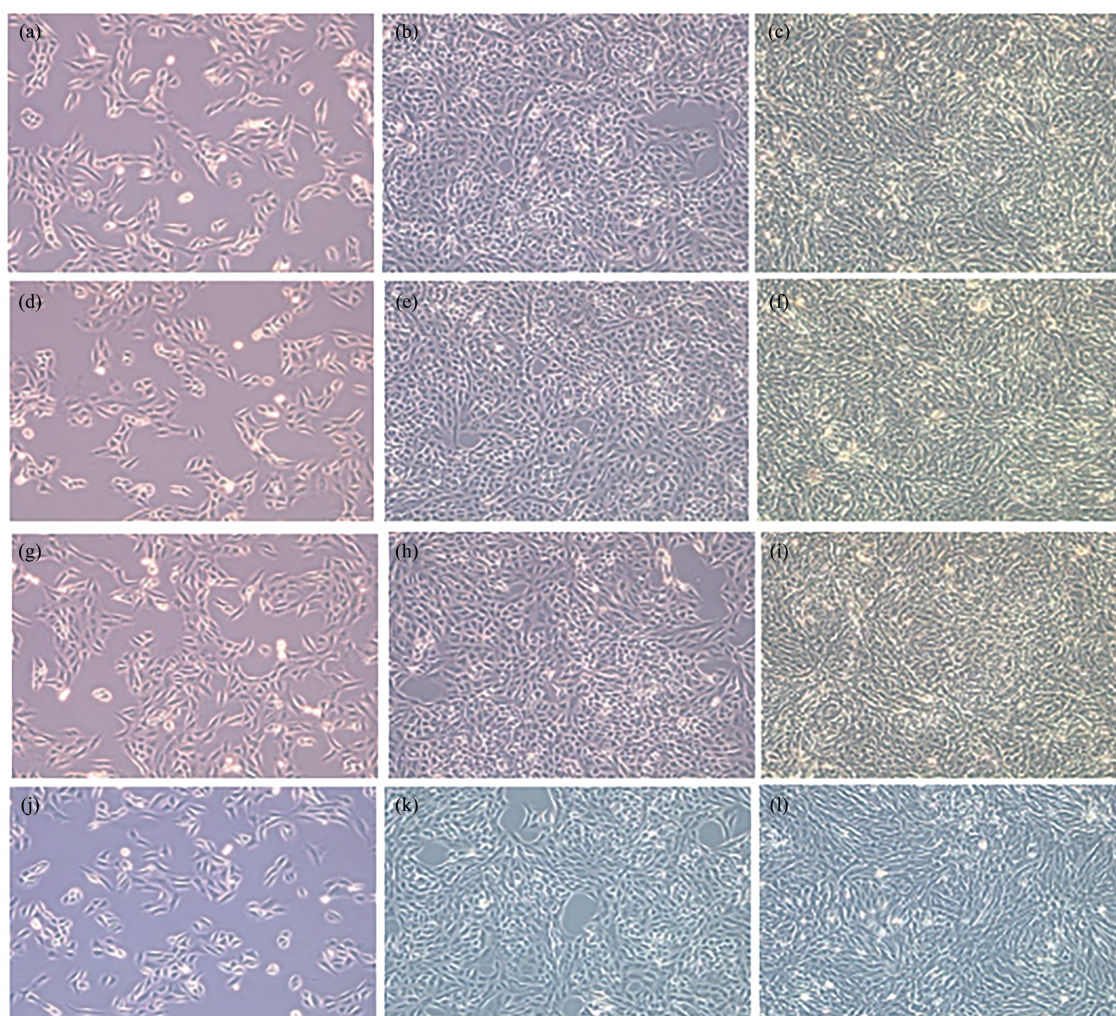


Fig. 2 The cell picture about the four culture mediums on the third generation (100×)

(a), (b), (c) Vero cell cultured in 20180503-01 group medium respectively for 24 h, 72 h and 144 h. (d), (e), (f) Vero cell cultured in 20180503-02 group medium respectively for 24 h, 72 h and 144 h. (g), (h), (i) Vero cell cultured in 20180503-03 group medium respectively for 24 h, 72 h and 144 h. (j), (k), (l) Vero cell cultured in 20180503-04 group medium respectively for 24 h, 72 h and 144 h.

2.2 Vero细胞在3种传代比例培养体系中适应性传代

为了筛选适宜Vero细胞的最佳传代比例, 在2.1的基础上, 比较了3种传代比例对Vero细胞增殖情况的影响. 通过对比3代后不同组别每天的活细胞数量、活细胞倍增数量和细胞形态来判断该种比例增殖情况及连续传代的稳定性. 结果发现, 20180504-02组活细胞数量和倍增数量在96 h均显著高于其他两组 ($P<0.01$) (图3e, f), 确定最佳传代时间为96 h. 对比3种传代比例培养3代Vero细胞的活细胞数量和倍增数量变化趋势, 20180504-02组的稳定性优于其他两组 (图3), 因

此, 确定最佳接种比例为20180504-02组. 从细胞形态和细胞汇合度看, 与其他两组比较, 20180504-01和20180504-02组在传代后24 h最先铺满单层, 细胞形态和汇流状均较好, 细胞表面死细胞均较少 (图4). 因此, 20180504-01和20180504-02组条件均可用于Vero细胞连续稳定传代, 但是在最少时间和最低成本的前提下, 获得更多Vero细胞, 优先考虑02组的传代条件. 最终, 通过数据分析、形态观察及成本核算, 确定20180504-02组, 即1:6为Vero细胞在2.1基础上的最佳传代比例.

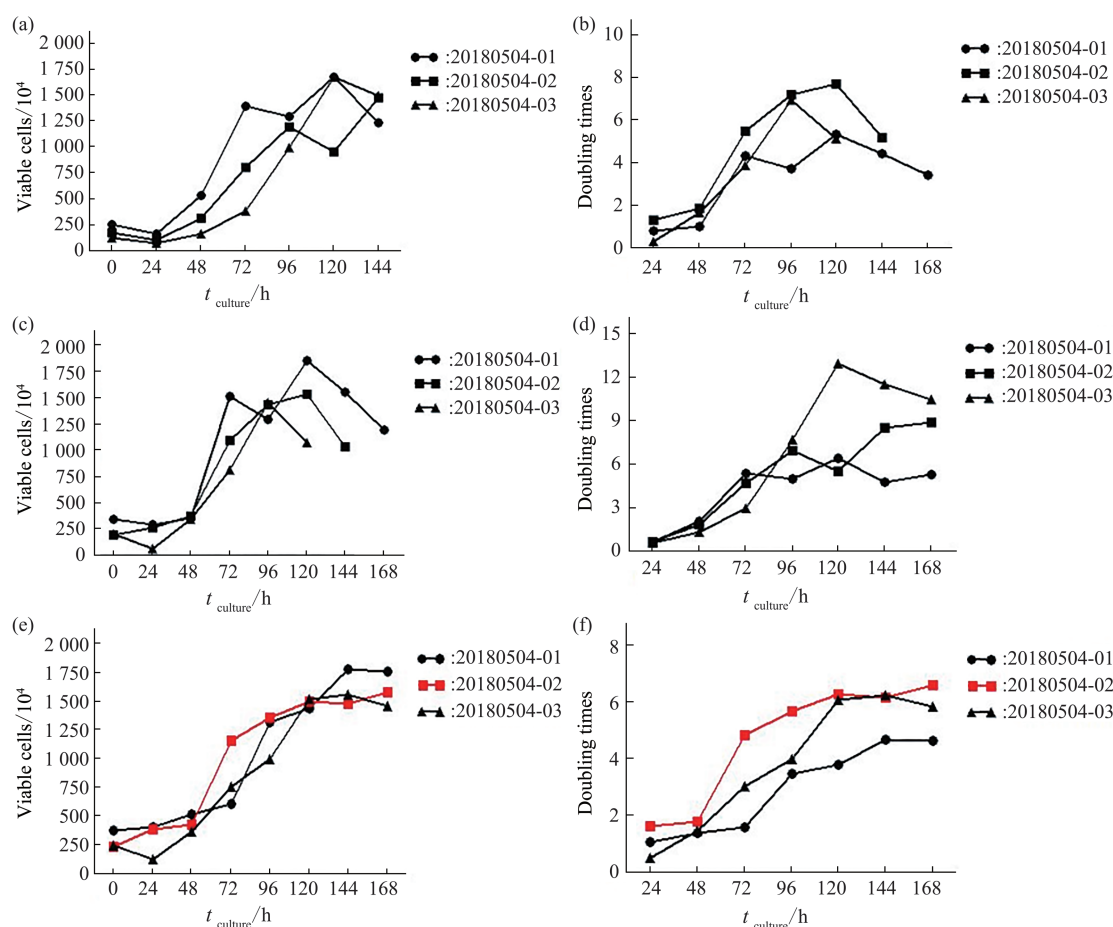


Fig. 3 Trends on the viable cell and doubling time for different passage ratio systems

(a), (b) The viable cell and doubling time curve of Vero cell cultured at three passage ratios on the first passage. (c), (d) The viable cells and doubling time curve of Vero cell cultured at three passage ratios on the second passage. (e), (f) The viable cell and doubling time curve of Vero cell cultured at three passage ratios on the third passage.

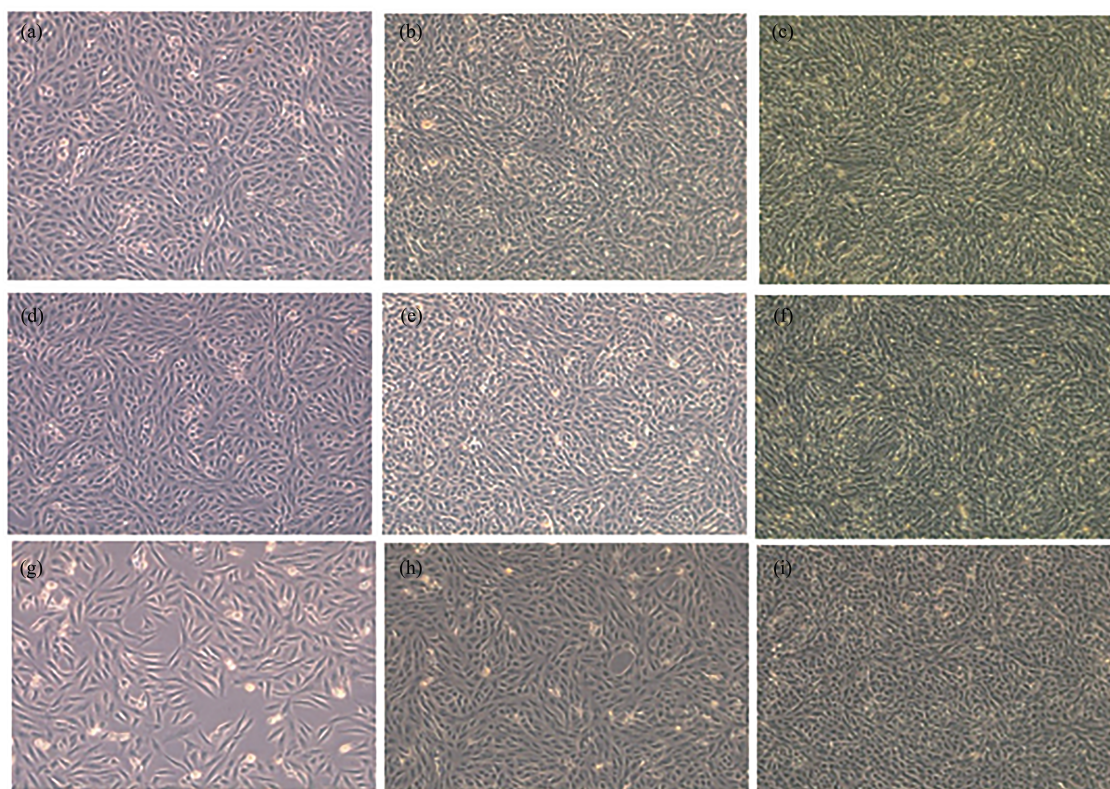


Fig. 4 The cell picture about different passage ratio systems on the third generation (100×)

(a), (b), (c) Vero cell cultured in 20180504-01 group passage ratio respectively for 24 h, 48 h and 168 h. (d), (e), (f) Vero cell cultured in 20180504-02 group passage ratio respectively for 24 h, 48 h and 168 h. (g), (h), (i) Vero cell cultured in 20180504-03 group passage ratio respectively for 24 h, 48 h and 168 h.

2.3 Vero细胞在3种接种浓度培养体系中适应性传代

为了筛选适宜 Vero 细胞的最佳接种浓度，在 2.1 的基础上，比较了 3 种接种浓度对 Vero 细胞增殖情况的影响。通过对比 3 代后不同组别每天的活细胞数量、活细胞倍增数量和细胞形态来判断该种浓度增殖情况及连续传代的稳定性。结果发现，20180605-01 组活细胞数量和倍增数量在 96 h 均显著高于其他两组 ($P < 0.01$) (图 5e, f)。对比 3 种接种浓度培养 3 代 Vero 细胞的活细胞数量和倍增数量的变化趋势，20180605-02 组的稳定性优于其他两组 (图 5)。从细胞形态和细胞汇合度看

20180605-03 组在传代后 72 h 最先铺满单层，细胞形态和汇流状均较好，细胞表面的死细胞较少，但与其他两组无显著差异 (图 6)。因此，20180605-01、20180605-02 和 20180605-03 组条件均可用于 Vero 细胞连续稳定传代，但是在最少的时间和最低成本的前提下，获得更多的 Vero 细胞，优先考虑 20180605-01 组的传代条件。最终，通过数据分析、形态观察及成本核算，确定 20180605-01 组，即 $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 为 Vero 细胞在 2.1 基础上的最佳接种浓度。20180605-02 组，即 $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ 为 Vero 细胞在 2.1 基础上的备选接种浓度。

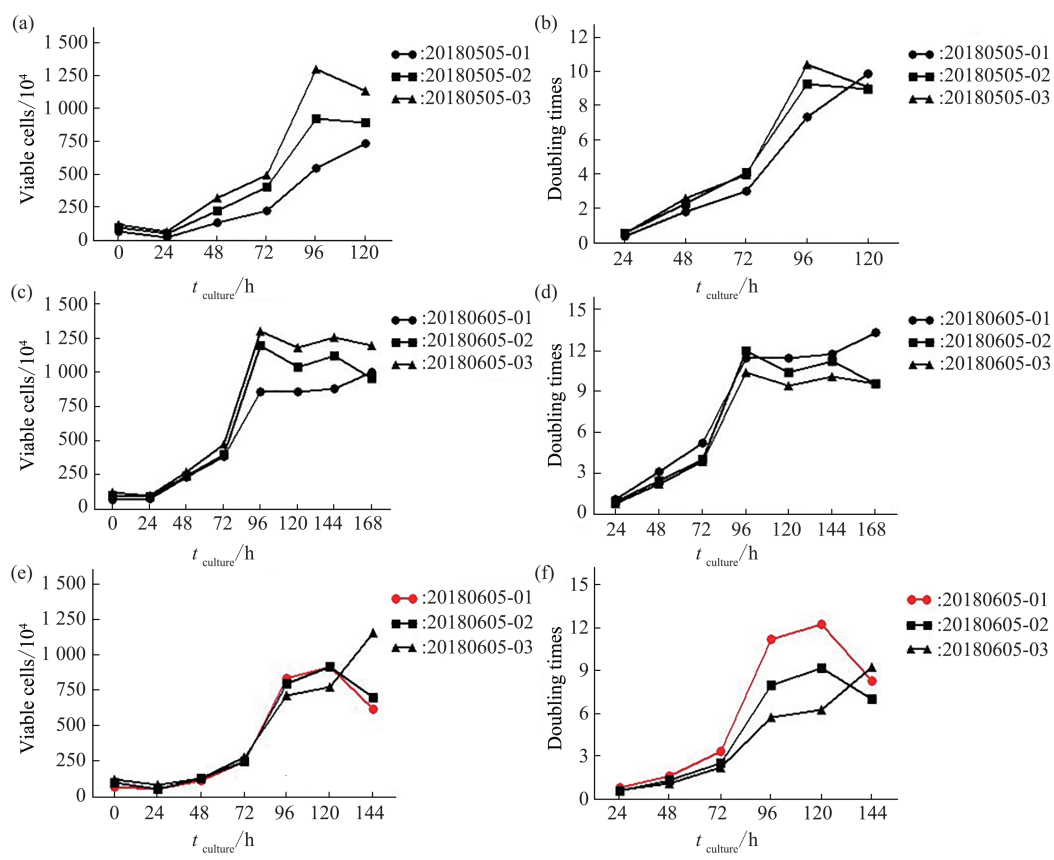


Fig. 5 Trends on the number of viable cell and doubling time for different subculture density systems
(a), (b) The viable cell and doubling time curve of Vero cell cultured in three subculture densities on the first passage. (c), (d) The viable cell and doubling time curve of Vero cell cultured in three subculture densities on the second passage. (e), (f) The viable cell and doubling time curve of Vero cell cultured in three subculture densities on the third passage.

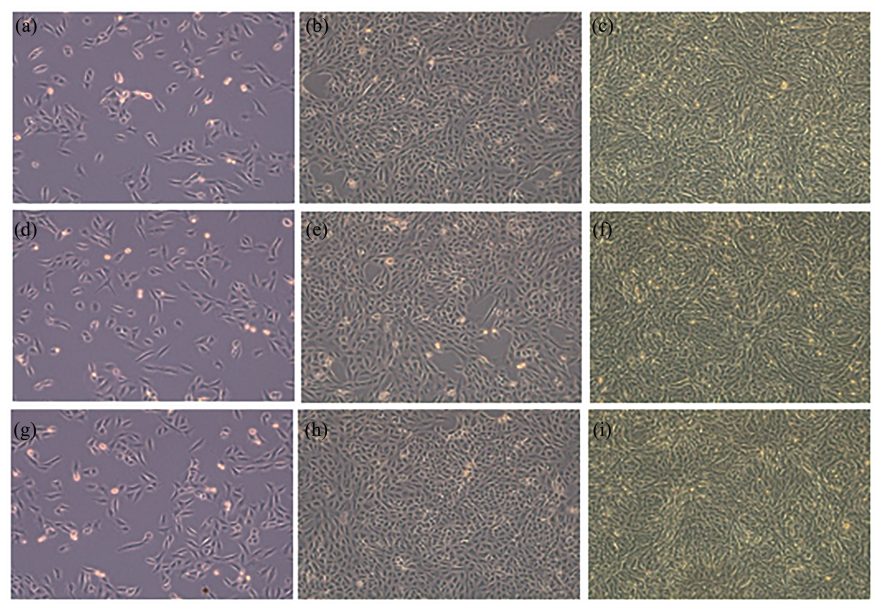


Fig. 6 The cell pictures about the different subculture density systems on the third generation (100×)
(a), (b), (c) Vero cell cultured in 20180605-01 group subculture density for 24 h, 72 h and 144 h. (d), (e), (f) Vero cell cultured in 20180605-02 group subculture density for 24 h, 72 h and 144 h. (g), (h), (i) Vero cell cultured in 20180605-03 group subculture density for 24 h, 72 h and 144 h.

3 讨 论

疫苗用于预防疾病、死亡、提高全球生活质量,对全球的健康有着深远的影响.但是由于疫苗生产和分销的成本高,世界上的许多贫穷人群尚不能通过有效接种疫苗来预防疾病^[9].本实验从细胞培养液、传代比例和接种浓度3个角度出发,筛选了Vero细胞的最佳培养体系,分别对Vero细胞的增殖情况进行监测,寻找其最合适的培养体系,从而提高细胞质量、增加对病毒的敏感性、提高疫苗的安全性、降低生产成本.

Vero细胞培养液筛选第一代,20180501-08组在传代168 h,活细胞数量和倍增数量显著下调,可能是因为培养液中营养成分消耗太多且代谢废物积累过多,最终导致细胞集体脱落死亡.另外,20180501/02-02组虽然在第一代和第二代的活细胞数量和倍增数量不是最高,但总体趋势平稳上升,最后在第三代时显著高于其他组,由此可说明20180501/02-02组培养液适于Vero细胞连续稳定传代.由于国内大多数培养基生产厂家规模较小,无法满足规模化大生产时对培养基质量和稳定性等的需求,故我们选择20180503-04组作为规模化大生产培养液首选.

Vero细胞传代比例筛选第一代,20180504-01组在活细胞数量高于其他两组,但是因为接种细胞数量较多,倍增数量不是最高.且20180504-01组在第一代和第二代96 h,活细胞数量有回落趋势,说明20180504-01组接种数量偏多,不适宜Vero细胞连续稳定传代.20180504-02组培养Vero细胞第一代时,倍增数量和活细胞数量均低于20180504-03组;第二代时活细胞数量低于20180504-03倍增数量高于20180504-03;但是在第三代时均高于20180504-03组.因此,20180504-02组适宜Vero细胞连续稳定传代.

Vero细胞接种浓度筛选第一代,20180505-03组在活细胞数量和倍增数量上均高于其他两组;适应至第二代,20180505-02组的活细胞数量逐渐接近20180605-03组,高于20180505-01组,且是倍增数量超过其他两组;适应至第三代,20180505-01组的活细胞数量和倍增数量均高于其他两组,且20180505-01组细胞汇合度、死细胞数量与其他组无差异.因此,20180505-01组的接种浓度更适

用于Vero细胞快速稳定增殖.

本实验只是对细胞快速稳定增殖情况进行检测,并未将病毒增殖情况与其对应,后面在相应产品研发过程中予以相应补充.在针对病毒产量低的问题上,有研究通过使用CRISPR/Cas9基因编辑工具,敲除Vero细胞上与脊髓灰质炎和轮状病毒增殖有关的靶基因以实现病毒产量的增加,从而显著降低疫苗生产的成本,实现疫苗全球化.但是在使用之前,还需要进行补充研究^[10-11].

综上所述,本实验从细胞培养液、传代比例和接种浓度3方面筛选了Vero细胞的最佳培养体系.结果证实:适用于Vero细胞的最佳培养液为20180501/02-02即MD MEM溶液与特级胎牛血清匹配,但是20180503-04即Gibco MEM溶液与新生牛血清匹配,仍可满足Vero细胞连续稳定传代,宜作为国外培养基首选品牌,最佳传代比例为20180504-02即1:6,最佳接种浓度为20180605-01即 $3 \times 10^4/\text{cm}^2$,在对于以Vero细胞为基质生产相关疫苗及其他产品,未来还需要进一步的研究和探讨.

参 考 文 献

- [1] Teferedegne B, Macauley J, Foseh G, *et al.* MicroRNAs as potential biomarkers for VERO cell tumorigenicity. *Vaccine*, 2014, **32**(37): 4799-4805
- [2] 董纪英.应用生物反应器制备Vero细胞人用狂犬病疫苗的研究. *健康导报*, 2015, **10**(20): 30
Dong J Y. *Health Herald*, 2015, **10**(20): 30
- [3] Wu C-Y, Lin Y-W, Kuo C-H, *et al.* Inactivated enterovirus 71 vaccine produced by 200-l scale serum-free microcarrier bioreactor system provides cross-protective efficacy in human SCARB2 transgenic mouse. *Plos One*, 2015, **10**(8): e0136420
- [4] Sabine M. G. Van Der Sanden, Wu W, Dybdahl-Sissoko N, *et al.* Engineering enhanced vaccine cell lines to eradicate vaccine preventable diseases: the polio end game. *Journal of Virology*, 2016, **90**(4): 1694-1704
- [5] Souza M C O, Freire M S, Schulze E A, *et al.* Production of yellow fever virus in microcarrier-based Vero cell cultures. *Vaccine*, 2009, **27**(46): 6420-6423
- [6] Ehrlich H J, Berezuk G, Fritsch S, *et al.* Clinical development of a Vero cell culture-derived seasonal influenza vaccine. *Vaccine*, 2012, **30**(29): 4377-4386
- [7] Mattos D A, Silva M V, Gaspar L P, *et al.* Increasing Vero viable cell densities for yellow fever virus production in stirred-tank bioreactors using serum-free medium. *Vaccine*, 2015, **33**(35): 4288-4291

- [8] 林佩欣,申洪,高璐璐等. 肠道病毒肠道病毒 7171 型型对对 Vero 细胞线粒体的损伤作用及机制细胞线粒体的损伤作用及机制. 南方医科大学学报, 2015, **35**(6): 857-861
Lin P X, Shen H, Gao L L, *et al.* J South Med Univ, 2015, **35**(6): 857-861
- [9] Hoeksema F, Karpilow J, Luitjens A, *et al.* Enhancing viral vaccine production using engineered knockout vero cell lines – A second look. Vaccine, 2018, **36**(16): 2093-2103
- [10] Sabine M. G. van der Sanden, Wu W, Dybdahl-Sissoko N, *et al.* Engineering enhanced vaccine cell lines to eradicate vaccine preventable diseases: the polio end game. Journal of Virology, 2016, **90**(4): 1694-1704
- [11] Wu W, Orr-Burks N, Karpilow J, *et al.* Development of improved vaccine cell lines against rotavirus. Scientific Data, 2017, **4**:170021

The Screening of Optimal Culture System for Vero Cells

YE Hua-Yue^{1,2)}, JING Min-Min³⁾, SHAO Cong-Wen⁴⁾, ZHU Feng-Cai^{1,5)*}

¹⁾Department of Pharmacy, Army Medical University, Chongqing 400038, China;

²⁾Vaccine Engineering Center, Taizhou Pharmaceutical High-Tech Industrial Park, Taizhou 225300, China;

³⁾Taizhou Saihua Bio-Tech Company, LTD., Taizhou 225300, China;

⁴⁾Wuxi Huapai Bio-Tech Company, LTD., Wuxi 214000, China;

⁵⁾Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

Abstract In order to screen the optimal culture system for Vero cell culture, this study has optimized the culture medium, passage ratio and density for three consecutive passage respectively. Above all, Vero cells were cultured in different kinds of medium for three passages to select the best medium. Subsequently, different subculture density and proportion of Vero cells were cultured in the optimal medium for three passage, and the optimized passage ratio win out. In general, 1.296% MEM medium supplied with superfine fetal bovine serum is better than the other combination of medium and it can sustain the successive stable culture passaging. In the condition of this medium, the best proportion of cell passaging is 1 : 6 and the optimal cell density is $3 \times 10^4/\text{cm}^2$. In this study, we screened the conditions of the best Vero cell culture system and confirmed that the conditions meet the continuous and stable passage of Vero cells.

Key words Vero cell, optimal culture medium, passage ratio, subculture density

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0239

* Corresponding author.

Tel: 86-523-86200482, E-mail: js_zfc@sina.com

Received: October 15, 2019 Accepted: January 22, 2020