

## APPLICATION NOTE

# Vero 细胞在无血清条件下的微载体培养

解正刚<sup>1</sup>, 范贤志<sup>2</sup>, 陈坡<sup>3-4</sup>

1. 艾本德（上海）国际贸易有限公司，上海，中国
2. 合肥学院先进制造工程学院，安徽合肥，中国
3. 湖南省肿瘤医院消化泌尿内二科，湖南长沙，中国
4. 湖南省胃肠肿瘤临床医学研究中心，湖南长沙，中国

通信邮箱: chenpo@hnca.org.cn

### 摘要

Vero 细胞是一种贴壁依赖性细胞, 在生产培养过程中需要添加牛血清维持细胞的正常生长。但由于牛血清成分的不确定性, 导致以 Vero 细胞为基质的生物制品生产工艺带来很大的挑战。本研究使用生物反应器和 Cytodex1 微载体进行

Vero 细胞的无血清培养工艺探索。通过投放 10g/L 的 Cytodex1 微载体, 连续灌流无血清培养基培养 120 小时, 罐内 Vero 细胞密度达到  $7.2 \times 10^6$  个 /mL。证实了 Vero 细胞无血清培养体系在生物反应器工艺上的巨大潜力。

### 介绍

Vero 细胞是非洲绿猴肾的传代细胞, 胞核学稳定, 无外源因子污染, 无致癌性, 对多种病毒和细菌病毒高度易感, 是 WHO 推荐使用的人用疫苗生产基质, 被广泛应用于病毒性疫苗的生产 [1, 2]。由于 Vero 细胞是贴壁依赖性细胞, 以往的培养工艺都需要添加牛血清。但因为牛血清生产过程复杂, 批间差异大, 成分难以保持一致, 给实验和生产的质量控制带来巨大困难, 同时血清的使用也带来一些隐蔽的生物安全问题, 所以目前 Vero 的无血清培养逐渐成为一种主流趋势 [3]。

搅拌式生物反应器通常用于培养非贴壁型细胞, 在此类生物反应器中培养贴壁细胞时, 需要加入载体为其提供生长表面。微载体是一种附着基质, 细胞可以附着其上并进行生长, 同时在搅拌作用下保持悬浮状态。目前, 微载体培养 Vero 细胞进行病毒类产品的生产已经非常成熟, 包括狂犬疫苗, EV71 疫苗, Covid-19 疫苗等 [4]。针对当前无血清培养细胞的发展趋势, 我们使用 Cytodex-1 微载体在 Eppendorf 1.75L 玻璃罐体中进行 Vero 细胞无血清培养工艺的开发。

## 材料和方法

细胞和试剂：Vero 细胞来自中科院细胞库，代次 145，经无血清培养基适应。细胞扩增及在生物反应器内使用 Gibco VP 无血清细胞培养基 (VP Serum Free Medium, ThermoFisher)。细胞消化液使用重组胰蛋白酶 (Trpzyme® Recombinant Trypsin Solution, BasalMedia)，利用胰酶抑制剂终止消化 (ThermoFisher)。微载体采用 Cytodex1 (Cytiva)。葡萄糖浓度通过葡萄糖试剂盒检测 (南京建成生物工程研究所)。

设备：生物反应器内细胞扩增使用 BioFlo 320 生物反应器 (Eppendorf)，包括 1.75L 工作体积的罐体。细胞计数使用 Countess 3 细胞计数仪 (ThermoFisher)。

## 种子准备

将冻存的已驯化无血清 Vero 细胞 ( $5.0 \times 10^6$  cells) 复苏至 T-175 细胞培养瓶中，置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中，37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养。待 Vero 细胞生长至完全汇合时，细胞用重组胰蛋白酶进行消化处理，并用胰酶抑制剂终止消化，然后按照  $3.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 的接种密度传代至 8 个 T-175 中。当细胞再次达到 100% 汇合率时，消化收集所有细胞，按  $3.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 的接种密度混合接种至 1 个 5 × 细胞工厂中。待细胞工厂中 Vero 细胞完全汇合后，消化并收集所有细胞。经过细胞计数，将细胞密度稀释至  $2.1 \times 10^6$  cells/mL，总共 250 mL 细胞悬液，细胞活率 99%。放入 500 mL 生物反应器无菌接种瓶中，待接种。

## 微载体准备

按照微载体供应商说明书 [5]，称取 17.5g Cytodex1 微载体。用 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 溶液浸泡 12 小时。再使用 DPBS 溶液清洗 3 次，高压灭菌。灭菌后，使用 SFM 无血清培养基清洗 3 次，37°C 孵育 12 小时，备用。

## 生物反应器控制和工艺参数

本实验使用的 Eppendorf 1.75 L 工作体积玻璃罐体和 BioFlo 320 生物过程控制系统。按 BioFlo320 使用说明，清洗后安装 Cell-lift 搅拌桨、Airwash 和 Decanter 灌流装置。先对 pH 电极进行两点校正，再加入 DPBS 溶液至 1.75 L，安装硅胶管道和 DO 电极。以上完成后即可进行高压灭菌。灭菌后进行 DO 电极的校正。校正完，泵出 DPBS 溶液，再泵入准备好的微载体悬液，补充 SFM 无血清培养基定容至 1.5 L 体积。微载体和培养基平衡至设定值后，将 250 mL Vero 细胞接种液加入罐体中，接种密度为  $3.0 \times 10^5$  cells/mL 按照表 1 设置控制参数。

表 1

BioFlo 320 设置参数	
Agitation	40 rpm
Temperature	37.0°C
pH	7.20, Deadband 0.05
DO	50%
Gas supplied (submerged)	3-gas mix control (Air, CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> )
Gas flow (submerged)	0.002-0.200 SLPM
Gas supplied (Overlay)	100% Air
Gas flow (Overlay)	0.1 SLPM
Vessel	1.75L glass water jacket
Microcarrier	Cytodex-1

## 分析方法和细胞计数

每日取样检测细胞培养液的葡萄糖浓度，计算每 24 小时的葡萄糖消耗量。同时在显微镜下观察载体上细胞的形态和生长情况。对载体上细胞进行消化处理，并使用台酚蓝染色，通过 Countess 3 细胞计数仪进行细胞计数和活率检测。

## 补料控制

通过定时检测反应器内培养基葡萄糖浓度，进行连续灌流培养，维持反应器中葡萄糖浓度在 1.0-2.0g/L，保证 Vero 细胞正常生长的营养需求。灌流程序通过 Decanter 装置进行，实现载体截留的连续灌流培养。

## 结果

细胞接种后 4 小时, 显微镜下观察 Vero 细胞已经贴附在 Cytodex-1 上, 平均每个载体上大约 7 个细胞, 经过 120 小时后, Vero 细胞已经在微载体上完全汇合(图 1)。Vero 细胞附着于 Cytodex-1 微载体上后开始生长, 经过 120 小时, 细胞密度由  $3.0 \times 10^5$  cells/mL 增长为  $7.2 \times 10^6$  cells/mL, 增殖了 24 倍(图 2)。同时, 取样检测的细胞活率在

97.9% 到 99.0% 之间(图 2)。从第 24 小时根据葡萄糖消耗情况开始按照 0.5L/24h 的流速进行灌注培养, 在 96 到 120 小时灌注速度最高达 3.0L/24h(图 3)。随着细胞密度的增加, 葡萄糖消耗在 48 小时也快速增加, 直到 96 小时细胞快长满时消耗速度变慢, 期间细胞最高葡萄糖消耗达到 8.5g/24 小时(图 3)。

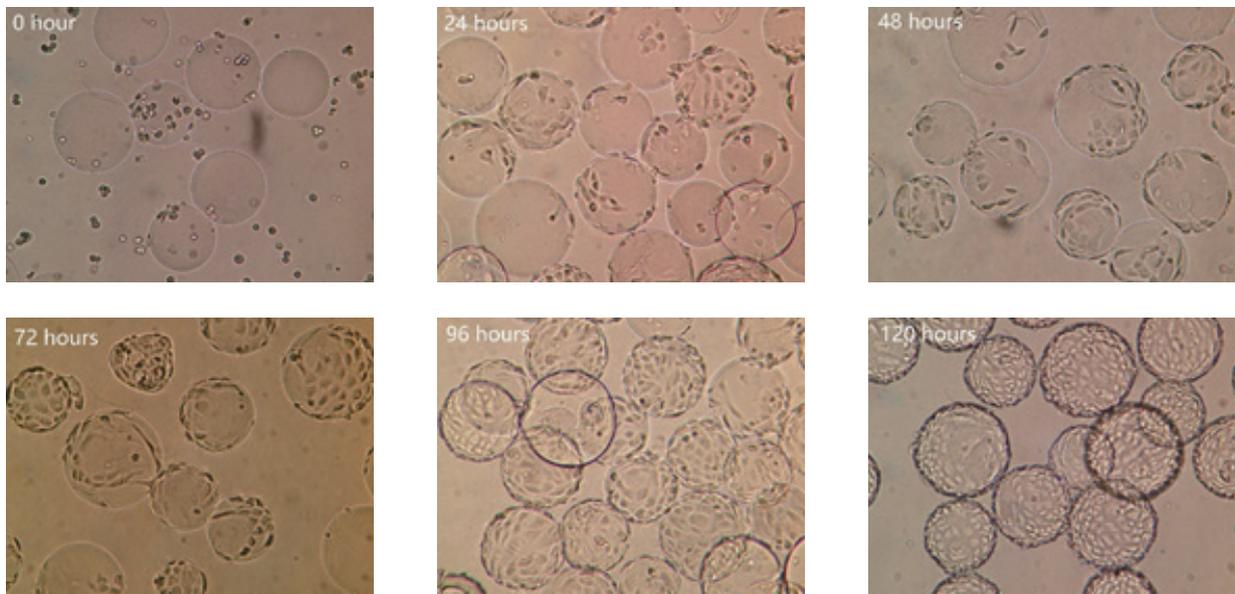


图 1. Vero 细胞在微载体上的生长

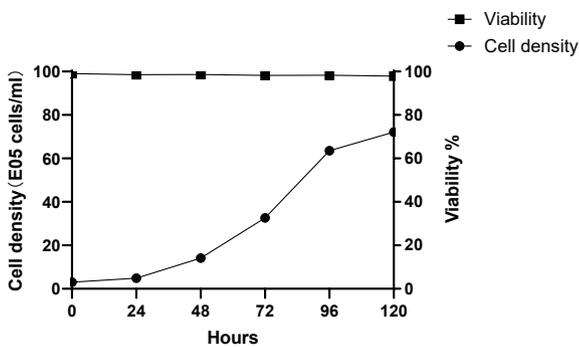


图 2. Vero 细胞在微载体上的增殖曲线和活率

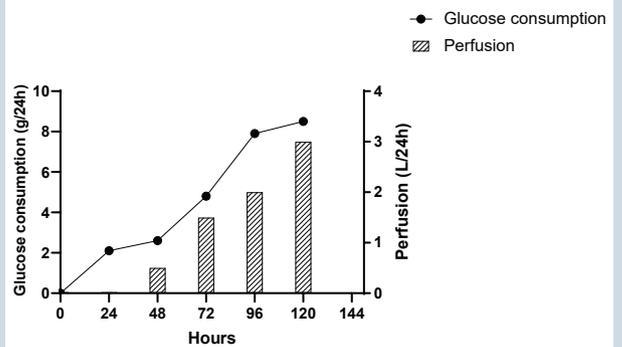


图 3. Vero 细胞在生物反应器内的葡萄糖消耗和灌注速率

## 结论

通过本次实验,证明了使用生物反应器进行 Vero 细胞的无血清微载体培养的可行性。实验中,我们使用配备微载体专用的 Cell-lift 搅拌桨和微载体灌流配件 Decanter 进行高密度无血清 Vero 细胞的培养,最终获得的 Vero 细胞密度为  $7.2 \times 10^6$  cells/mL,微载体投放密度适中,为 10g/L。高密度 Vero 细胞无血清培养工艺的开发需要满足两个基本要求:

1. 低剪切力搅拌系统减少对无血清培养体系下细胞的伤害,

2. 连续灌流操作作为细胞的高密度生长和维持提供营养技术。本次实验,将低剪切力的提升式搅拌桨 Cell-lift 和微载体截留装置 Decanter 结合,实现了整个培养过程的无血清微载体工艺,更加符合细胞培养发展趋势,有利于进行实验和生产过程的标准化,更加符合生物制药安全要求,为无血清 Vero 细胞在疫苗中的应用提供了巨大的潜力。

## Literature

- [1]MARDIROSIAN D, SHA M, RASHID K. Viral Vaccine Production [J].
- [2]BARRETT P N, MUNDT W, KISTNER O, et al. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines [J]. Expert review of vaccines, 2009, 8(5): 607-18.
- [3]KIESSLICH S, KAMEN A A. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines [J]. Biotechnology Advances, 2020, 44: 107608.
- [4]SHA M. Vero Cell-based Vaccine Production: Cell lines, Media and Bioreactor Options [J]. Application Note, 2021.
- [5]GE H. Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods [J]. 1999.

[www.eppendorf.cn](http://www.eppendorf.cn)

Eppendorf China Limited 艾本德中国有限公司 上海: 021-3856 0500 北京: 010-8836 0998 广州: 020-8375 4160  
服务热线: 400 885 6070 电子邮件: [marketinfo@eppendorf.cn](mailto:marketinfo@eppendorf.cn)

[www.eppendorf.com/bioprocess](http://www.eppendorf.com/bioprocess)

AAVpro® is a registered trademark of Takara Bio Inc., Japan. FectoVIR® is a registered trademark of POLYPLUS TRANSFECTION Société Anonyme, France. ISM® and Mettler Toledo® are registered trademarks of Mettler-Toledo AG, Switzerland. Pluronic® and Life Technologies® are registered trademarks of Life Technologies Corp. USA. Cedex® is a registered trademark of Roche Diagnostics GmbH, Germany. BioBLU®, SciVario®, Eppendorf®, MiniSpin®, and the Eppendorf Brand Design are registered trademarks of Eppendorf SE, Germany. Expi293F™, Orion Star™, and Thermo Scientific™ are trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc., USA. All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2022 by Eppendorf SE.