

# 杆状病毒在气升式反应器中感染策略优化

张佑红, 杨文, 危威, 徐智鹏, 苏腾甲

(武汉工程大学化工与制药学院, 绿色化工过程省部共建教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074)

**摘要:**为了得到杆状病毒感染悬浮昆虫细胞最佳条件, 利用正交实验探讨了气升式反应器中感染复数(MOI)、感染时间(TOI)、细胞初始浓度(ICD)及体系中的溶氧值(DO)的相互作用关系以及对包涵体病毒(OV)和非包涵体病毒(BV)产量的影响。结果表明:最佳感染条件为MOI为0.1, TOI为细胞处于对数生长期晚期, ICD为 $2 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ , DO为10%, 最大BV病毒滴度为 $7.943 \times 10^6 \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 最大OV病毒滴度为 $1.68 \times 10^6 \text{ OV}_s \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**关键词:**杆状病毒; 昆虫细胞; 感染策略优化

中图分类号:Q819

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2012.06.006

## 0 引言

利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统进行重组蛋白、疫苗和生物杀虫剂的大规模生产越来越受到人们的重视<sup>[1]</sup>, 因此需要对其生产过程进行优化。近年来, 人们主要在以下几个方面进行了优化:**a.** 细胞生长情况<sup>[2]</sup>; **b.** 培养基<sup>[3-4]</sup>; **c.** 溶氧; **d.** 反应器的设计<sup>[5]</sup>; **e.** 感染策略<sup>[6-9]</sup>, 其中包括感染复数(MOI)、感染时间(TOI)、细胞初始浓度(ICD)和培养基的替换。利用高感染复数进行重组蛋白和病毒杀虫剂的生产过程已经很清楚, 在高感染复数条件下, 所有细胞都“同步”感染<sup>[10]</sup>。但在实际生产中, 采用低感染复数有以下优点<sup>[11]</sup>: **a.** 可以大大减少病毒原种的用量, 无需大量扩增培养, 从而减少设备投资, 缩短工艺流程, 降低生产中受污染的概率; **b.** 减少了由于高复数感染引起的“传代效应”。而且据相关报道, 在高感染复数下获得的重组蛋白的产量比低感染复数下低。因此, 低感染复数下杆状病毒感染昆虫细胞的研究日益受到重视。本研究将在气升式反应器中对感染策略的4个方面(不包括培养基的替换): MOI、TOI、ICD和DO进行优化。研究感染策略的文献一般只考察单因素对昆虫细胞-杆状病毒表达体系的影响。本研究将采用正交实验来进行感染策略的优化, 这种方法的优点是它不仅考虑了单因素对昆虫细胞杆状病毒表达体系的影响, 而且考虑到了各个因素间的相互影响。这样得到的

结果对实际生产有更大的参考价值。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

**1.1.1 培养基** Grace培养基(GBICO公司)、胎牛血清(GBICO公司)、酵母提取物及脂类复合物(GBICO公司)、Pluronic F-68(GBICO公司)。培养基组成: Grace培养基, 5%(体积分数, 下同)的胎牛血清, 1%的酵母提取物, 1.5%的脂类复合物, 0.1%的Pluronic F-68。贴壁培养、摇瓶悬浮培养和气升式反应器培养的培养基相同。

**1.1.2 细胞、病毒及其计数** 棉铃虫细胞HzAM1由中国科学院武汉病毒所提供的美洲棉铃虫细胞系。将棉铃虫细胞HzAM1在含体积分数5%(正常的情况是10%)胎牛血清的Grace培养基于27℃下恒温培养。将细胞用质量分数0.4%台盼蓝染色后用血球计数板计数, 计算活细胞浓度及细胞存活率。棉铃虫病毒[Helicoverpa armigera single nucleocapsid nucleopolyhedro virus (HaSNPV)]由中国科学院武汉病毒所的王华林教授提供, 由该所构建提供的棉铃虫病毒(HaBacHZ8-eGFP-PH)带有绿色荧光蛋白(eGFP)。包涵体病毒浓度利用血球计数板在高倍显微镜下计数, 使用流式细胞仪测定非包涵体病毒滴度<sup>[12]</sup>。

### 1.2 仪器与设备

**1.2.1 常规仪器** 2001型振荡恒温培养箱(常

收稿日期:2012-02-27

基金项目:国家自然科学基金项目(20876120);武汉市科技攻关项目(20052002044)

作者简介:张佑红(1964-), 男, 湖南浏阳人, 教授, 博士, 博士研究生导师。研究方向:细胞生物学, 分子生物学。

州国华电器有限公司),荧光显微镜(Olympus BX-51),倒立式显微镜(XDS-1B),流式细胞仪(BD公司)超低温冰箱(New Brunswick Scientific),无油空气压缩机(扬州市恒顺机械厂),氧气瓶、氮气瓶(青岛华青集团有限公司),pH探头、氧探头(Broadley James公司),其他均为实验室常规仪器。

**1.2.2 气升式反应器** 本实验室设计的气升式反应器总体积 570 mL,有效体积 500 mL。配备有一个溶氧探头和一个 pH 探头,中间有 4 根金属导管,它们的作用分别是通气、取样、放气和加料。通气导管从容器底部通入无菌的空气、氧气和氮气,它的作用主要有两个:通入的气体推动溶液在反应器中循环流动,使细胞悬浮生长;通过空气、氧气和氮气的比例来调节溶氧的大小。通过计算机自动控制反应器中的溶氧值和 pH 值。

### 1.3 实验方法

将生长良好的细胞接种在 100 mL 的摇瓶中在振荡培养箱中培养。其中接种体积为 25 mL,培养温度为 27 °C,转速为 80 r·min<sup>-1</sup>。每 12 h 取样在血细胞计数板上测定细胞浓度,待细胞浓度达到实验要求后转入气升式反应器中培养。本实验设计了正交实验,四因素为感染复数、感染时间、细胞初始浓度和溶氧值。每个因素设计了 3 个水

平。正交实验水平见表 1。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平	Factors			
	ICD(A)/ (10 <sup>5</sup> cells·mL <sup>-1</sup> )	MOI(B)	TOI(C)	DO(D)
1	1	0.01	早期	10%
2	2	0.1	中期	30%
3	3	1	晚期	50%

其中 ICD 为细胞接种气升式反应器时的细胞浓度,而不是细胞被感染时的细胞浓度。TOI 为细胞处于对数生长期的初期、中期、晚期。

根据以上的正交表,一共进行了 9 组实验,细胞接种气升式反应器后,每 24 h 采样测定活细胞浓度及细胞存活率,接种病毒后,每 6 h 采样测定 BV 滴度和 OV 浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 数据分析

由正交实验得到的图 1、2,其最大 BV 滴度和 OV 浓度见表 2。表中的  $k_m$  和  $k'_m$  值直接反映不同水平对实验结果影响的大小, $R$  和  $R'$  值直接反映不同因素对实验结果影响的大小。从表 2 中可知,

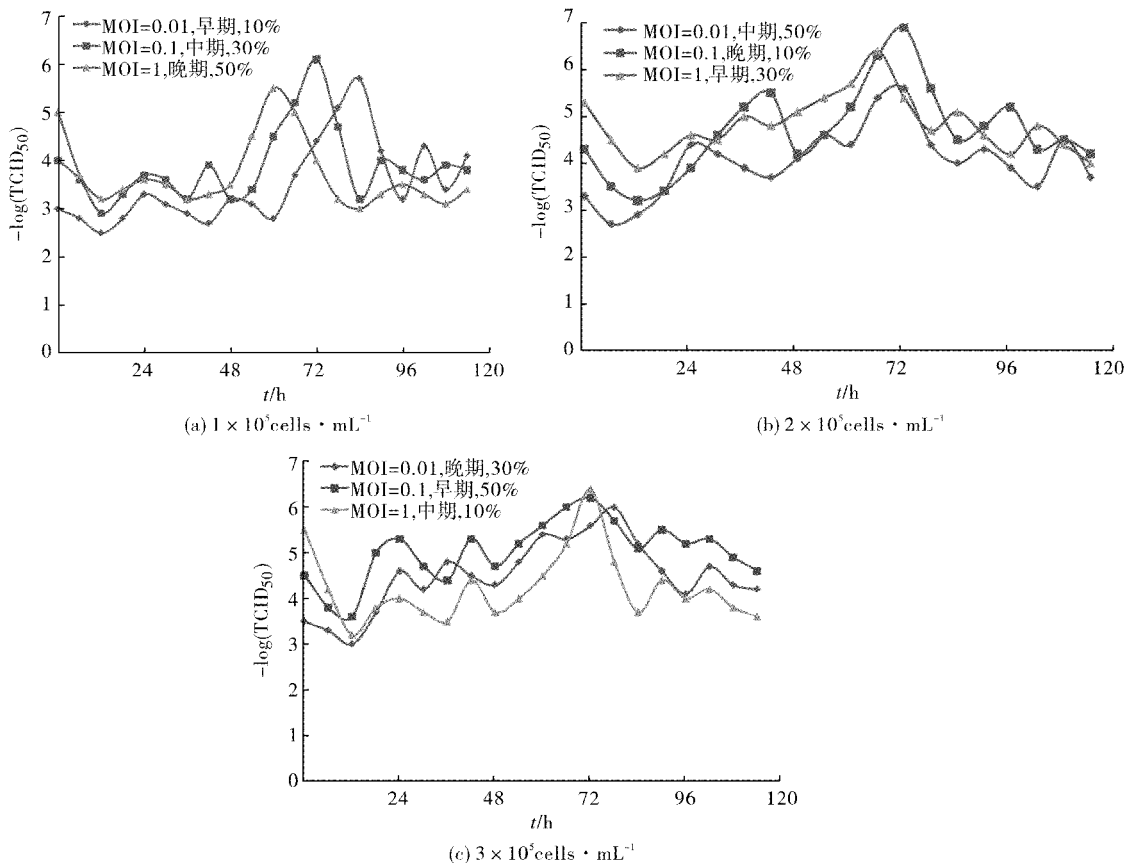


图 1 不同细胞初始浓度下的 BV 病毒滴度

Fig. 1 Evolution of minus logarithm of TCID<sub>50</sub> under different ICDs

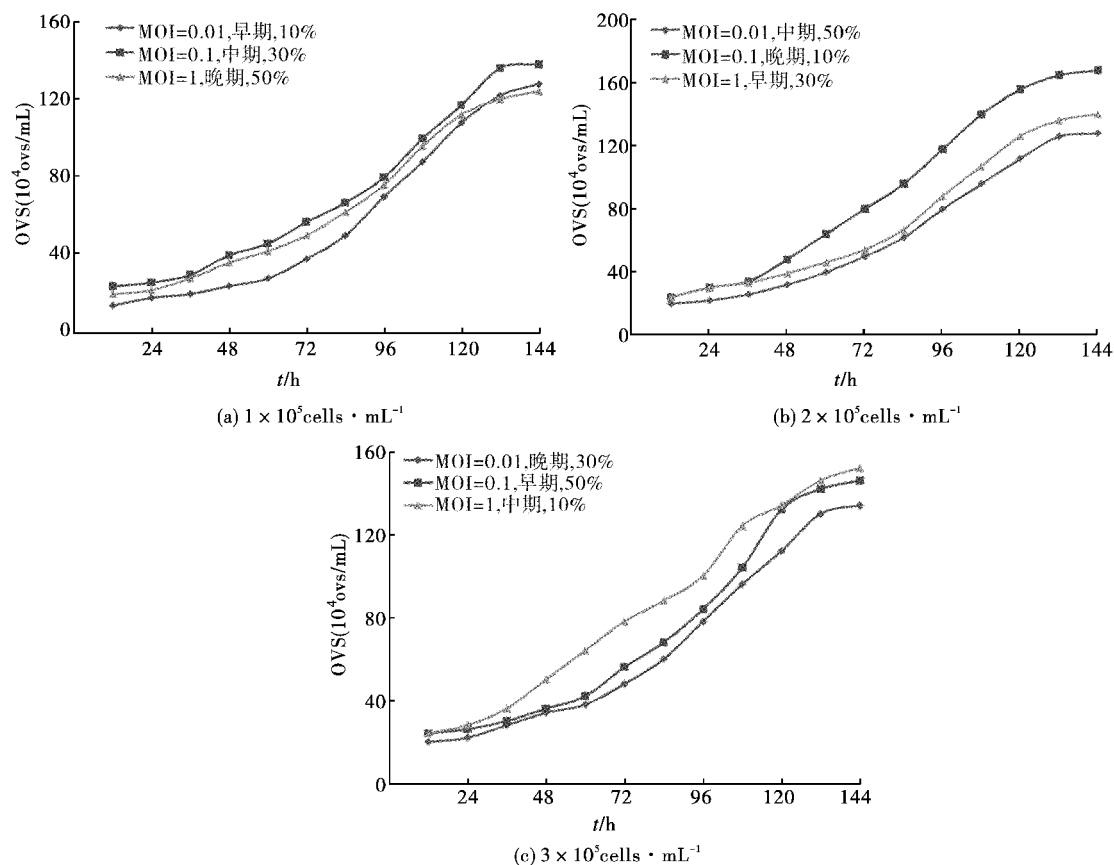


图 2 不同细胞初始浓度下的 OV 病毒浓度

Fig. 2 Evolution of amount of OVs under different ICDs

表 2 正交实验设计及结果 (BV 和 OV 滴度)

Table 2 Effects of MOI, ICD, TOI and DO on BV titer and OV titer

编号	ICD(A)/ ( $10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	MOI(B)	TOI(C)	DO(D)	BVmax/ ( $10^5 \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	OVmax/ ( $10^4 \text{ OVs} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
1	1	1	1	1	5.01	128
2	1	2	2	2	12.59	138
3	1	3	3	3	3.16	124
4	2	1	2	3	3.98	128
5	2	2	3	1	79.43	168
6	2	3	1	2	25.12	140
7	3	1	3	2	10	134
8	3	2	1	3	15.85	146
9	3	3	2	1	25.12	152
$k_1$	6.92	6.33	15.33	36.52		
$k_2$	36.18	35.96	13.9	15.9		
$k_3$	17	17.8	30.86	7.66		
$R$	29.26	29.63	16.96	28.86		
$k'_1$	130	130	140	149.3		
$k'_2$	147.3	150.7	139.3	137.3		
$k'_3$	144	132.7	142	132.7		
$R'$	17.3	20.7	2.7	16.6		

在条件  $A_2B_2C_3D_1$  下能够获得最大的 BV 滴度  $7.943 \times 10^6 \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 而且从  $k_m$  值可知最佳条件也是  $A_2B_2C_3D_1$ . 也就是说在棉铃虫细胞-杆状病毒体系中, 细胞初始浓度为  $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 细胞处于对数生长期晚期, DO 为 10% 时, MOI 值为 0.1 进行感染, 能够得到最大的 BV 滴度. 从表 2 中还可知, 获得最大的 OV 浓度为  $1.68 \times 10^6 \text{ OV}_s \cdot \text{mL}^{-1}$ , 从  $k'_m$  中也可知最佳条件也是  $A_2B_2C_3D_1$ . 因此在棉铃虫细胞-杆状病毒体系中, 细胞初始浓度为  $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 细胞处于对数生长期晚期, DO 为 10% 时, MOI 值为 0.1 进行感染, 能够得到最大的 BV 滴度. 这说明了杆状病毒的两种不同类型 (BV 和 OV) 的产量密切相关.

## 2.2 ICD、MOI、TOI 和 DO 对 BV 和 OV 滴度的影响

从表 2 中的  $k_m$  和  $k'_m$  可知, 在棉铃虫细胞-杆状病毒体系中, 细胞初始浓度为  $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 细胞处于对数生长期晚期, DO 为 10%, MOI 值为 0.1 时进行感染, 能够得到最大的 BV 和 OV 滴度. 表 2 中  $R$  和  $R'$  值可以反映因子对实验结果的大小, MOI、ICD、DO 和 TOI 的  $R$  值大小依次为  $29.63 > 29.26 > 28.86 > 16.96$ , 可以说明 MOI 对 BV 滴度的影响最大, ICD 次之, DO 次之, TOI 最小. MOI、ICD、DO 和 TOI 的  $R'$  值大小依次为  $20.7 > 17.3 > 16.6 > 2.7$ , 同样表明 MOI 对 OV 滴度的影响最大, ICD 次之, DO 次之, TOI 最小. 对于 MOI, 当 MOI 为 1.0 时, 相对于 MOI 为 0.01 和 0.1 时, 大部分细胞在初期就被感染, 使得很多细胞散失了繁殖能力, 因此, BV 和 OV 的产量将在二次和多次感染的时候大幅度降低. 相反, 当 MOI 为 0.01 时, 在第一次感染时, 很少量的细胞被感染, 产生的子代病毒相对较小, 大部分细胞会继续, 形成了一个细胞生长速度与病毒扩增速度的竞争, 但在这个过程中从病毒开始感染到细胞进入死亡期, BV 滴度一直不高. 当 MOI 为 0.1 时, 病毒在二次或者三次感染后, 基本所有的细胞全部被感染, 这样不仅能够得到大量的病毒, 还充分利用了细胞. 设定的 3 个细胞初始浓度依次为  $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $3 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ . 当细胞初始浓度为  $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 细胞浓度比较低, 进入多次感染的细胞很少. 而对于  $3 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 进入多次感染的细胞太多, 多余的细胞继续生长, 与病毒的扩增相互竞争, 不利于病毒的扩增. 因此, 细胞初始浓度为  $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  相对更容易收获高产量的病毒. 在 DO 为 50% 和 30% 时, 体系中的溶氧

值过高对病毒的扩增有一定的抑制作用, 因此 DO 值为 10% 时相对收获的病毒滴度高. 在对数生长期初期接种病毒, 相对于对数生长期中期和晚期接种病毒, 有一个更好的细胞生长周期和病毒的感染循环, 但是相对于 MOI、ICD 和 DO 对病毒滴度的影响最小.

## 3 结 语

本研究是针对低感染复数下昆虫细胞-杆状病毒表达体系在气升式反应器中的感染策略优化, 对 BVs 和 OV<sub>s</sub> 产量的影响考察了 4 个因素: MOI、ICD、DO 和 TOI. 采用正交实验来选择最佳感染条件, 结果表明 MOI 对 BVs 和 OV<sub>s</sub> 产量影响最大, ICD 次之, DO 次之, TOI 对 BVs 和 OV<sub>s</sub> 影响最小; 最佳感染条件为: MOI 为 0.1, ICD 为  $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ , DO 为 10%, TOI 为细胞生长对数期晚期, 得到了较高的 BV 滴度为  $7.943 \times 10^6 \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ . 但是本研究并没有在更低的 DO 环境下优化, 而在低感染复数下细胞处于对数生长期初期对病毒的产量有更好的感染循环. 因此在下一步的工作中, 可以在低 DO、TOI 为细胞生长对数期初期进行优化, 可能获得更高的 BV 滴度和 OV 浓度. 此外, 本研究讨论了 MOI、ICD、DO 和 TOI 的相互关系及对病毒产量的影响. 这为昆虫病毒杀虫剂的大规模生产提供了一定的根据.

## 参考文献:

- [1] Maiorella B, Inlow D, Shauger A. Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production [J]. Biotechnology, 1998, 6: 1406-1410.
- [2] Wickham T J, Nemerow G R, Wood H A. Comparison of different cell lines for the production of recombinant baculovirus proteins [J]. Methods Mol Biol, 1995, 39: 385-395.
- [3] 张佑红, 陈燕, 吴元欣, 等. 培养基 Grace's 对棉铃虫细胞 HzAm1 培养的改进 [J]. 化学与生物工程, 2007, 24: 49-51.
- [4] 张佑红, 王华林, 陈燕, 等. 适合棉铃虫细胞 HzAm1 生长的培养基筛选及低血清驯化 [J]. 生物工程学报, 2006, 22: 686-688.
- [5] 赵亮, 张佑红, 靖志强, 等. 反应器结构和表观气速对昆虫细胞在气升式反应器中培养的影响 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28: 136-139.
- [6] Power J F, Reid S, Radford K M. Modeling and optimization of the baculovirus expression vector system in batch suspension culture [J]. Biotechnol Bioeng, 1994, 44: 710-715.
- [7] 张佑红, 靖志强, 马静, 等. 重组杆状病毒感染悬浮

- 昆虫细胞感染策略优化及扩大试验[J]. 化工学报, 2010(4): 4-7.
- [8] Maranga L, Cunha A, Clemente J, et al. Scale up of virus like particles production: effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 107 (1): 55-64.
- [9] Rodas V M, Marques F H, Honda M T, et al. Cell culture derived AgMNPV bioinsecticide: biological constraints and bioprocess issues [J]. Cytotechnology, 2005, 48 (1/2/3): 27-39.
- [10] Kumar A, Shuler M L. Model of a split-flow airlift bioreactor for attachment-dependent, baculovirus infected insect cells [J]. Biotechnol Prog, 1995, 11 (4): 412-419.
- [11] Zhang Y H. Multi-peak phenomenon of insect cell infection with baculovirus at low multiplicity of infection [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2005, 37 (12): 857-861.
- [12] 徐鹏, 张佑红, 杨益, 等. 流式细胞术快速检测杆状病毒滴度[J]. 武汉工程大学学报, 2010(1): 57-60.

## Optimization of infection strategy for baculovirus in airlift reactor

ZHANG You-hong, YANG Wen, WEI Wei, XU Zhi-peng, SU Teng-jia

(Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education,  
School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** To get the best conditions for the baculovirus infection of suspension insect cells, an orthogonal design was used to select the optimum conditions, in which the effects of multiplicity of infection (MOI), time of infection (TOI), initial cell density (ICD) and dissolved oxygen (DO) on the budded virus (BV) titer and occluded virus (OV) number were evaluated in the HzAM1 insect cell-recombinant baculovirus system at a low MOI in airlift reactor. The results show that the best conditions for the infection are MOI of 0.1, initial cell density of  $2 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ , infection at the late exponential phase and DO of 10%, and a maximum BV concentration of  $7.943 \times 10^6 \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$  is obtained, a maximum OV concentration of  $1.68 \times 10^6 \text{ OVs} \cdot \text{mL}^{-1}$  is obtained.

**Key word:** baculovirus; insect cell; infection strategy

本文编辑: 张 瑞



(上接第 21 页)

## Preparation and inhibition adsorption behavior of new corrosion inhibitor containing sulfur

Yang Guang-hong<sup>1</sup>, Liu Dong<sup>1</sup>, Ding Yi-gang<sup>1</sup>, Zha Shu-yi<sup>2</sup>, Yang Chang-yan<sup>1</sup>

(1. Key Lab for Green Chemical Process of Ministry of Education, Key Lab for Novel Reactors and Green Chemical Technology of Hubei Province, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China; 2. Hubei Xunda Pharmaceutical Co., LTD, Wuxue 435400, China)

**Abstract:** Dextrofosfomycin levophenethylamine salt was used as the outset raw material to prepare HEHSP - (Na)<sub>2</sub>, a new corrosion inhibitor containing sulfur. The inhibition efficiency of HEHSP - (Na)<sub>2</sub> was tested by weight loss and electrochemistry polarization methods. And the absorbance of HEHSP - (Na)<sub>2</sub> on Q235 carbon steel was preliminarily discussed. The results show that HEHSP - (Na)<sub>2</sub>, as a complex inhibitor, gives nice inhibition efficiency on Q235 carbon steel in hydrochloric acid medium, its adsorption conforms to Flory - Huggins uniform temperature equation, which is multi - molecular layer layer adsorption, and belongs to physical adsorption.

**Key Words:** corrosion inhibitor; inhibition efficiency; adsorption

本文编辑: 张 瑞