

文章编号: 1004 - 2490(2022)05 - 0577 - 12

微载体规模化培养草鱼鳔细胞以增殖Ⅱ型草鱼呼肠孤病毒的工艺研究

杨玉茹^{1,2}, 王英英², 王庆², 周文礼¹, 尹纪元², 石存斌²

(1. 天津农学院水产学院, 天津 300384; 2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部渔药创制重点实验室, 广东省水产动物免疫与绿色养殖重点实验室, 广州 510380)

摘要: 为优化草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)鳔细胞(CiSB)细胞悬浮培养工艺,以提高基因Ⅱ型草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)含量,利用 Cytodex 1 微载体悬浮培养系统规模化培养 CiSB 和Ⅱ型 GCRV,对 CiSB 细胞初始接种密度、搅拌转速和微载体浓度等工艺参数进行摸索和优化。结果显示,在 CiSB 细胞贴壁期,以转速 30 r·min⁻¹、每静置 30 min 搅拌 2 min 的间歇搅拌方式培养最佳,4 h 后细胞贴附率可达 96% 以上;在微载体密度 2 g·L⁻¹、细胞初始接种密度 2 × 10⁵ 个·mL⁻¹、搅拌速度 30 r·min⁻¹ 的条件下,初始培养血清浓度设定为 10%,培养 3 d 后更换 50% 的培养基并使血清浓度达到 5%,可获得最佳的细胞生长效能。CiSB 经消化转移放大至 1 L,微载体上细胞贴附均匀、生长良好。接种Ⅱ型 GCRV 至规模化培养的 CiSB 细胞,拷贝数最高达 6.2 × 10⁵ 拷贝数·μL⁻¹。研究结果可为草鱼出血病疫苗的规模化生产工艺研究提供依据。

关键词: 草鱼鳔细胞(CiSB); Ⅱ型草鱼呼肠孤病毒; 微载体培养; 工艺优化

中图分类号: S 942.5 **文献标志码:** A

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国最重要的淡水经济鱼类之一,其产量约占全国淡水养殖总量的 18%,其产值一直稳居我国养殖淡水鱼的首位^[1]。草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)会引起草鱼出血病,近些年大规模暴发的草鱼出血病严重地阻碍了草鱼养殖业的健康发展^[2-3]。草鱼呼肠孤病毒在血清学上尚无系统分类。基于各分离株不同基因节段编码的氨基酸序列构建的系统进化树表明,我国的 GCRV 分离株可分为 3 个基因型,分别是以 873 为代表的基因 I 型病毒(GCRV-I)、以 HZ08 为代表的基因 II 型病毒(GCRV-II)和以 HGDRV 为代表的基因 III 型病毒(GCRV-III)^[4-7]。目前,国内流行的 GCRV 基因型主要为 GCRV-II,占阳性检出比例 95% 以上^[8]。与 GCRV-I 和 GCRV-III 相比,

GCRV-II 对鱼体致病性强,但对细胞敏感性弱,接种常见的鱼类细胞均不能产生明显的细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),且病毒增殖滴度较低^[9],不利于诊断和防控产品的研发。YANG 等^[10]建立的草鱼鳔组织细胞系(grass carp swim bladder cells, CiSB)对Ⅱ型 GCRV 敏感,可用于增殖Ⅱ型 GCRV 的研究。

迄今为止,尚无任何特效药物可用于草鱼出血病的治疗,免疫预防是最有效的防控措施^[11]。传统的疫苗主要包括灭活疫苗和减毒疫苗,基因工程疫苗的研究也取得了一定的进展^[12]。但已有疫苗研发是以针对基因 I 型 GCRV 为主,而针对流行基因 II 型 GCRV 疫苗研究相对滞后^[13]。基于分子流行病学数据,采用新分离的流行株型进行疫苗制备,是目前防控草鱼出血病的关键。

收稿日期: 2021 - 01 - 14

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD0900103);中国水产科学研究院中央公益性科研院所基本科研业务费专项(2020XT0403);广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515010327);国家大宗淡水鱼产业技术体系(CARS-45);广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项资金(2022KJ150,2022KJ119)

作者简介: 杨玉茹(1995—),女,山西运城人,硕士研究生,研究方向:水产病害与防控。E-mail: yyr1048@163.com

通信作者: 王庆,研究员。E-mail: sunny_929@163.com

对草鱼细胞和病毒流行株的大规模培养技术的研究,是草鱼出血病疫苗规模化生产的重要基础^[14]。

新型的微载体悬浮培养细胞技术具有单位体积利用率高、参数易控制等优点,目前在哺乳动物细胞培养及产物制备领域已经有了较为广泛的应用,如狂犬病疫苗等已实现工业化的大规模生产^[15]。在水产动物疫苗研发中微载体培养技术仍然处于探索阶段,CHEN等^[16]建立了基于低血清培养的鲑鱼属鱼类(*Oncorhynchus*)胚胎细胞(Chinook salmon embryo cells, CHSE)的大规模培养体系;王维玲等^[17]利用 Cephodex 微载体对鲫(*Carassius auratus*)脑组织细胞(gibel carp brain cells, GiCB)和鲤疱疹病毒 II 型(cyprinid herpesvirus II, CyHV-2)的规模化条件进行了探索和优化;贾路路等^[18]优化了大鲵(*Andrias davidianus*)肌肉细胞(giant salamander muscle cells, GSM)和大鲵虹彩病毒(Chinese giant salamander iridovirus, GSIV)的 Cytodex 3 微载体培养体系等。在草鱼出血病疫苗规模化生产工艺上,叶雪平等^[19-20]利用 GT-2 微载体分别对草鱼的吻端细胞 ZC-7901 和胚胎细胞 CP-80 以及草鱼呼肠孤病毒的培养条件进行了研究。刘秋凤等^[21]对草鱼 CIK 细胞与草鱼呼肠孤病毒在 Cephodex 结合微载体规模化培养的工艺条件进行了优化,但目前还未见针对流行基因型 II 型 GCRV 的大规模细胞培养、疫苗生产的相关研究报导,微载体细胞培养技术在水产疫苗应用上尚未成熟,已有研究都处于初期摸索阶段。

本研究利用微载体培养 CiSB 细胞,并对大规模培养细胞工艺进行优化探索,同时进行 II 型 GCRV 扩增培养,以期对草鱼出血病 II 型 GCRV 疫苗的制备和工业化生产提供技术参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

草鱼鳃细胞系(CiSB)由本实验室建立并保存,其培养条件为含 10% 胎牛血清的 M199 培养基,培养温度为 28℃;草鱼呼肠孤病毒 HN1307 株(GCRV HN1307)由本实验室从患病草鱼上分离鉴定并保存^[22]。

1.2 主要试剂与仪器

M199 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum,

FBS)和胰酶购自美国 Gibco 公司;125 mL、1 L 双侧臂细胞培养瓶购自美国 Wheaton 公司;底面积 75 cm² 细胞培养瓶(T-75)购自美国 Corning 公司;微载体选择 Cytodex 1(GE, 美国);磁力搅拌装置为 Micro-Stir 低速磁力搅拌器(Wheaton, 美国);全自动细胞计数仪为 Countstar BioTech(艾力特, 上海)。

1.2 实验设计

1.2.1 细胞与病毒培养

将 CiSB 细胞在 T-75 培养瓶中传代培养。接种 10³ 拷贝数·μL⁻¹ 浓度 1 mL GCRV HN1307 至单层的 CiSB 细胞中,7 d 后收获病毒,-80℃ 条件下反复冻融 3 次,然后在 4℃ 条件下以 5 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 去除细胞碎片。测定病毒拷贝数并置于 -80℃ 冰箱保存备用^[23]。

1.2.2 微载体预处理

称量干燥后的微载体并加入硅化过的玻璃瓶中,在无 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的磷酸缓冲液(HBSS)(50~100 mL·g⁻¹ Cytodex 1)在 37℃ 条件下水合 3 h。膨胀后去上清液,用新鲜的 HBSS(30~50 mL·g⁻¹ Cytodex 1)洗涤微载体。洗涤后去上清液,加入新鲜的 HBSS(30~50 mL·g⁻¹ Cytodex 1)在 121℃ 条件下高压蒸汽灭菌 30 min,置 4℃ 冰箱备用。

1.2.3 最佳起始条件与间歇搅拌方式的确定

取对数生长期的 CiSB 细胞接种于 125 mL 规格的双侧壁细胞培养瓶内,按表 1 中的起始条件与贴壁期间歇搅拌条件进行培养,并于接种后 0.25 h、0.5 h、0.75 h、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h 时取样观察 CiSB 细胞在微载体上的贴附情况,计算 CiSB 在 Cytodex 1 上的贴壁率(贴壁率=1-未贴壁细胞数/接种细胞数×100%),并绘制不同时间的贴附曲线,以获得细胞微载体悬浮培养最优起始及间歇搅拌方式参数。

1.2.4 最佳胰酶消化参数的确定

用 125 mL 双侧壁细胞培养瓶培养细胞,24 h 后,在超净台中于搅拌状态下均匀取 5 mL 培养物至离心管中,静置使微载体沉降,吸去上清液并用 HBSS 清洗 2 次。在 4℃ 和 37℃ 条件下,分别加入 0.25% 和 0.5% 的胰酶进行消化 1、3、5 min,分组信息见表 2。消化后弃置消化液,加入相同体积含 5% FBS 的 M199 培养基。对细胞进行计数并观察微载体空球率,确定适宜的消化浓

度、温度及时间。

1.2.5 最佳细胞接种密度的确定

Cytodex1 的用量为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 工作体积为 100 mL, 细胞初始接种密度分别设置为 $1 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $3 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $4 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 将细胞接种于 125 mL 双侧壁培养瓶中, 在 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中搅拌悬浮培养 ($30 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 每隔 24 h 取样观察 CiSB 细胞在 Cytodex1 上的生长情况, 绘制细胞生长曲线, 确定细胞最佳接种密度。

1.2.6 最佳微载体密度的确定

Cytodex1 密度分别设置为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 细胞接种密度为 $2 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 工作体积为 100 mL。接种对数生长期细胞后, 于培养箱中 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 悬浮培养 ($30 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 每隔 24 h 取样观察 CiSB 细胞在 Cytodex1 上的生长情况, 并进行细胞计数, 绘制细胞生长曲线, 确定 Cytodex 1 的最佳用量。

1.2.7 最佳搅拌速度的确定

取对数生长期的 CiSB 细胞接种于 125 mL 双侧壁细胞培养瓶中, 接种密度为 $2 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$, Cytodex1 用量为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}$, 工作体积为 100 mL。经 4 h 间歇搅拌贴壁后, 分别设置转速为 15、30、45、60 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行连续搅拌培养, 每隔 24 h 取样观察细胞在 Cytodex1 上的生长情况并计数, 确定最佳搅拌速度。

1.2.8 不同补料方式对悬浮培养的影响

取对数生长期的 CiSB 细胞接种于 125 mL 侧壁细胞培养瓶中, 接种密度为 $2 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 初始培养基采用含 10% FBS 的 M199 培养基, Cytodex1 密度为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 工作体积为 100 mL。分别采用分批式培养、接种 2 d 后每天更换 10% 培养基和接种 3 d 后 1 次性更换 50% 培养基进行培养, 每隔 24 h 取样观察在 Cytodex1 上的生长状况, 并进行细胞生长曲线的绘制。

1.2.9 血清维持液对悬浮培养的影响

取对数生长期的 CiSB 细胞接种于 125 mL 双侧壁细胞培养瓶中, 接种密度为 $2 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 初始培养基采用含 10% FBS 的 M199, Cytodex1 密度为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 工作体积为 100 mL。在接种 3 d 后更换 50% 培养基并调整血清浓度至含 5%、8%、10%、15% FBS 的 M199, 每隔 24 h 取样观察在 Cytodex1 上的生长状况, 并进行细胞生长曲线的绘制。

1.2.10 1 L 悬浮培养扩增工艺

测定 125 mL 双侧壁培养瓶的细胞浓度, 弃去生长液, 注入 HBSS 清洗两次, 加入 10 mL 0.5% 的胰酶消化, 3 min 后注入含 10% FBS 的 M199 终止消化。1 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5min 收集细胞, 接种至 1 L 双侧壁培养瓶中并补足体积至 500 mL, 3 h 后补足培养液至 1 L。按照 125 mL 双侧壁培养瓶设定好的培养参数进行扩增培养。

表 1 贴壁期循环搅拌参数设置

Tab. 1 Parameter setting of agitation procedure during cell attachment

参数设置 Parameter setting	组别 Group					
	A	B	C	D	E	F
起始培养体积/mL Initial culture volume	50	50	100	50	100	50
搅拌时间/min Mixing time	2	2	2	2	2	240
静置时间/min Standing time	20	30	30	45	45	0
搅拌速度/($\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) Stirring speed	30	30	30	30	30	15
培养时间/h Culture time	4	4	4	4	4	4

表 2 胰酶消化参数

Tab. 2 Trypsin digestion parameters

消化时间 Digestion time	组别 Group			
	0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA		0.5% 胰酶 + 0.02% EDTA	
	4 $^\circ\text{C}$	37 $^\circ\text{C}$	4 $^\circ\text{C}$	37 $^\circ\text{C}$
1 min	A1	B1	C1	D1
3 min	A2	B2	C2	D2
5 min	A3	B3	C3	D3

1.2.11 GCRV HN1307 株增殖和测定

在培养 24 h 后,观察到 CiSB 在 Cytodex 1 上长成单层,静置一段时间待 Cytodex1 沉降到底双侧壁培养瓶底部,弃去上层培养液,接种 10 mL II 型 GCRV (GCRV HN1307 株), $15 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下连续搅拌促进病毒吸附,2 h 后换 5% FBS 的维持液至体积 100 mL,以 $30 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行连续搅拌培养细胞和病毒。同时在 T-75 培养瓶中仅接种病毒作为贴壁培养的对比。在接种病毒后每隔 24 h 取细胞培养液 1 mL,在 -80°C 条件下反复冻融 3 次,用 qPCR 测定病毒拷贝数^[21];实验持续 7 d,绘制病毒增殖动态曲线。

1.3 数据处理与分析

本研究中所有实验均重复 3 次,实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,细胞密度的差异通过 *t* 检验来分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 最佳起始条件及间歇搅拌培养条件结果

不同起始条件下培养的 CiSB 细胞贴壁率如图 1 所示,其中 A、C、E、F 组贴壁率均低于 90%,在初始培养体积为 100 mL 的组别中:C 组和 E 组贴壁率显著低于其他组 ($P < 0.05$)。在初始培养体积为 50 mL 的组别中:A 组贴壁率相对较低;F 组贴壁率达 86%;D 组贴壁率达 92%,但由于静置时间过长,微载体上细胞贴壁未能均匀分布;B 组贴壁率可达 96% 且贴附均匀,因此选择 B 组 (50 mL 培养体积、静置 30 min) 为贴壁期最佳培养条件。

B 组不同贴附时间的细胞贴附率如图 2 所示。随着贴壁时间的延长,细胞贴壁率逐渐上升;且在间歇搅拌 2 h 后达到平台期,贴壁率达到 96%。因此最佳间歇搅拌时间应为 3 h,而后补加培养基至 100 mL 工作体积进行连续不间断搅拌悬浮培养。

2.2 最佳胰酶消化方式

细胞在微载体上培养 1 d 后,用不同消化方式所得细胞数如图 3 所示。结果显示,胰酶浓度为 0.5%、工作温度为 37°C 时消化效果显著好于胰酶浓度 0.25%、工作温度 4°C ($P < 0.01$)。

37°C 、0.5% 胰酶消化不同时间观察细胞。在消化 1 min 后测得细胞浓度为 7.3×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,显微镜下观察微载体上仍贴附有大量细胞;消化 3 min 时细胞浓度达 4.1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,显微镜下观察细胞分散良好,微载体基本为空球状态;消化 5 min 时细胞浓度下降,显微镜下观察部分细胞因消化过度破碎。因此确定含 0.02% EDTA 的 0.5% 胰酶 37°C 下消化 3 min 是细胞消化的最佳条件。

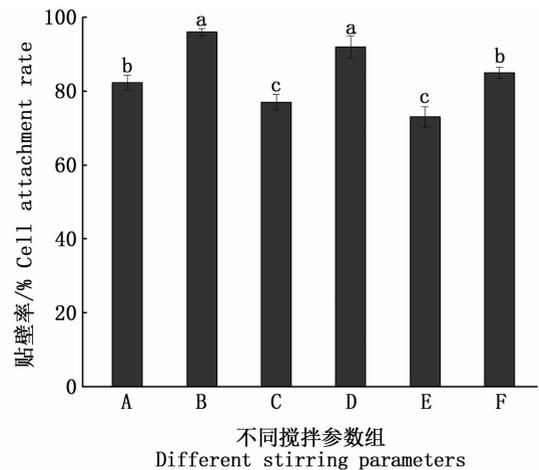


图 1 不同搅拌方式的最大贴壁率

Fig. 1 Cell attachment efficiency under different stirring methods

注:标有不同小写字母者表示组间差异显著 ($P < 0.05$)
Note: Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$)

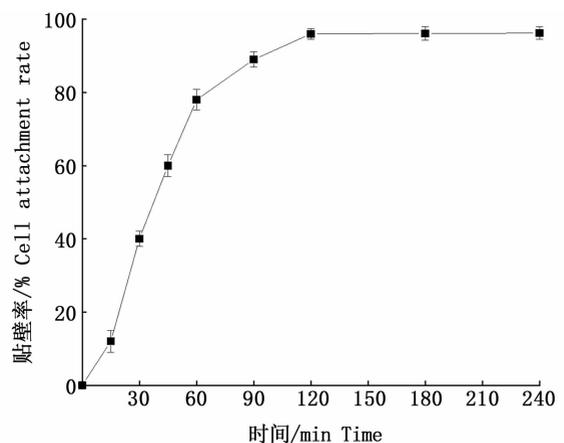


图 2 细胞在微载体上的贴附曲线

Fig. 2 Curve of cell attachment to microcarriers

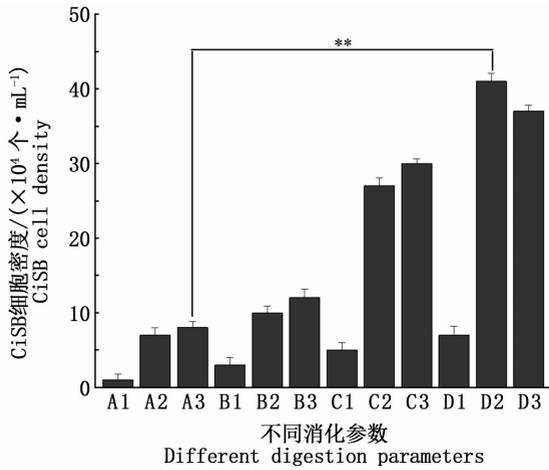


图3 不同消化方式获得的细胞数
Fig.3 Cell number obtained by different digestion methods

注: ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)
Note: ** means extremely significant differences ($P < 0.01$)

2.3 细胞接种密度对细胞悬浮培养的影响

当微载体密度为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不同初始细胞密度接种后在微载体上生长曲线的结果如图4所示。初始细胞密度 $1 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,单个微载体上分布的细胞少且出现较多微载体空载现象,细胞在接种5 d后仍在缓慢生长,最大细胞密度为 $9.2 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以 3×10^5 和 $4 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞密度接种时,最大细胞密度都达到 $1.7 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$,但显微镜下观察到单个微载体上分配的细胞数高,细胞对数生长期提前导致细胞在微载体上出现聚团生长、过早衰亡的现象,第4天大量脱落死亡。当细胞接种密度为 $2 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞呈现良好的线性增长;镜下观察到细胞可均匀分布于每个微载体表面,接种后5 d达最高收获浓度 $1.9 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此,确定微载体培养细胞时的最佳接种密度为 $2 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4 微载体密度对悬浮培养的影响

不同微载体密度对细胞生长曲线的影响见图5。在微载体密度较低的情况下,细胞密度随微载体密度的增加而增大;当微载体为 $1、2、3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞最大密度分别为 $8.7 \times 10^5、1.86 \times 10^6、1.89 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$;在 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,微载体出现大量空载。观察细胞及培养液状态,前48 h无明显变化。第3天,3和 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 微载体组

的培养液偏黄色,pH值下降,细胞脱落严重,而 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 微载体培养瓶中 CiSB 细胞覆盖微载体达95%以上。因此确定最佳微载体浓度为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

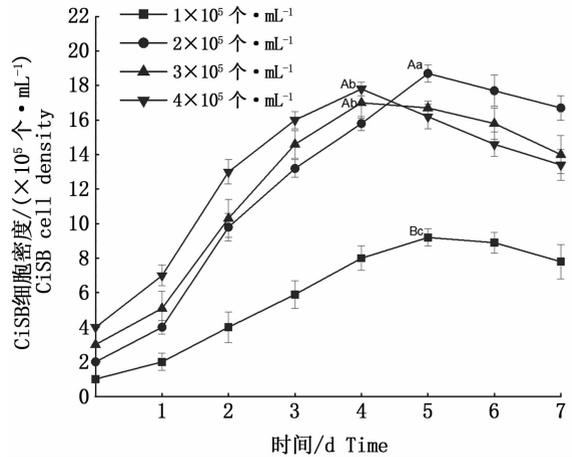


图4 不同细胞接种密度对微载体培养细胞生长的影响

Fig.4 Effects of initial cell density on cell growth on microcarriers

注:标有不同大写字母者表示组件差异极显著 ($P < 0.01$),标有不同小写字母者表示组间差异显著 ($P < 0.05$)
Note: The components marked with different capital letters indicate extremely significant differences ($P < 0.01$), marked with different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$)

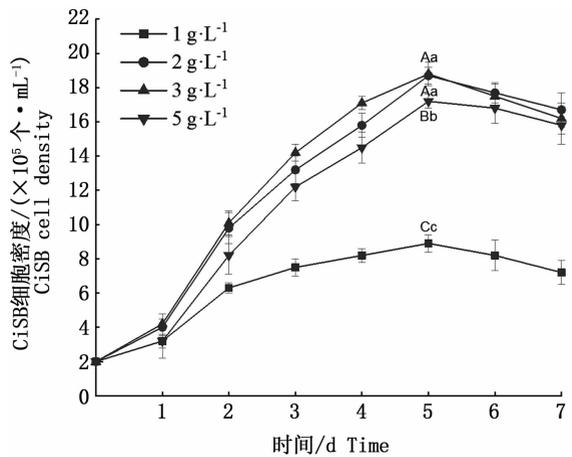


图5 不同微载体密度对微载体培养细胞生长的影响
Fig.5 Effects of microcarrier densities on cell growth on microcarriers

注:标有不同大写字母者表示组件差异极显著 ($P < 0.01$),标有不同小写字母者表示组间差异显著 ($P < 0.05$)
Note: The components marked with different capital letters indicate extremely significant differences ($P < 0.01$), marked with different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$)

2.5 搅拌速度对 CiSB 悬浮培养的影响

不同搅拌速度下的细胞生长趋势如图 6 所示。当搅拌速度为 $15 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,细胞生长缓慢,最大细胞浓度为 $8.8 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$;显微镜下观察,细胞在微载体表面生长不均匀且细胞生长有细胞团趋势。当搅拌速度为 $30 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $45 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,细胞密度上升较快,最高密度分别达 $1.86 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.88 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$,两者间差异不显著 ($P > 0.05$);虽然 $45 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 较 $30 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 早 1 d 到达最大密度,但细胞很快从微载体上大量脱落。搅拌速度为 $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时细胞密度上升较慢且第 4 天后细胞从微载体脱落严重。综上结果,确定最佳搅拌速度为 $30 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

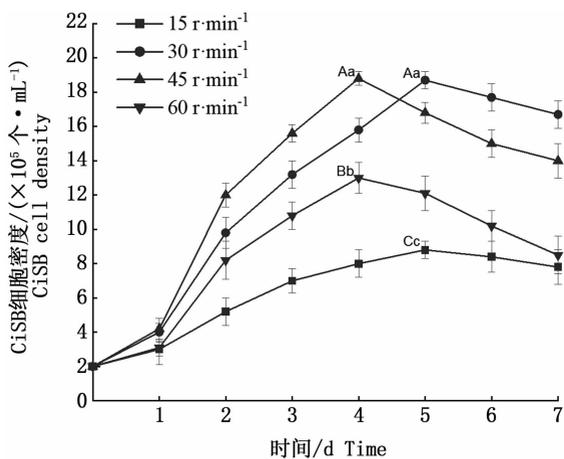


图 6 不同搅拌速度细胞生长曲线

Fig. 6 Cell growth curves at different stirring speeds

注:标有不同大写字母者表示组件差异极显著 ($P < 0.01$),标有不同小写字母者表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: The components marked with different capital letters indicate extremely significant differences ($P < 0.01$), marked with different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$)

2.6 不同补料方式对 CiSB 悬浮培养的影响

采用分批式培养,第 2 天起每天更换 10% 培养基以及第 3 天一次性更换 50% 培养基 3 种不同补料方式培养细胞,结果如图 7 所示。3 种补料方式最终所收获细胞密度并不显著,分批培养细胞密度最低,收获浓度为 $1.86 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。一次性更换 50% 培养基,细胞收获浓度达 $2.01 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$,略微优于每天更换 10% 培养基的 $1.95 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。考虑到每天进行补料,操作上更加繁琐,因此选择第 3 天一次性更换 50% 培养基为最优补料方式。

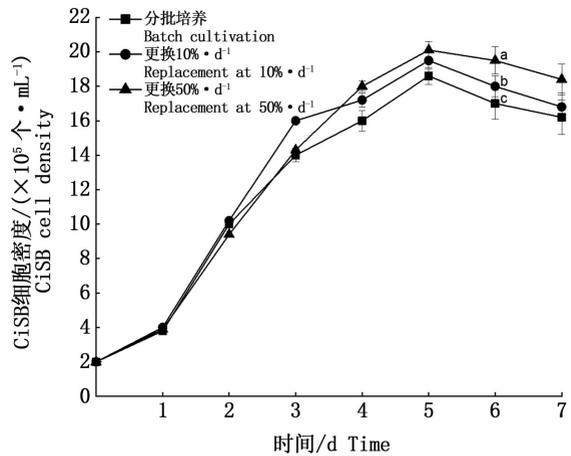


图 7 不同补料方式细胞生长曲线

Fig. 7 Cell growth curves under different feeding methods

注:标有不同小写字母者表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: The components marked with different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$)

2.7 血清维持液对 CiSB 培养的影响

初始时使用含 10% FBS 的 M199 培养基,在培养 3 d 后更换为含 5%、8%、10%、15% FBS 培养液,细胞生长曲线如图 8 所示。在达到细胞最大浓度之前,细胞生长速度随着 FBS 浓度增大而变快;但各组间最大细胞浓度无显著性差异,均在 $1.98 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上下。但在第 5 天,FBS 浓度增大导致细胞脱落速度变快,培养至第 7 天时,细胞在含 5% FBS 的培养液中维持效果相对最好。

2.8 CiSB 细胞在微载体上的生长形态观察

在倒置显微镜下观察不同时期 CiSB 细胞在 Cytodex 1 上的生长情况,结果显示 CiSB 细胞在 Cytodex 1 上具有良好的贴壁性(图 9)。CiSB 细胞接种 4 h 后,细胞逐渐贴附在 Cytodex 1 上,每个微载体上细胞数大致为 20 个;接种 1 d 后,CiSB 细胞在微载体上呈纤维状并开始缓慢增长;接种 3 d 后,细胞在微载体上基本长成单层;接种 5~7 d,细胞在首层细胞上开始多层生长并且微载体之间出现架桥现象;7 d 后,部分细胞从微载体上脱落。

2.9 1 L 悬浮培养工艺放大

将 CiSB 细胞培养体积从 100 mL 放大至 1 L 后,细胞生长曲线如图 10 所示。放大培养后细胞生长速度与在 125 mL 双侧壁培养瓶中的生长曲线大体相似,细胞浓度在第 5 天达到最高值,

为 1.71×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.10 微载体悬浮培养 GCRV II 型病毒的增殖动态

GCRV HN1307 在 CiSB 细胞中的增殖动态如图 12 所示。微载体培养条件下, GCRV 感染 CiSB 细胞 2 d 后病毒开始缓慢增殖, 随后进入对数生长期, 5 d 后达到峰值 6.2×10^5 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, 之后开始下降; 作为对照, GCRV HN1307 在 T-75 细胞瓶中培养, 第 6 天达到峰值 1.42×10^5 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

WEZEL 在 1967 年使用二乙基乙胺 (DEAE) 作为微载体创立了微载体培养系统^[24], 目前已经成为了疫苗生产的首选工艺。在众多的微载体中, Cytodex 1 是目前最常用的商用微载体, 其固体实心的结构有利于细胞贴壁及病毒的感染。本实验的研究结果表明, Cytodex 1 适合 CiSB 细胞的贴附生长及增殖。

微载体培养工艺涉及到很多复杂的参数, 其初始阶段中细胞的贴壁率, 是整个培养过程中最重要的影响因素^[25]。利用间歇搅拌方式, 可以提高细胞的贴壁效率与比率^[26]; 同时使细胞与微载

体在相对小的体系下搅拌培养, 可以提高细胞与微载体的接触机会。本研究中采用 50 mL 培养、静置 30 min、30 r $\cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌 2 min 的间歇搅拌方式使细胞贴附均匀; 对细胞贴壁时间进行观察, 最终确定间歇搅拌时间为 3 h, 与王维玲等^[16]获得的 35 r $\cdot \text{min}^{-1}$, 每静置 30 min 搅拌 2 min 的间歇搅拌条件结果类似。

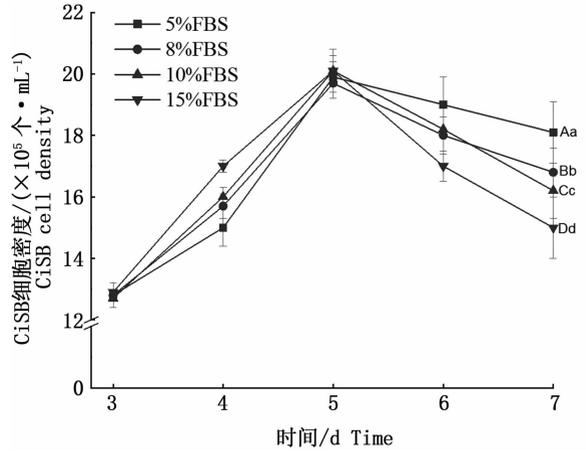


图 8 不同血清维持液对细胞生长的影响

Fig. 8 Effects of FBS concentration on cell growth

注: 标有不同大写字母者表示组件差异极显著 ($P < 0.01$); 标有不同小写字母者表示组间差异显著 ($P < 0.05$)
 Note: The components marked with different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$)

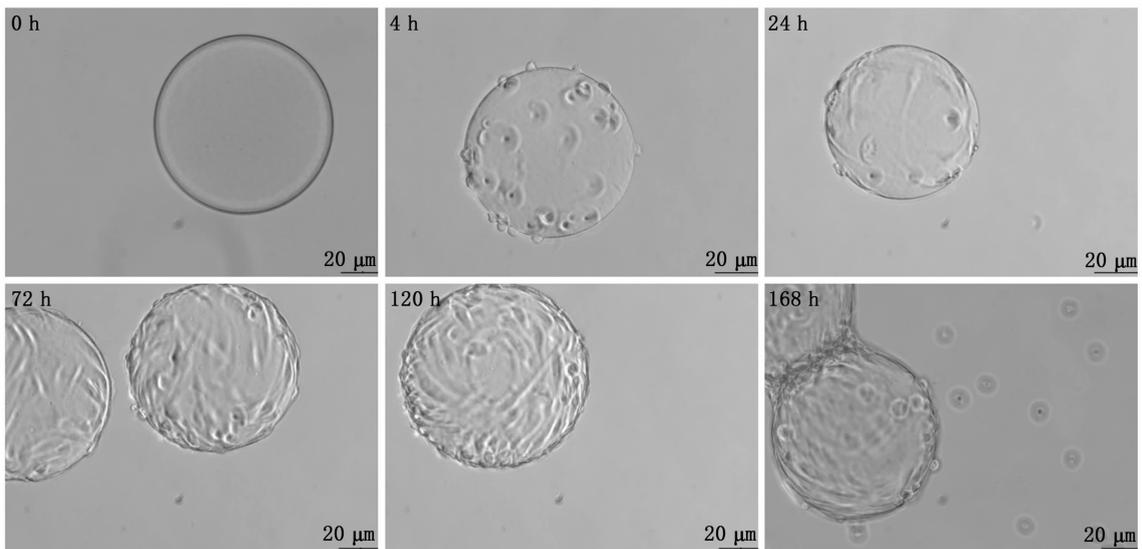


图 9 GiSB 细胞在微载体上的生长形态

Fig. 9 Growth morphology of GiSB cells on microcarriers

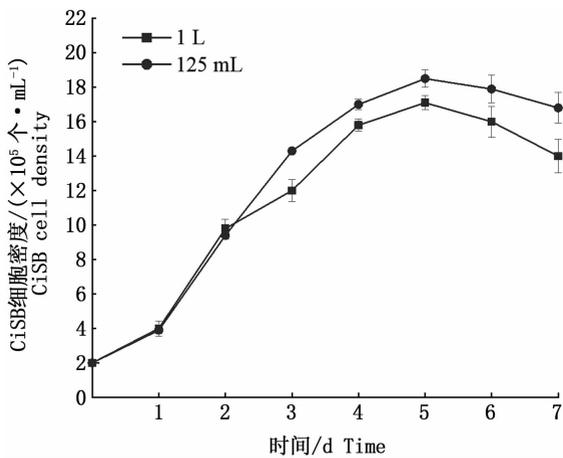


图 10 12 mL 和 1 L 悬浮培养细胞生长曲线

Fig. 10 Growth curve of cells in 125 mL and 1 L system

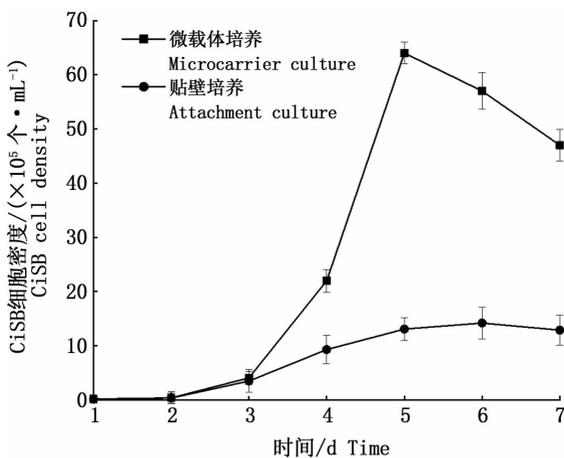


图 11 GCRV 在微载体培养条件下的增殖动态

Fig. 11 Proliferation dynamics of GCRV in microcarrier culture system

细胞的存活和生长依赖于接种密度和条件效应,低培养密度会导致低生长速率出现^[27];而最终的细胞产量与微载体密度直接相关。选择适当的接种比例,可以有效利用微载体,提高细胞产量^[28]。本实验中,以 1×10^5 个 \cdot mL $^{-1}$ 接种时,细胞生长缓慢,无法快速进入对数生长期。以 4×10^5 个 \cdot mL $^{-1}$ 密度接种时,细胞在 Cytodex 1 上聚团生长,使微载体聚集并沉降到瓶底。在高密度下培养细胞易脱落,造成细胞死亡,死亡细胞的代谢产物又易产生细胞毒性。在一定细胞接种浓度下,低浓度的微载体每 cm^2 的细胞产量与细胞生长能力有关;高浓度微载体的培养中可以得到最大单位表面积细胞产量,但需要频繁地

更换培养基。本研究中,当微载体密度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,由于微载体不能提供足够的表面积,细胞受到严重的接触抑制,生长缓慢。微载体密度为 3 和 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,后期 pH 下降迅速,需频繁更换培养液才能保证细胞正常生长;选择 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 满足了细胞生长所需的贴壁面积,细胞增殖快且培养基消耗量少,对大规模工业化细胞培养的成本控制有重要意义。此外, 1×10^5 个 \cdot mL $^{-1}$ 和 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的接种比例可以实现大多数研究得到的每个微载体上贴附 $8 \sim 20$ 个细胞可获得最好生长曲线的效果^[29-30]。

培养基作为细胞生长的营养来源,是影响微载体培养最直接的环境因素。其中血清可以在低细胞密度的条件下促进细胞粘附和生长;但在细胞进入指数生长期后,需要用最低血清既保证细胞生长,同时保持细胞单层状态^[31-32]。本研究中第 3 天更换血清浓度为 5% 时,可使细胞达到最大产量同时保持细胞的稳定生长。在补料方式的选择上,分批培养由于培养过程中营养成分不断消耗,代谢物累计,因此效果不理想^[33-34];第 3 天一次性更换 50% 培养基效果优于每天更换 10% 培养基,可能是由于每天置换 10% 的补料方式特定时间内更换量少,代谢物更易累积,抑制了细胞进一步增殖所致^[35-36]。

微载体扩大培养一般采用消化放大工艺,利用胰酶消化微载体上的细胞并接入更大规模反应器,补加新微载体和培养基进行新一轮的培养^[37],而胰酶 37°C 时活性最好^[38]。本实验中利用预热的含 0.02% EDTA 的 0.5% 胰酶消化 3min 后微载体上细胞基本能够成功脱离,无粘连、结团现象。按照 125 mL 体系中优化好的参数在 1 L 双侧壁培养瓶中培养,细胞生长曲线良好。

由于 II 型 GCRV 病毒接种细胞后不产生明显 CPE^[39],显微镜下无法观察到 CiSB 细胞产生特征性的 CPE,因此只能通过测定拷贝数的变化观察 II 型 GCRV 的增殖动态。病毒增殖后检测结果表明,利用微载体培养,病毒感染第 2 天进入对数生长期,第 5 天达到峰值,较贴壁细胞瓶中拷贝数升高 3 倍,表明该工艺适合于 II 型草鱼呼肠孤病毒的扩增。

本研究通过对 CiSB 细胞微载体悬浮培养工艺中的各项参数进行优化并进行 1 L 放大培养,初步建立了基因 II 型草鱼呼肠孤病毒的微载体

规模化培养工艺,细胞最大浓度可达 1.98×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,接种 GCRV II 型拷贝数最大达 6.2×10^5 拷贝数 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。研究结果可以为草鱼出血病流行基因型疫苗的规模化制备奠定前期基础。

参考文献

- [1] RAO Y L, SU J G. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp [J]. Journal of Immunology Research, 2015, 2 (9): 670437.
- [2] ZENG W W, WANG Y Y, GUO Y M, et al. Development of a VP38 recombinant protein-based indirect ELISA for detection of antibodies against grass carp reovirus genotype II (iELISA for detection of antibodies against GCRV II) [J]. Journal of Fish Diseases, 2018, 41 (12): 1811 - 1819.
- [3] 田飞焱, 曾伟伟, 张晓燕, 等. 2016 年江西地区草鱼呼肠孤病毒(GCRV)分子流行病学分析[J]. 江西水产科技, 2016(6): 19 - 23.
TIAN F Y, ZENG W W, ZHANG X Y, et al. Molecular epidemiological analysis of reovirus (GCRV) in grass carp in Jiangxi Province in 2016 [J]. Jiangxi Fisheries Science and Technology, 2016 (6): 19 - 23.
- [4] PEI C, KE F, CHEN Z Y, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of grass carp reovirus strain 109 (GCRV-109) with other grass carp reovirus strains reveals no significant correlation with regional distribution [J]. Archives of Virology, 2014, 159 (9): 2435 - 2440.
- [5] WANG Q, ZENG W W, LIU C, et al. Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China [J]. Journal of Virology, 2012, 86 (22): 12466.
- [6] FAN Y D, RAO S J, ZENG L B, et al. Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China [J]. Journal of General Virology, 2013, 94 (10): 2266 - 2277.
- [7] YE X, TIAN Y Y, DENG G C, et al. Complete genomic sequence of a reovirus isolated from grass carp in China [J]. Virus Research, 2012, 163 (1): 275 - 283.
- [8] 曾伟伟. 草鱼呼肠孤病毒分子流行病学、全基因组序列及流行株灭活疫苗研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
ZENG W W. Molecular epidemiology and genome sequence and inactivated vaccine of grass carp reovirus [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017.
- [9] WANG Q, ZENG W W, YIN L, et al. Comparative study on physical-chemical and biological characteristics of grass carp reovirus from different genotypes [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2016, 47: 862 - 872.
- [10] YANG Y R, WANG Y Y, WANG Q, et al. Establishment of a cell line from swim bladder of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) for propagation of grass carp reovirus genotype II [J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 151: 104739.
- [11] 吉华松, 张翔, 高任, 等. 草鱼出血病疫苗的发展历程及市场现状剖析[J]. 江西水产科技, 2019(5): 38 - 44.
JI H S, ZHANG X, GAO R, et al. Development process and market status analysis of grass carp haemorrhagic disease vaccine [J]. Jiangxi Fisheries, 2019(5): 38 - 44.
- [12] 田园园, 叶星. 鱼用基因工程疫苗研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2012, 14(5): 145 - 152.
TIAN YY, YE X. Research progress of genetic engineering vaccine for fish [J]. China Agricultural Science and Technology Review, 2012, 14(5): 145 - 152.
- [13] 高岩, 裴超, 张超, 等. 草鱼呼肠孤病毒疫苗的研发与应用[J]. 水产科学, 2017, 36(2): 237 - 242.
GAO Y, PEI C, ZHANG C, et al. Development and application of grass carp reovirus vaccine [J]. Fisheries Science, 2017, 36(2): 237 - 242.
- [14] 安芳兰, 董文教, 武发菊, 等. 国内外疫苗规模化生产技术研究进展[J]. 贵州畜牧兽医, 2016, 40(5): 19 - 22.
AN L F, DONG W J, WU F J, et al. Research progress of large-scale vaccine production technology at home and abroad [J]. Guizhou Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 40(5): 19 - 22.
- [15] 张瑜. 生物反应器生产狂犬病疫苗的工艺应用[J]. 兽医导刊, 2016(5): 58 - 59.
ZHANG Y. Process application of rabies vaccine produced by bioreactor [J]. Veterinary Guide, 2016(5): 58 - 59.
- [16] CHEN J X, SUN X M, ZHANG L, et al. Mass cultivation of marine fish Chinook salmon embryo cells in bioreactor with low-serum medium [J]. Aquaculture, 2005, 249(1): 35 - 45.
- [17] 王维玲, 刘文枝, 马杰, 等. 鲫细胞与病毒微载体规模化培养工艺研究[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(5): 784 - 792.
WANG W L, LIU W Z, MA J, et al. Study on the large-scale culture technology of crucian carp cells and virus microcarriers [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(5): 784 - 792.
- [18] 贾路路, 周勇, 马杰, 等. 大鲵细胞与大鲵虹彩病毒的微载体规模化培养工艺及优化[J]. 中国水产科学, 2018, 25(1): 211 - 219.
JIA L L, ZHOU Y, MA J, et al. Large-scale microcarrier culture technology and optimization of giant salamander cells and giant salamander iridescent virus [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(1): 211 - 219.
- [19] 叶雪平, 杨广智, 罗毅志, 等. 细胞生物反应器大规模培养草鱼细胞和病毒[J]. 水产学报, 1992(1): 1 - 6.
YE X P, YANG G Z, LUO Y Z, et al. Large-scale cultivation of grass carp cells and viruses in a cell bioreactor [J]. Journal of Fisheries, 1992(1): 1 - 6.
- [20] 叶雪平, 杨广智, 罗毅志, 等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗生产工艺的比较[J]. 中国兽药杂志, 1998(4): 11 - 14.

- YE X P, YANG G Z, LUO Y Z, *et al.* Comparison of the production technology of cell culture inactivated vaccine against grass carp hemorrhagic disease[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1998(4):11-14.
- [21] 刘秋凤, 曾令兵, 周勇, 等. 微载体规模化培养草鱼细胞与病毒的工艺及优化[J]. 淡水渔业, 2013, 43(4):69-75.
- LIU Q F, ZENG L B, ZHOU Y, *et al.* Technology and optimization of large-scale culture of grass carp cells and viruses on microcarriers [J]. Freshwater Fisheries, 2013, 43(4):69-75.
- [22] 汤亚方. 草鱼呼肠孤病毒 II 型结构蛋白的鉴定及部分结构蛋白的免疫原性分析[D]. 西安:西北农林科技大学, 2019.
- TANG Y F. Identification of type II structural proteins of grass carp reovirus and immunogenicity analysis of some structural proteins [D]. Xi'an: Northwest A&F University, 2019.
- [23] 黄琦雯, 王庆, 王英英, 等. 基因 II 型草鱼呼肠孤病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(10):804-809.
- HUANG Q W, WANG Q, WANG Y Y, *et al.* Establishment and application of TaqMan fluorescence quantitative PCR detection method for genotype II grass carp reovirus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(10):804-809.
- [24] WEZEL V. Growth of cell-strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture [J]. Nature, 1967, 216(5110):64-65.
- [25] FORSETTELL S P, N KALOGERAKIS, BEHIE LA, *et al.* Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 39:305-313.
- [26] 孔文刚. 搅拌转速对 MDCK 细胞生长代谢及病毒扩增的影响[D]. 上海:华东理工大学, 2015.
- KONG W G. The effect of stirring speed on MDCK cell growth, metabolism and virus amplification [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2015.
- [27] HORNG C, MCLIMANS W. Primary suspension culture of calf anterior pituitary cells on a microcarrier surface [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1975, 17:713-732.
- [28] BOCK A, SCHULZE J, SCHWARZER J. High-density microcarrier cell cultures for influenza virus production[J]. Biotechnology Progress, 2011, 27(1):241-250.
- [29] 马启财, 武文莉, 马富龙, 等. MDCK 细胞微载体培养条件优化研究[J]. 生物技术通报, 2018, 34(12):90-95.
- MA Q C, WU W L, MA F L, *et al.* Optimization of the culture conditions of MDCK cells by microcarrier [J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(12):90-95.
- [30] 漆世华, 秦红刚, 韩兴, 等. 微载体悬浮培养 ST 细胞增殖猪瘟疫化弱毒的工艺研究[J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(3):64-68.
- QI S H, QIN H G, HAN X, *et al.* Study on the technology of microcarrier suspension culture of ST cell proliferation and rabbit attenuated swine fever [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2021, 55(3):64-68.
- [31] 杨雁婷, 杨定勇, 龚双燕, 等. 低血清培养 PK-15 细胞系对 TGEV 增殖规律的研究[J]. 中国兽医科学, 2021, 51(1):1-10.
- YANG Y T, YANG D Y, GONG S Y, *et al.* Study on the proliferation of TGEV by culturing PK-15 cell line in low serum [J]. Chinese Veterinary Science, 2021, 51(1):1-10.
- [32] FELDMAN M, KWONG D L. The effects of various mammalian sera on attachment efficiency and thymidine incorporation in primary cultures of mouse mammary epithelial cells [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1977, 13(5):275-279.
- [33] TAKAGI M. Process engineering study on specific environmental factors of mammalian cell culture-Monograph [J]. Seibutsu-kogaku Kaishi, 2002, 80(2):70-77.
- [34] HU W S, AUNINS J G. Large-scale mammalian cell culture [J]. Current Opinion in Biotechnology, 1997, 8(2):148-153.
- [35] 蔡谨, 孙章辉, 王隽, 等. 补料发酵工艺的应用及其研究进展[J]. 工业微生物, 2005(1):42-48.
- CAI J, SUN Z H, WANG J, *et al.* Application and research progress of feeding fermentation process [J]. Industrial Microbiology, 2005(1):42-48.
- [36] 朱紫瑜, 王冠, 庄英萍. 大规模哺乳动物细胞培养工程的现状与展望[J]. 合成生物学, 2021, 2(4):612-634.
- ZHU Z Y, WANG J, ZHUANG Y P. Current situation and prospect of large-scale mammalian cell culture engineering [J]. Synthetic Biology, 2021, 2(4):612-634.
- [37] 梁武, 乔健, 李亚杰, 等. PK-15 细胞微载体悬浮培养及 PCV2 增殖工艺研究[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(4):103-106, 110.
- LIANG W, QIAO J, LI Y J, *et al.* Study on PK-15 cell microcarrier suspension culture and PCV2 proliferation technology [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(4):103-106, 110.
- [38] 孙振鹏, 李欢, 孙燕, 等. 生物反应器内微载体培养细胞的胰酶消化放大技术[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(6):628-632.
- SUN Z P, LI H, SUN Y, *et al.* Trypsin digestion amplification technology of microcarrier cultured cells in bioreactor [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2015, 28(6):628-632.
- [39] LIU S X, WANG Y Y, CHEN J M, *et al.* Establishment of a cell line from egg of rare minnow *Gobiocypris rarus* for propagation of grass carp reovirus genotype II [J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 136:103715.

On large-scale culturing *Ctenopharyngodon idellus* cells on a microcarrier to proliferate grass carp reovirus genotype II

YANG Yuru^{1,2}, WANG Yingying², WANG Qing², ZHOU Wenli¹, YIN Jiyuan², SHI Cunbin²

(1. College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. Key Laboratory of Fishery Drug Development of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is one of the most important cultured fish species in China, it is appreciated by the majority of breeders and consumers for its fast growth rate, diverse feed sources and delicious meat. Grass carp hemorrhagic disease caused by grass carp reovirus genotype II (GCRV II) has seriously hindered the development of the grass carp farming industry with a long onset season, wide epidemic scope, rapid transmission and high mortality rate. Vaccination is the most effective method for the control of viral diseases. However, viral vaccine production requires a large-scale culture of the host cells. In the current race for virus vaccine production, microcarrier and suspension culture systems are amongst the most promising techniques available. As the microcarrier bead has a large surface area for cell attachment, it can produce a larger number of cells than the conventional monolayer culture. The current challenge in GCRV II only induces a few fish cells proliferating and does not produce cytopathic effects (CPE), making it difficult to obtain high titers of the virus. Grass carp swim bladder cells (CiSB) are sensitive to GCRV II and can be used in the proliferation of GCRV II.

To optimize the large-scale cell culture of grass carp swim bladder cells (CiSB) for improving the antigenic content of GCRV II, the Cytodex 1 microcarrier suspension culture system was chosen to cultivate CiSB cells and propagate GCRV II. At the same time, the related indicators of proliferation dynamics were determined. The initial distribution of attached cells was recognized as the most critical stage for evaluating attachment efficiency. Suitable intermittent stirring could improve the contact time and also the attachment rate. During the apposition period, a speed of $30 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ and stirring for 2 min every 30 min were the best parameters for CiSB cell growth, and the cell apposition rate could reach more than 96% after 3 h. Next, in the cell proliferation stage, the conditions such as the initial inoculation density, stirring speed, microcarrier concentration and loading way of CiSB cells were explored and optimized. Results showed that when the cell density was $2 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$, the cells showed good linear growth, and the highest harvest concentration was reached after 5 days. The cells proliferated quickly and the medium consumption was low when the microcarrier dosage of $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ was used, which provided the coverage rate of cells on the microcarrier of more than 95% and the ratio was about 20 cells per microcarrier. When the concentration of microcarrier increased to $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ or $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, the cell density increased but more cell metabolites were also produced, leading to faster consumption of medium and harmful growth environment. In addition, a large number of damaged cells appeared later due to the shear force generated by the increased probability of collision between microcarriers. When the stirring speed was set at $30 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, the cell could obtain a stable flow culture environment, the proliferation rate was fast, and the attachment rate in the later stage of culture was good. When the agitation rate increased, the initial cell rate increased, but the increase of shear force resulted in a large number of cell damage. Adding 5% FBS to the medium and replacing the medium in half on the third day of culture could achieve the maximum yield of cells while maintaining the monolayer growth state of cells, and reduce the production cost while adding nutrients and diluting harmful metabolites. Under the optimal culture conditions, CiSB cells displayed a typical fibroblast morphology with good growth and uniform distribution, and could fully cover the microcarriers after 5 days. The cells could be dissociated from the microcarriers by treatment of preheated 0.5% trypsin containing 0.02% EDTA for 3 min in a 125 mL stirring

bottle. The released and well-dispersed cells were then used for scale-up culture in a 1 L bioreactor. High cell density (1.71×10^6 cells \cdot mL⁻¹) could be reached in the bioreactor with the efficient use of microcarriers, which confirmed the data obtained from the 125 mL stirring bottle. Moreover, CiSB cells were cultured under optimized parameters and infected with GCRV II. The proliferation dynamics of GCRV were observed by measuring the copy number; the virus infection entered the logarithmic growth phase on the second day and reached a peak value (6.2×10^5 copy \cdot μ L⁻¹) on the 5th day, which was 3 times higher than that in the adherent cell flask, indicating that this process was suitable for amplification of GCRV II.

Herein, a suspension culture system of grass carp swim bladder cells (CiSB) was developed using Cytodex 1 as microcarrier in a stirred bioreactor. This can could serve as a reference for future studies on the development of large-scale production of vaccines against grass carp hemorrhagic disease.

Keywords: grass carp swim bladder cells (CiSB); genotype II grass carp reovirus; microcarrier culture; technology optimization