

# 无细胞百日咳疫苗生产用培养基的改进和培养条件优化\*

梁疆莉, 姬秋彦, 罗娜, 姬光, 高娜, 马艳, 史荔, 孙明波, 衡燮\*\*

(中国医学科学院 & 北京协和医学院医学生物学研究所, 云南昆明 650118)

**[摘要]** 目的: 改进无细胞百日咳疫苗生产用培养基并优化培养条件。方法: 用不同浓度溶血(0.1%) 赫氏琼脂及酸水解酪蛋白制备百日咳活性炭培养基, 选择最优培养条件; 使用百日咳活性炭培养基成功复苏菌种后, 优化传代次数和培养时间, 评价百日咳活性炭培养基替代羊血包姜氏培养基的可行性; 用酸水解酪蛋白代替自制50% 酸水解酪蛋白制备改良SS液体培养基, 并用ELISA、SDS-PAGE电泳和CHO细胞簇集等方法评价对菌种的培养效果。结果: 溶血(0.1%) 赫氏琼脂的加入量为33.2g/L、酸水解酪蛋白加入量为8g/L时, 菌苔生长最快; 百日咳活性炭培养基培养第1代72h、第2代48h、第3代48h、第4代24h和第1代72h、第2代36h、第3代24h的血凝(HA)和UV<sub>600</sub>均较高, 这两组细菌生长状态较好; 酸水解酪蛋白制备的百日咳活性炭培养基在优化条件后复苏菌种生长良好, 和羊血包姜氏培养基没有明显差异; 8g/L 酸水解酪蛋白制备的改良SS液体培养基所得菌量优于50% 酸水解酪蛋白制备培养基( $P=0.001$ ), 改良SS液体培养基培养所得百日咳毒素纯度、产量和CHO细胞簇集活性均较好。结论: 使用酸水解酪蛋白的百日咳活性炭培养基和改良SS液体培养基所得的百日咳杆菌纯度、产量、活性均较高, 适用于无细胞百日咳组分疫苗的生产。

**[关键词]** 博德特菌, 百日咳; 百日咳毒素; 培养基; 仓鼠卵巢细胞; 酶联免疫吸附测定

**[中图分类号]** R516.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)10-1232-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.10.021

## Improvement of Culture Medium for Production of Acellular Pertussis Vaccine and Optimization of Its Culture Conditions

LIANG Jiangli, JI Qiuyan, LUO Na, JI Guang, GAO Na, MA Yan, SHI Li, SUN Mingbo, HENG Xie

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union

Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To improve the culture medium for acellular pertussis vaccine production and optimize its culture conditions. **Methods:** Hottinger's Agar of different concentrations and acid hydrolyzed casein were used to prepare pertussis activated carbon medium with optimal culture conditions. After resuscitating the strains with pertussis activated carbon medium, passage and culture time were optimized and the feasibility of replacing pertussis activated carbon medium with sheep blood-stained medium was evaluated. Acid hydrolyzed casein was used to replace 50% acid hydrolyzed casein in modified SS liquid medium, and the culture effects of the strain were evaluated by ELISA, SDS-PAGE electrophoresis and CHO cell clustering. **Results:** When Hottinger's Agar was added in an amount of 33.2 g/L and acid hydrolyzed casein was added in an amount of 8 g/L, the lawn grew with the fastest speed. HA and UV<sub>600</sub> of pertussis activated carbon medium were higher and bacteria grew better in two sub-cultures-the first generation 72 h, the second generation 48 h, the third generation 48 h, and the fourth generation 24 h and the first generation 72 h, the second generation 36 h, and the third generation 24 h. The pertussis activated carbon medium prepared by acid hydrolysis of casein was well-de-

\*[基金项目] 国家科技重大专项课题基金资助项目(2015ZX09101031); 中国医学科学院重大协同创新资助项目“创新性疫苗研究”(2016-12M-1-019)

\*\*通信作者 E-mail: hengxie@imbeams.com.cn

网络出版时间: 2018-10-10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181010.2224.008.html>

veloped after optimized conditions, and there was no significant difference between the blood and the culture medium of sheep blood. The number of bacteria in the modified SS liquid medium prepared by 8g/L acid hydrolysis casein was better than that of self-made 50% acid hydrolysis casein preparation medium ( $P=0.001$ ), and the purity, yield and bioactivity to CHO cells were good. **Conclusion:** The pertussis dried bacteria obtained by the pertussis activated carbon medium using acid hydrolyzed casein and the modified SS liquid medium have higher purity, yield and activity, and were suitable for the production of the acellular pertussis vaccine.

[**Key words**] *Bordetella pertussis*; pertussis toxin; culture medium; CHO cells; enzyme-linked immunosorbent assay

百日咳是由百日咳鲍特菌引起的急性呼吸道传染病,人群普遍易感,尤以婴幼儿为重。在百日咳疫苗问世以前,百日咳是婴幼儿死亡的主要原因之一,在使用百日咳疫苗以后百日咳的发病率降低<sup>[1-3]</sup>。国内目前使用的百日咳疫苗是共纯化工艺,而国外使用的是组分百日咳疫苗,组分明确<sup>[4-6]</sup>。本课题组新研发的组分百日咳疫苗含有百日咳毒素(pertussistoxin, PT)、百日咳丝状血凝素(filamentous hemagglutinin, FHA)和百日咳黏附素(pertactin, PRN)3种组分,对培养基有更高的要求。目前百日咳疫苗生产用培养基大多使用含羊血的包姜氏培养基进行菌种复苏,然后在SS液体培养基中大量增殖,在SS培养基<sup>[7-8]</sup>的基础上加入自制的50%酸水解酪蛋白,加入2,6-二甲基 $\beta$ 环糊精可增加产毒效果<sup>[9]</sup>。考虑到羊血外源因子污染风险,应尽量避免使用带羊血的培养基,并且自制的培养基操作复杂,成分难以控制,易引起批间差异。因此,在新百日咳疫苗研发过程中,对现有培养基进行了改进,用百日咳活性炭培养基取代羊血包姜氏培养基用于菌种复苏,百日咳活性炭培养基、百日咳杆菌SS培养基均改用商品化的蛋白胨,代替原来自制蛋白水解液。本研究使用新培养基进行了6个批次百日咳菌种培养,对发酵液进行了培养效果研究,用吸光度值和ELISA法评价产量,用SDS-PAGE和反应PT活性的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞簇集实验评价发酵液的质量。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种、试剂及仪器

生产用百日咳杆菌CMCC58003(CS株)工作菌种由本实验室保存,酸水解酪蛋白和酵母浸粉、2,6-二甲基 $\beta$ 环糊精、青岛海博公司溶血(0.1%)赫氏琼脂、包姜氏培养基、1%鸡血球、脱纤维羊血、

GIBCO胎牛血清、DMEM-F<sub>12</sub>、CHO-K1细胞株(ATCC CCL-61,购自ATCC)及百日咳簇集毒性候选参考品C1(中国食品药品检定检测研究院),721分光光度计、Dynamica凝胶成像系统及App-likon70L细菌发酵罐。

### 1.2 百日咳活性炭培养基优化

以原百日咳活性炭培养基配方为基础,用溶血(0.1%)赫氏琼脂代替自制赫氏营养液,酸水解酪蛋白代替自制50%酸水解酪蛋白,在赫氏琼脂含量23.2、33.2、43.2 g/L及酸水解酪蛋白含量6、8、10 g/L培养条件下观察菌苔生长状态,刮下菌苔制成UV<sub>600</sub>2.5菌液,10%体积接种到液体培养基培养24 h,检测血凝(HA)和600 nm处吸光度(UV<sub>600</sub>)以评价培养效果。按照最优条件,培养40、60、80 h,绘制生长曲线,观察不同培养时间产毒情况。

### 1.3 百日咳活性炭培养基传代条件优化

使用百日咳活性炭培养基成功复苏菌种后,优化传代代次和培养时间。开启同一菌种,根据培养不同代次和传代时间设计8组实验,分别为组1(P1 28 h、P2 48 h、P3 24 h)、组2(P1 60 h、P2 48 h、P3 24 h)、组3(P1 72 h、P2 48 h、P3 24 h)、组4(P1 84 h、P2 48 h、P3 24 h)、组5(P1 72 h、P2 48 h、P3 48 h、P4 24 h)、组6(P1 72 h、P2 48 h、P3 48 h)、组7(P1 72 h、P2 36 h、P3 24 h)、组8(P1 72 h、P2 24 h、P3 24 h)。分别将最后一代固体培养基菌苔刮下,制成UV<sub>600</sub>2.5菌液,10%体积接种到50 mL SS液体培养基中,36℃ 140 r/min培养24 h,检测UV<sub>600</sub>和HA值。设平行实验组,结果取平均值。

### 1.4 百日咳活性炭培养基及羊血包姜氏培养基比较

将6支菌种用2 mL生理盐水溶解混匀,分别接种含30%羊血包姜氏培养基和百日咳活性炭培养基各5支,比较生长状况,刮下菌苔制成UV<sub>600</sub>

2.5 菌液,10% 体积接种到 SS 液体培养基,培养 24 h 后比较 HA 和  $UV_{600}$ 。

### 1.5 优化百日咳改良 SS 培养基

选择 4,6,8,10 g/L 酸水解酪蛋白,配制 200 mL 百日咳改良 SS 培养基,接种相同的菌种,36 ℃ 140 r/min 培养 36 h,比较  $UV_{600}$  和 HA,并与自制 50% 酸水解酪蛋白制备的培养基(氮氮含量 0.3 g/L)进行比较。

### 1.6 百日咳产量和纯度评价

百日咳活性炭培养基复苏菌种并传两代,改良 SS 液体培养基传两代,50 L 发酵罐中发酵 36 h,测定 6 个批次发酵液  $UV_{600}$ ,ELISA 测定 FHA 和 PT、PRN 抗原含量,并用 SDS-PAGE 分析纯度,方法见药典<sup>[10]</sup>。

### 1.7 CHO 细胞簇集试验评价 PT 活性

方法见文献[11],长成单层的 CHO-K<sub>1</sub> 细胞用 DMEM-F<sub>12</sub> 培养液稀释至  $5 \times 10^5$  个,加入 96 孔板,100  $\mu$ L/孔,37 ℃ 24 h 后上样。培养液过滤上清稀释 3 000 倍,再在 96 孔板中倍比稀释至 8 孔,上

样 50  $\mu$ L/至细胞中,培养液做阴性对照,细胞簇集的判定标准:显微镜下观察,1 个视野内能引起 50% 以上细胞发生簇集判为阳性,50% 以下细胞发生簇集判为阴性。计算 CHO 细胞簇集的浓度,计算方法是 用 ELISA 测定的 PT 抗原含量除以产生簇集的最大稀释倍数。

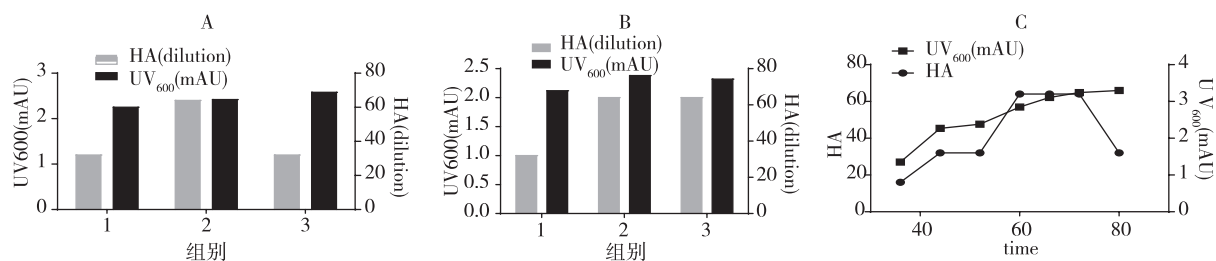
### 1.8 统计学方法

使用 SPSS 软件对数据进行分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 百日咳活性炭培养基复苏菌种优化条件的确定

如图 1 所示,溶血(0.1%) 赫氏琼脂的加入量为 33.2 g/L、酸水解酪蛋白加入量为 8 g/L 时菌苔生长最快;在培养 40 h 后菌苔明显生长加快,在 50 h 后生长良好,60 ~ 72 h 传液体培养基后 HA 较高。



注:A 中组 1、2、3 溶血(0.1%) 赫氏琼脂含量分别为 23.2、33.2、43.2 g/L,B 中组 1、2、3 酸水解酪蛋白含量分别为 6、8、10 g/L,C 为菌种生长曲线

图 1 百日咳活性炭培养基成分选择和菌种生长曲线

Fig. 1 Component selection and strain growth curve of pertussis activated carbon medium

### 2.2 百日咳活性炭培养基传代条件优化

比较 8 种实验条件的 HA 和  $UV_{600}$ ,结果显示,组 5 中第 1 代 72 h、第 2 代 48 h、第 3 代 48 h、第 4

代 24 h,和组 7 中第 1 代 72 h、第 2 代 36 h、第 3 代 24 h 的 HA 和  $UV_{600}$  均较高,说明这两组细菌生长状态较好。见图 2。

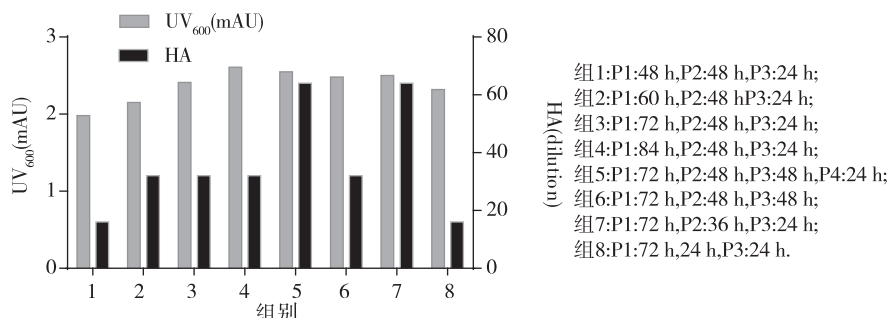


图 2 不同代次及不同培养时间对百日咳杆菌菌苔生长的影响

Fig. 2 Effects of different generations and culture time on the growth of Bordetella pertussis

2.3 百日咳活性炭培养基或羊血包姜氏培养基比较

羊血包姜氏培养基及百日咳活性炭培养基 36 ℃ 培养 48 h 菌种均生长良好,传液体培养基 36 ℃ 140 r/min 培养 24 h,两组 HA 比较,差异无统计学意义( $P=0.471$ ),两组  $UV_{600}$  比较,差异无统计学意义( $P=0.963$ )。见图 3。

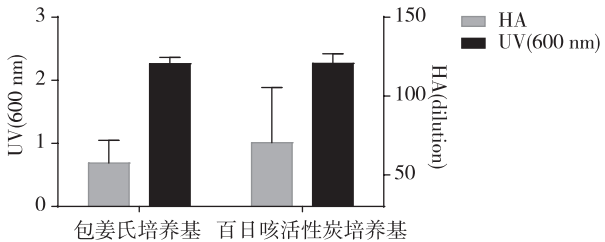


图 3 在包姜氏培养基和百日咳活性炭培养基中培养的百日咳杆菌菌量

Fig. 3 Amount of Bordetella pertussis cultured in B-G medium and pertussis activated carbon medium

2.4 优化百日咳改良 SS 培养基

对百日咳改良 SS 培养基中不同浓度酸水解酪蛋白的培养效果进行比较,结果见下表 1,酸水解酪蛋白在 4~6 g/L 时,随着酸水解酪蛋白的增加菌量和 HA 增加( $P=0.012$ ),6~10 g/L 后菌量和 HA 不再明显增加( $P=0.737$ )。8 g/L 酸水解酪蛋白和与自制 50% 酸水解酪蛋白制备的培养基进行比较,8 g/L 酸水解酪蛋白  $UV_{600}$  明显优于自制 50% 酸水解酪蛋白( $P=0.001, n=5$ )。

表 1 不同浓度酸水解酪蛋白的改良 SS 培养基培养的百日咳杆菌菌量

Tab. 1 The amount of Bordetella pertussis cultured in modified SS medium with different concentrations of acid hydrolyzed casein

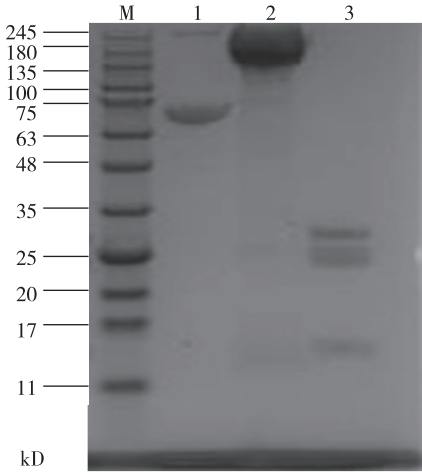
指标	酸水解酪蛋白浓度(g/L)			
	4	6	8	10
UV <sub>600</sub>	1.85	2.45	2.53	2.55
HA	1:64	1:128	1:128	1:128

2.5 百日咳产量和纯度评价

分析了 6 个批次发酵液,  $UV_{600}$  为  $5.70 \pm 0.29$ , ELISA 测定 PT 抗原含量( $9.6 \pm 3.0$ )mg/L、FHA 抗原含量( $54.9 \pm 5.5$ )mg/L、PRN 抗原含量( $6.3 \pm 0.6$ )mg/L、菌体产量( $13.4 \pm 0.9$ )g/L, SDS-PAGE 图中 PT 有 4 个条带, FHA 条带在 220 kD, PRN 条带在 69 kD, 均和文献[12]记录一致。见图 4。

2.6 CHO 细胞簇集试验评价 PT 活性

发酵液中引起 CHO 细胞簇集的最大稀释倍数



注:M 为蛋白 marker,1 为 PRN,2 为 FHA,3 为 PT

图 4 百日咳杆菌 PT、FHA 及 PRN 电泳

Fig. 4 PT, FHA and PRN electrophoresis of Bordetella pertussis

为 84 000~672 000 倍, CHO 细胞簇集的浓度为  $(0.083 \pm 0.056) \mu\text{g/L}$ , 用 CHO 簇集参考品 C1 定量测得发酵液 CHO 细胞簇集活性是  $(750 \pm 323) \text{IU/mL}$ 。

3 讨论

本实验百日咳培养基的评价指标是 HA 和  $UV_{600}$ ,  $UV_{600}$  是反应菌体的生长繁殖情况, HA 和百日咳丝状血凝素 FHA 的含量有直接关系, 说明 FHA 的产毒情况。根据过去的培养经验和 6 批次发酵的结果, 用现有的培养基和培养条件 PT 的产毒和 FHA 的产毒呈正相关, Pearson 相关系数 0.613, 因此用血凝和  $UV_{600}$  作为评价指标是可行的。

百日咳毒素 PT 是最主要的百日咳保护性抗原, 完整的 PT 抗原类似于 A-B 毒素由 S1、S2、S3、S4、S5 组成, S1 亚基是免疫原性最强的抗原成分, 也是 PT 毒性作用部分, 它通过催化二磷酸腺苷 (ADP)-核糖, 引起许多生物学效应, 包括引起 CHO 细胞簇集, 而 S2、S3、S4 和 S5 能介导 PT 吸附于细胞表面并进入细胞, CHO 细胞簇集可以验证 PT 抗原天然生物功能的完整性和免疫原性<sup>[12-14]</sup>, 因此本实验加入 CHO 细胞簇集来检测 PT 的活性, 以评价培养基的效果。发酵液 PT 的产量约为 10 mg/L, 且能引起 CHO 细胞簇集的浓度为 pg 级, 说明 PT 的完整性较好, 产量较高。FHA 和 PRN 也是百日咳免疫保护的重要抗原<sup>[15-16]</sup>, 发酵液中 FHA 抗原产量较高在 50 mg/L 左右, 且在 220 kD

没有发生降解。每种抗原的产量和质量证明了该两种培养基和培养条件较为适宜 PT、FHA、PRN 的获得。目前,全因子实验法、Plackett-Burman 实验法、响应面优化设计法、随机平衡法等优化方法已被运用于微生物发酵的优化工作中,然而本实验的两种培养基已在实验前期有了一定的研究,所以本实验用单因子法对两种培养基的氮源和部分相关因素进行研究,对培养条件也进行研究,最后验证了百日咳活性炭培养基可以取代羊血包姜氏培养基用于菌种复苏,符合生物制品少使用血制作培养基的要求;使用百日咳活性炭培养基、百日咳改良 SS 培养基所得的百日咳干菌的产量和纯度较为理想,适合用于百日咳组分疫苗的生产;在优化了实验条件以后百日咳改良 SS 培养基的产量高于自制酸水解酪蛋白,使用商业化蛋白干粉也有利于控制制品的质量和减少批间差异。

综上所述,使用酸水解酪蛋白的百日咳活性炭培养基和改良 SS 液体培养基所得的百日咳杆菌纯度、产量、活性均较高,适用于无细胞百日咳组分疫苗的生产。

## 4 参考文献

- [1] KHT Y, DUCLOS P, EAS N, et al. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2017, 17(9):974.
- [2] DORJI D, MOOI F, YANTORNO O, et al. Bordetella Pertussis virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance[J]. *Medical Microbiology & Immunology*, 2018, 207(2):1-24.
- [3] CHEN P Y, JENG-MIN C, YANG Y F, et al. Heterogeneous aging effects on functional connectivity in different cortical regions: A resting-state functional MRI study using functional data analysis[J]. *Plos One*, 2016, 11(9):e0162028.
- [4] PRYMULA R, KIENINGER D, FEROLDI E, et al. Immunogenicity and safety of primary and booster vaccinations of a fully liquid DTaP-IPV-HB-PRP-T hexavalent vaccine in healthy infants and toddlers in Germany and the Czech republic[J]. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2018, 37(8):823-830.
- [5] HANSEN J, TIMBOL J, LEWIS N, et al. Safety of DTaP-IPV/Hib vaccine administered routinely to infants and toddlers[J]. *Vaccine*, 2016, 34(35):4172-4179.
- [6] REYNOLDS D L, VIDOR E. Fully liquid DTaP-IPV-Hib pediatric combination vaccine (Pediaceel): a review of 18 years of clinical experience[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2014, 13(8):943.
- [7] STAINER D W, SCHOLTE M J. A simple chemically defined medium for the production of phase I Bordetella pertussis[J]. *General Microbiology*, 1971, 63:211-220.
- [8] ANDORN N, KAUFMAN J B, CLEM T R, et al. Large-scale growth of bordetella pertussis for production of extracellular toxin [J]. *New York Academy of Sciences*, 1990, 589(1):363.
- [9] IMAIZUMI A, SUZUKI Y, ONO S, et al. Effect of heptakis (2,6-O-dimethyl) beta-cyclodextrin on the production of pertussis toxin by Bordetella pertussis[J]. *Infect Immun*, 1983, 41(3):1138-1143.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(3 部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015.
- [11] 徐颖华, 卫辰, 王丽婵, 等. CHO 细胞簇集试验在无细胞百日咳疫苗质量控制中的应用[J]. *中国生物制品学*, 2014, 27(10):1279-1282.
- [12] 赵铠, 章以浩. 医学生物制品学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007.
- [13] BUASRI W, IMPOOLSUP A, BOONCHIRD C, et al. Construction of bordetella pertussis strains with enhanced production of genetically-inactivated pertussis toxin and pertactin by unmarked allelic exchange[J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12(1):61-76.
- [14] KATADA T, UI M. Islet-activating protein, a modifier of receptor-mediated regulation of rat isletadenylate cyclase [J]. *J Biol Chem*, 1981, 256(16):8310-8317.
- [15] SHAHIN R D, BRENNAN M J, LI Z M, et al. Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kd outer membrane protein of bordetella pertussis [J]. *Experimental Medicine*, 1990, 171(1):63-73.
- [16] ALAN KIMURA, KENNETH T, MOUNTZOUROS, et al. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin: Evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model[J]. *Infection And Immunity*, 1990, 58(1):7-16.

(2018-07-01 收稿, 2018-09-07 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 张文龙