

PK15 细胞的生物学特性和质量评价研究

魏园园¹, 马忠仁¹, 王家敏¹, 徐水林², 马桂兰³, 马 花¹, 乔自林¹

(1. 甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 甘肃 兰州 730030; 2. 兰州民海生物工程有限公司, 甘肃 兰州 730010; 3. 兰州百灵生物技术有限公司, 甘肃 兰州 730010)

摘要:为评价 PK15 细胞能否用于兽用疫苗的研究和生产, 对其进行了生物学特性研究和微生物污染及病毒外源因子检测。结果表明: PK15 细胞复苏活力为 91.77%, 呈贴壁性生长, 形态为上皮型; 生长曲线呈“S”型, 最大增殖浓度为 24.67×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 群体倍增时间为 21.08 h; 同工酶为 5 条, 染色体 $2n=38$, 证实为猪源性且没有发生细胞间的交叉污染; 细菌、真菌和支原体检查均为阴性; 细胞体外培养观察、血吸附试验、接种鸡胚和动物以及特异性荧光抗体结合物检查病毒均为阴性; 能较好地表达外源基因, 达到了兽用疫苗生产用细胞的质量要求, 可为以该细胞为基质的疫苗研究和生产提供细胞资源。

关键词: PK15 细胞; 生物学特性; 质量评价

中图分类号: Q28 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2015)05-0061-05 DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2015.05.0061

PK15 细胞[Porcine Kidney Epithelial cells, 也称 PK15 或 PK(15)]来源于猪肾, 中文名为猪肾上皮细胞, 其父母代源自 1955 年美国 Stice 提供的成年猪肾细胞 PK-2a, 后被 ATCC 收藏(CCL-33)^[1]。PK-15 细胞对猪圆环病毒(PCV)、猪细小病毒(PPV)和猪瘟病毒(CSFV)等多种病毒比较敏感, 现已广泛应用于猪瘟病毒、猪伪狂犬病病毒和猪细小病毒等的分离、体外培养以及相关疫苗的生产中。本研究对保存的一株 PK15 细胞进行了生物学特性研究和质量检测, 以评价该细胞是否能用于兽用疫苗的研究和生产。

1 材料与方法

1.1 材料

PK15 细胞(甘肃省动物细胞工程技术研究中心保存, 代次为 34, 2007 年从中国兽医药品监察所引进), 新生牛血清(兰州民海生物)、DMEM(Gibco)和 0.25% 胰蛋白酶(Gibco); 无菌检查与支原体培养法检查培养基(北京三药科技)、Hoechst33258 荧光染色液(Sigma); 脑心肌

炎病毒 VR-19 株、牛腺病毒 3 型 WBR-1 株、牛副流感病毒 3 型 SB 株、牛细小病毒 Haden 株和呼肠孤病毒 Abney 株(ATCC)以及牛腹泻病毒 Oregon C24V 株(中国兽医药品监察所); 猪细小病毒、牛腹泻病毒、牛腺病毒 3 型、牛细小病毒、牛副流感病毒 3 型、呼肠孤病毒、狂犬病毒荧光抗体结合物(VMRD); 指示细胞 Vero、MRC-5 和牛肾原代细胞均为甘肃省动物细胞工程技术研究中心保存; SPF 级种蛋(济南斯帕法斯)、SPF 级 BALB/c 乳鼠和成鼠(甘肃中医学院实验动物中心); 秋水仙碱(Sirius)、Giemsa 染料(Amresco)、脂质体(LipofectamineTM 2000, Invitrogen)、绿色荧光蛋白质粒(pEGFP-C1, Clontech); CO₂ 培养箱(Thermo, 3111)、倒置相差显微镜+成像系统(Olympus, CKX41 + DP26)、荧光倒置显微镜(Olympus, IX71)和液氮罐(乐山东亚, YDX-100-200F)等。

1.2 方法

1.2.1 复苏及活力检查 从液氮中取出细胞, 迅速于 37℃ 水中快速解冻, 用培养液悬浮后接种到细胞瓶中培养, 取少量细胞悬液, 采用台盼蓝拒染法检查细胞的活力^[2]。待细胞贴壁后换加等量的新鲜培养基。

1.2.2 细胞鉴别 细胞培养过程中用显微镜观察其形态, 并采集图像。利用同工酶检测和染色体分析进行细胞来源的种属鉴别, 同工酶检测采用乳酸脱氢酶(LDH)同工酶^[3], 染色体分析选择 58 个处于中期分裂相并铺展良好的图片进行统

收稿日期: 2015-01-26

基金项目: 甘肃省科技计划资助项目(1203FKDA030、1308RJZA142); 兰州市科技计划资助项目(2013-4-101); 甘肃省农业生物技术专项资助项目(GNSW-2014-24); 西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(319 20130066)

第一作者简介: 魏园园(1989-), 女, 陕西省岐山县人, 在读硕士, 从事预防兽医学方面研究。E-mail: 1025887298@qq.com。

通讯作者: 乔自林(1976-), 男, 甘肃省永靖县人, 学士, 高级实验师, 从事动物细胞生物反应器高密度培养工艺研究。E-mail: 670267497@qq.com。