



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110423782 A

(43)申请公布日 2019.11.08

(21)申请号 201910746960.5

C07K 14/47(2006.01)

(22)申请日 2019.08.13

C12N 7/00(2006.01)

(71)申请人 成都天邦生物制品有限公司

地址 610000 四川省成都市经济技术开发区灵池街358号

申请人 马鞍山史记动物健康管理有限公司

(72)发明人 邢刚 粟硕 黄杰 贺微 岳丰雄

徐祥兰 王洁清 刘原子 何洪奎

江勇 王立斌

(74)专利代理机构 成都高远知识产权代理事务

所(普通合伙) 51222

代理人 李高峡 张娟

(51) Int. Cl.

C12N 15/867(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

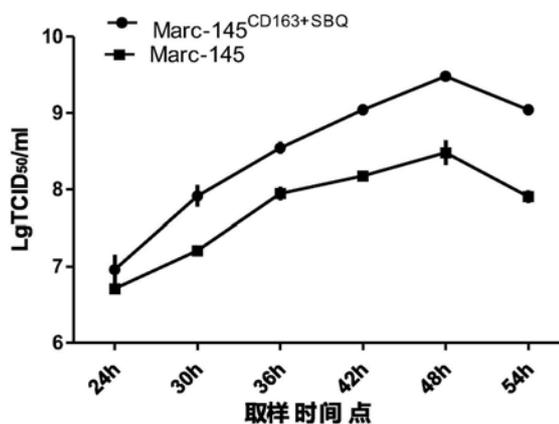
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

## (54)发明名称

一株Marc-145稳定细胞株的构建及应用

## (57)摘要

本发明涉及细胞生物学、基因工程和兽用生物制品学技术领域,特别是涉及一株Marc-145稳定细胞株的构建方法及应用。本发明提供了一种猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)繁殖用细胞株的构建方法,包括如下步骤:1)将CD163基因和SBQ基因分别构建到慢病毒载体中,得重组慢病毒载体;2)将前述重组慢病毒载体和病毒拯救辅助质粒一起转入哺乳动物细胞,培养该细胞,得重组病毒;3)将步骤2)的重组病毒感染Marc-145细胞,即得。本发明还提供了前述细胞的用途。本发明得到的细胞遗传性状稳定,对PRRSV敏感,具有十分优良的应用前景。



1. 一种猪繁殖与呼吸综合征病毒繁殖用细胞株的构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 将CD163基因的整个编码区序列构建到

PCDH-CMV-MCS-EF1A-MCHEERY-T2A-PURO慢病毒载体中,将SBQ基因的整个编码区序列构建到PLVX-CBA-IRES-NEO-T2A-EGFP慢病毒载体中,得重组慢病毒载体;

2) 将前述重组慢病毒载体和病毒拯救辅助质粒先后转入哺乳动物细胞,培养该细胞,得重组病毒;

3) 将步骤2)的重组病毒感染Marc-145细胞,即得;

步骤1)所述PCDH-CMV-MCS-EF1A-MCHEERY-T2A-PURO慢病毒载体是在PCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-T2A-PURO载体基础上将copGFP基因替换为MCHEERY改造得到;

所述PLVX-CBA-IRES-NEO-T2A-EGFP慢病毒载体是在PLVX-IRES-NEO载体和PCDH-CMV-T2A-EGFP-EF1A-PURO载体基础上构建,具体的:以PCDH-CMV-T2A-EGFP-EF1A-PURO载体为模板扩增EGFP和T2A序列,将EGFP和T2A序列通过酶切连接的方法嵌入到PLVX-IRES-NEO载体的WPRE和NEO元件之间,并在改造后的载体上将CBA启动子序列嵌合至CMV promoter之后;

步骤2)所述辅助质粒指的是慢病毒结构质粒psPAX2和囊膜质粒PMD2.G,重组慢病毒载体、结构质粒psPAX2和囊膜质粒PMD2.G的质量浓度比为4:3:1。

2. 如权利要求1所述的构建方法,其特征在于,步骤2)中,所述哺乳动物细胞是293T细胞。

3. 由权利要求1或2所述构建方法所得的猪繁殖与呼吸综合征病毒繁殖用细胞株。

4. 权利要求3所述细胞株在培养猪繁殖与呼吸综合征病毒中的用途。

5. 如权利要求4所述的用途,其特征在于,所述病毒是JXA1-R株。

## 一株Marc-145稳定细胞株的构建及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细胞生物学、基因工程和兽用生物制品学技术领域,特别是涉及一株Marc-145稳定细胞株的构建方法及应用。

### 背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 是引起猪繁殖与呼吸综合征病 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 又名“蓝耳病”的病原。PRRSV具有典型的嗜单核细胞特性,在体内,主要感染猪肺泡巨噬细胞 (porcine alveolar macrophage, PAM), 在体外,主要感染非洲绿猴肾细胞系Marc-145。因此,产业上主要使用Marc-145作为宿主,培养PRRSV,用于生产相关疫苗。

[0003] 但Marc-145细胞内增殖PRRSV存在病毒含量不高的局限性,因此提高PRRSV在体外增殖的病毒含量,是提升相关疫苗产品质量的重要途径之一。

### 发明内容

[0004] 为了解决上述问题,本发明提供了一种猪繁殖与呼吸综合征病毒繁殖用细胞株的构建方法,包括如下步骤:

[0005] 一种猪繁殖与呼吸综合征病毒繁殖用细胞株的构建方法,包括如下步骤:

[0006] 1) 将CD163基因的整个编码区 (CDS) 序列构建到PCDH-CMV-MCS-EF1A-MCHEERY-T2A-PURO慢病毒载体中,将SBQ基因的整个编码区序列构建到PLVX-CBA-IRES-NEO-T2A-EGFP慢病毒载体中,得重组慢病毒载体;

[0007] 2) 将前述重组慢病毒载体和病毒拯救辅助质粒先后转入哺乳动物细胞,培养该细胞,得重组病毒;

[0008] 3) 将步骤2) 的重组病毒感染Marc-145细胞,即得;

[0009] 步骤1) 所述PCDH-CMV-MCS-EF1A-MCHEERY-T2A-PURO慢病毒载体是在PCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-T2A-PURO载体基础上将copGFP基因替换为MCHEERY改造得到;

[0010] 所述PLVX-CBA-IRES-NEO-T2A-EGFP慢病毒载体是在PLVX-IRES-NEO载体和PCDH-CMV-T2A-EGFP-EF1A-PURO载体基础上构建,具体的:以PCDH-CMV-T2A-EGFP-EF1A-PURO载体为模板扩增EGFP和T2A序列,将EGFP和T2A序列通过酶切连接的方法嵌入到PLVX-IRES-NEO载体的WPRES和NEO元件之间,并在改造后的载体上将CBA启动子序列嵌合至CMV promoter之后;

[0011] 步骤2) 所述辅助质粒指的是慢病毒结构质粒psPAX2和囊膜质粒PMD2.G,重组慢病毒载体、结构质粒psPAX2和囊膜质粒PMD2.G的质量浓度比为4:3:1。

[0012] 如前述的构建方法,步骤2) 中,所述哺乳动物细胞是293T细胞。

[0013] 由前述构建方法所得的猪繁殖与呼吸综合征病毒繁殖用细胞株。

[0014] 前述细胞株在培养猪繁殖与呼吸综合征病毒中的用途。

[0015] 进一步地,所述病毒是JXA1-R株。

[0016] 本发明具有如下有益效果：

[0017] 1) 本发明的细胞株遗传稳定性强，传代35次仍能保留转入基因不丢失。

[0018] 2) 本发明的细胞株对PRRSV敏感性高，将PRRSV接种到本发明的细胞株内，可以使其病毒最高滴度提高10倍（相比未改造的Marc-145细胞）。

[0019] 3) 使用本发明细胞株繁殖出来的病毒具有良好的免疫原性，将其稀释5倍后制备得到的活疫苗能对仔猪提供有效的免疫保护。

[0020] 显然，根据本发明的上述内容，按照本领域的普通技术知识和惯用手段，在不脱离本发明上述基本技术思想前提下，还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0021] 以下通过具体实施方式对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

## 附图说明

[0022] 图1: Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>细胞株CD163和SBQ基因过表达检测。

[0023] 图2: Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>细胞株增殖到第35代荧光图片；A. 绿色荧光代表SBQ基因表达；B. 对应图A白光；C. 红色荧光代表CD163基因表达；D. 对应图C白光。

[0024] 图3: Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>细胞株和未改造Marc-145细胞接种PRRSV (JXA1-R株) 在微载体上增殖的病毒含量。

## 具体实施方式

[0025] 实施例1一株Marc-145稳定细胞株的构建

[0026] 1 重组慢病毒载体的构建

[0027] 查阅美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 中GenBank已报道的猪CD163 (HM991330) 和SBQ (Siglec10, KJ670156) 基因序列，利用引物设计软件Premier 6及Oligo 7.57设计CD163和SBQ基因的引物序列，扩增CD163基因的第1~3348位碱基（整个编码区序列）和SBQ基因的第1~1860位碱基（整个编码区序列）。将CD163基因的扩增产物利用Nhe I和BamH I双酶切后连接到PCDH-CMV-MCS-EF1A-MCHEERY-T2A-PURO载体上。SBQ基因的扩增产物利用EcoR I和BamH I双酶切后连接到PLVX-CBA-IRES-NEO-T2A-EGFP载体上，然后再将上述两个载体转化至DH5a感受态细胞中。提取质粒进行酶切鉴定和测序。构建正确的载体分别命名为PCDH-CMV-MCS-EF1A-MCHEERY-T2A-PURO (CD163) 和PLVX-CBA-IRES-NEO-T2A-EGFP (SBQ)。

[0028] 前述的两种载体：

[0029] PCDH-CMV-MCS-EF1A-MCHEERY-T2A-PURO是在PCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-T2A-Puro (SBI公司) 基础上将copGFP基因替换为MCHEERY改造得到；

[0030] PLVX-CBA-IRES-NEO-T2A-EGFP是在PLVX-IRES-NEO (clontech公司) 和PCDH-CMV-T2A-EGFP-EF1A-PURO (SBI公司) 基础上构建，具体的：以PCDH-CMV-T2A-EGFP-EF1A-PURO为模板扩增EGFP和T2A序列，将EGFP和T2A序列通过酶切连接的方法嵌入到WPRES和Neo元件之间，并在改造后的载体上将扩增得到的CBA (chicken  $\beta$ -actin promoter, CBA序列来源NCBI) 启动子序列嵌合至CMV promoter之后。

[0031] 所述载体中：PCDH表示慢病毒载体PCDH；CMV表示CMV启动子；MCS表示多克隆位点；

EF1A表示<sub>EF1A</sub>启动子;MCHEERY表示荧光报告基因MCHEERY;T2A是一种基因转移工具,目的基因的载体;PURO表示嘌呤霉素抗性基因;PLVX表示慢病毒载体PLVX;CBA表示CBA启动子;IRES表示内部核糖体进入位点序列;NEO表示新霉素抗性基因;EGFP表示荧光报告基因EGFP。

#### [0032] 2重组慢病毒载体的包被

[0033] 利用DMEM培养基(含体积分数8%胎牛血清FBS)培养293T细胞,再利用脂质体3000(Lipofectamine 3000)将慢病毒基因组质粒PCDH-CMV-MCS-EF1A-MCHEERY-T2A-PURO(CD163)和PLVX-CBA-IRES-NEO-T2A-EGFP(SBQ)先后与慢病毒结构质粒psPAX2和囊膜质粒PMD2.G均按照质量浓度比4:3:1的比例转染到 $1 \times 10^6$ 个/孔293T细胞,转染16小时后更换DMEM培养基(含体积分数2%FBS)继续培养48小时,收集包含慢病毒的细胞上清,测定其病毒滴度。

#### [0034] 3 Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>稳定细胞株的筛选

[0035] 将Marc-145细胞按 $1 \times 10^5$ 个/ml的密度培养与96孔细胞板中,培养基为DMEM培养基(含体积分数8%FBS),24小时后,弃掉培养基,加入包装好的慢病毒液,再加入Polybrene,每孔的终浓度为5 $\mu$ g/ml。病毒感染12~20小时后,更换新鲜的培养基继续培养48小时。将细胞消化后转至6孔细胞板中培养,72小时以后,加入终浓度10 $\mu$ g/ml嘌呤霉素(puromycin)和1mg/ml G418的培养基对转导的Marc-145细胞株进行筛选。每培养24小时后,更换为正常培养基,培养至细胞汇合度30%以上,再更换为含10 $\mu$ g/ml嘌呤霉素(puromycin)和1mg/ml G418的培养基直到出现细胞克隆。通过显微镜观察,挑选细胞克隆,消化后利用有限稀释法在96孔细胞培养板中继续筛选,最后筛选到1株细胞生长状态良好且具有嘌呤霉素和G418抗性的Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>细胞株。在整个克隆筛选过程中,对克隆细胞株进行荧光的观察。

#### [0036] 4 Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>稳定细胞株的鉴定

[0037] 根据CD163和SBQ基因序列,分别设计1对检测引物,用于Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>稳定细胞株荧光定量RT-PCR检测。通过对Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>稳定细胞株和Marc-145对照组细胞提取RNA,利用荧光定量RT-PCR方法检测其转录水平,结果显示Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>稳定细胞株的转录水平高于Marc-145对照组细胞,且差异显著,如附图1所示。通过对Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>稳定细胞株的连续传代,传到35代时,再在荧光显微镜下观察CD163所带的红色荧光信号和SBQ所带的绿色荧光信号,结果显示仍然可以观察到上述两种荧光,如附图2所示。因此,本发明成功构建了Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>稳定细胞株。

#### [0038] 实施例2 Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>稳定细胞株的应用

##### [0039] 1细胞传代培养方法

[0040] 从液氮罐中取出盛装Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>细胞株细胞管置37 $^{\circ}$ C水浴中迅速融化,将Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>细胞株F2移入装有15ml无血清培养基的离心管中,1000rpm离心5分钟。利用DMEM培养基(含体积分数8%FBS)悬浮细胞,37 $^{\circ}$ C培养,当覆盖率达到100%时用胰酶消化细胞,按1:3~1:4传代培养,同时培养未改造的Marc-145细胞作为对照。

##### [0041] 2Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>细胞株在生物反应器中的培养

[0042] 将上述的改造细胞Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>细胞株Cytodex I上进行增殖培养。细胞培养参数为:溶氧40%,转速40r/m,pH值为7.2,培养体积为3L,细胞培养基为含10%新生牛血清

的DMEM。当细胞在微载体上长成致密状态时,接种疫苗毒株PRRSV(JXA1-R株),其接毒剂量按照0.01MOI进行。接毒参数为:溶氧40%,转速40r/m,pH值为7.4,接毒体积为3L,病毒增殖培养基为含2%新生牛血清的DMEM。同时利用未改造的Marc-145细胞作为对照,在相同的微载体和相同的细胞培养参数和接毒参数下进行。接毒后24小时开始取样,每隔6小时取1次,一直取样收获到接毒后54小时。

[0043] 3病毒含量测定

[0044] 将不同时间点收获的病毒液用无血清DMEM细胞培养液稀释,取 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  4个稀释度,分别接种于已长成良好单层、弃去培养液的96孔细胞培养板,每个稀释度接种6孔,每孔0.1ml,同时设正常细胞对照组。置37℃、含5%CO<sub>2</sub>培养箱中吸附1小时后,每孔补加含4%新生牛血清的DMEM细胞培养液0.1ml。置37℃、含5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养观察5日,根据Reed-Muench法计算TCID<sub>50</sub>,结果如附图3所示。

[0045] 4猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(JXA1-R株)的制备

[0046] 将收获的由Marc-145<sup>CD163+SBQ</sup>细胞株增殖的PRRSV(病毒含量为 $10^{9.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml)用PBS稀释5倍,加入适量的耐热保护剂进行冻干。其冻干成品的病毒含量为 $10^{6.16}$ TCID<sub>50</sub>/头份,50头份/瓶,冻干的成品命名为试制01p。

[0047] 5仔猪的免疫

[0048] 将冻干的试制01p与成都天邦生物制品有限公司生产的蓝福佳(批号:201708)免疫试验4~6周龄仔猪(经RT-PCR及ELISA抗体检测为PRRSV抗原、抗体阴性用于本试验)15头。每批疫苗分别接种试验猪5头,每头耳根后部肌肉注射疫苗1头份,另取5头同条件的猪不免疫,作为对照,隔离饲养;注射后继续饲养观察28日,观察接种后动物的临床表现。

[0049] 6仔猪的攻毒

[0050] 免疫后第28日用高致病性PRRSV检验用强毒NVDC-JXA1株(病毒含量 $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml)肌肉注射所有猪均3ml。攻毒后逐日测量体温,观察临床症状,21日对存活猪进行剖检,观察肺脏病理变化,统计疫苗保护率。

[0051] 7仔猪攻毒保护效果统计

[0052] 攻毒后观察至21日,试制01p与成都天邦生物制品有限公司生产的蓝福佳(批号:201708)免疫组10头猪全部健活,对照组5头猪全部发病、3头死亡。说明试制01p疫苗和蓝福佳对高致病性PRRSV NVDC-JXA1株具有良好的保护作用。同时,疫苗免疫组体温正常,对照组仔猪体温有3日体温超过41℃。攻毒后10头免疫猪大体剖检均未见与猪蓝耳病相关病变,3头对照猪于8~16日之间死亡,死亡后剖检均见肺部呈不同程度的出血、实变灶。

[0053] 综上,本发明的方法可以制备得到稳定的、对PRRSV高度敏感的细胞株,具有良好的应用前景。

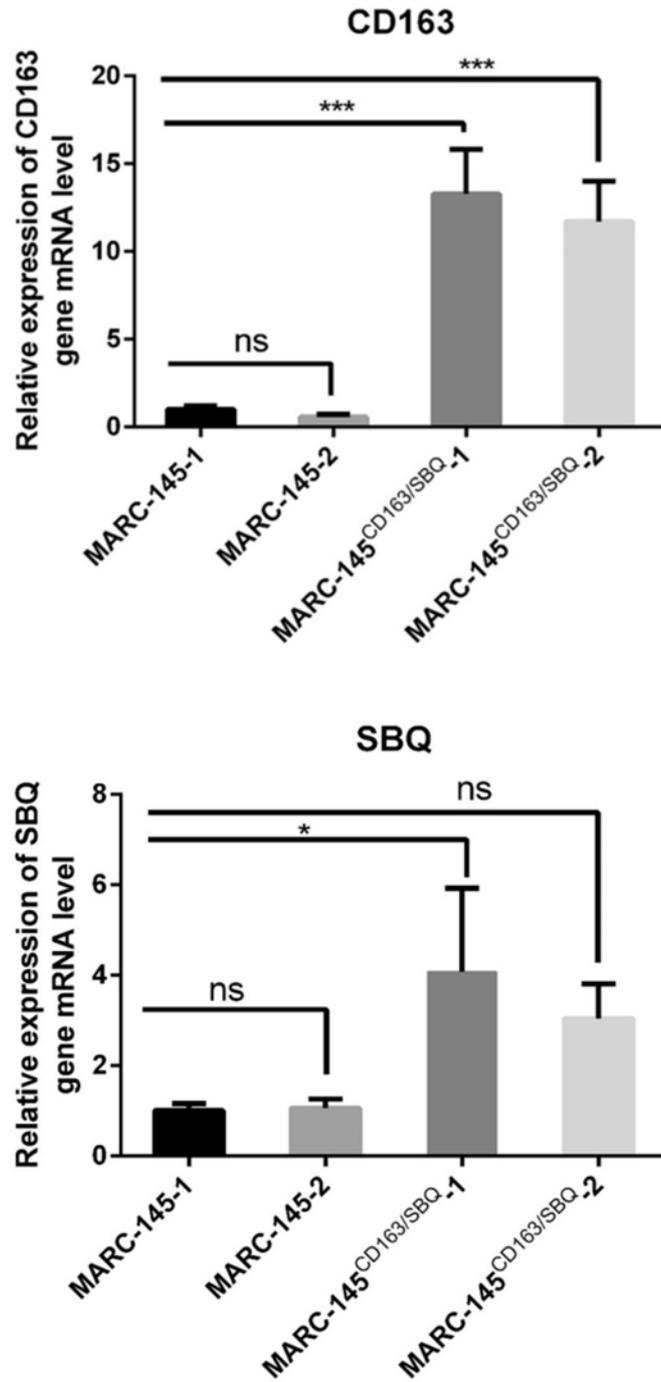


图1

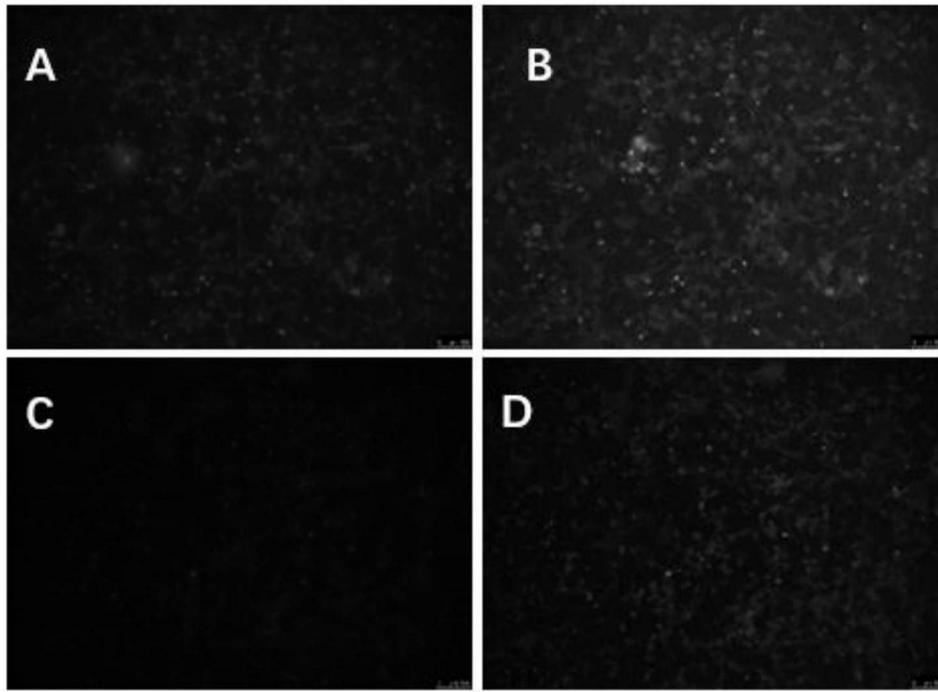


图2

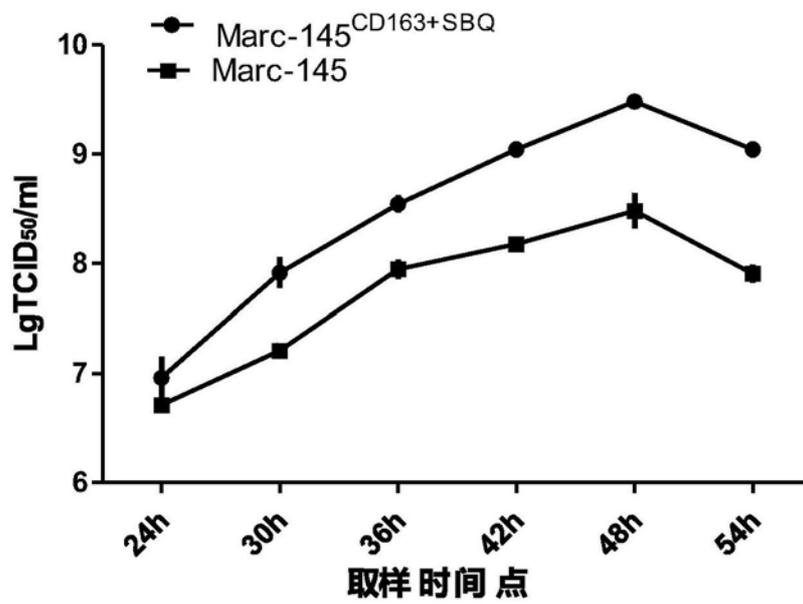


图3