

转瓶内部结构对无血清悬浮培养昆虫细胞的影响

赵 佼 戴 琥 谭文松

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237)

关键词 昆虫细胞,无血清,转瓶,悬浮培养

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0755-04

以昆虫细胞为宿主进行基因工程产品的开发是动物细胞培养领域十分有吸引力的研究方向^[1]。由于昆虫细胞对营养要求极高,且对培养环境非常敏感,所以一般是在含有兼具营养及保护功能的胎牛血清的培养基中进行培养。血清一方面因其高额成本而限制了昆虫细胞大规模培养技术的发展,另一方面又因其成分复杂、富含蛋白而给外源基因表达产物的后处理带来困难。因此,昆虫细胞无血清培养技术的开发一直是细胞培养工程领域的研究热点,采用无血清培养技术取代传统的有血清培养技术已成为昆虫细胞-杆状病毒表达系统的发展趋势^[2]。

然而,昆虫细胞无血清培养技术并非完美无缺,其不足之处主要表现在:1)目前的商业化无血清培养基(如 SF-900TM, EX-CELL400TM和 EX-CELL401TM)价格较贵,且仅有液体供应,影响了此类培养基的保存和应用。2)无血清培养基一般都要延长昆虫细胞的倍增时间,而且会增加细胞对培养环境(如某些机械因素和化学因素)的敏感性^[3]。

本文应用本实验室自行配制的无血清培养基 IC-SFM,考察了不同转瓶结构对昆虫细胞 Tn5 悬浮生长的影响,较好地解决了昆虫细胞无血清培养技术的一些不足之处,为在国内推广和应用此项技术提供了重要依据。

1 材料和方法

1.1 细胞系

粉蚊夜蛾细胞 BT1-Tn-5B1-4(以下简称 Tn5 细胞),由华中师范大学昆虫学研究所洪华珠教授惠赠。

1.2 培养基

无血清培养基 IC-SFM 由本实验室自行配制。它是以 IPL-41(SIGMA,USA)为基础培养基,并添加 2.0 g/L 水解乳蛋白(OXIDE,UK),2.0 g/L 酵母提取物(DIFCO,USA)以及由胆固醇等组成的脂质微乳液。配制时加 NaHCO₃ 0.35 g/L,调 pH 至 6.2 左右,然后用 0.2 μ m 的 Millipore 过滤器过滤除菌,放 4℃ 冰箱保存。

1.3 悬浮培养装置

不同结构的转瓶培养装置由本实验室参考 Wheaton 和

Techne 公司的产品结构自行设计加工。转瓶装液容积为 100 mL,其结构如图 1 所示。其中 1[#]转瓶在传统外包聚四氟乙烯的磁性搅拌子的基础上增加了两片同样由聚四氟乙烯加工而成的平叶桨,以加强转瓶的分散和混合性能。2[#]转瓶则采用纵向悬挂式搅拌结构,强力磁铁(上海磁性材料厂)被包埋在一端呈球形的玻璃棒内,此玻璃棒与搅拌纵轴通过高弹性硅胶管以悬挂方式相连。为保证此悬挂式搅拌器有足够大的径向搅拌幅度并防止细胞在瓶底中部的沉积,转瓶底部中心区域被加工成凸起的锥形。这种转瓶不仅能提供相对低剪切的培养环境,而且还可避免有机介质(聚四氟乙烯)对无血清生长的细胞可能造成的毒害。

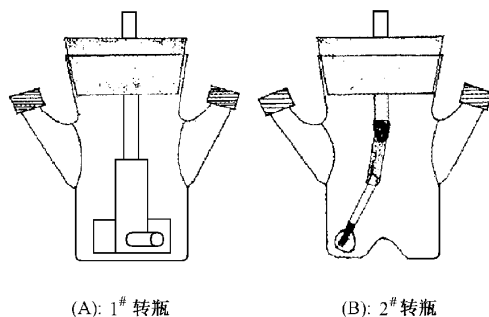


图 1 转瓶结构示意图

1.4 细胞培养

实验中取方瓶培养的处于对数生长期的 Tn5 细胞作为种子,加入 IC-SFM 无血清培养基将细胞吹打成单个悬浮细胞,并稀释成所需接种密度的细胞悬液。混合均匀后将细胞悬液分别接种于不同结构的转瓶中,每瓶装液量 40 mL,28℃ 恒温培养,转速 60 r/min。每隔 24 h 取样进行细胞计数,并测定葡萄糖、乳酸和氨含量。

1.5 测定方法

活细胞计数用台盼蓝染色法;葡萄糖、乳酸浓度由生化分析仪(YS12700,USA)检测。氨浓度测定使用上海生物制品研究所尿素氮测定试剂盒,其中尿素氮标准液改用硫酸铵标准液。

2 结果与讨论

2.1 Tn5 细胞的无血清悬浮培养

Tn5 细胞作为 90 年代开发的新型宿主细胞在昆虫细胞-杆状病毒表达系统中具有广阔的应用前景^[4]。由于 Tn5 细胞对培养环境非常敏感^[4,5],故较其他昆虫细胞系更难于在无血清培养基中悬浮生长。对培养系统进行优化(包括培养基和培养装置的设计)则可从外部环境上弥补 Tn5 细胞适应性差的缺陷。

表 1 不同转瓶中 Tn5 细胞的无血清培养*

Growth behavior	1 [#] spinner flask	2 [#] spinner flask
Population doubling time (PDT)/h	30.5	26.8
Maximum cell density (χ_{\max})/ $\times 10^6$ cells \cdot mL ⁻¹	5.49	6.22

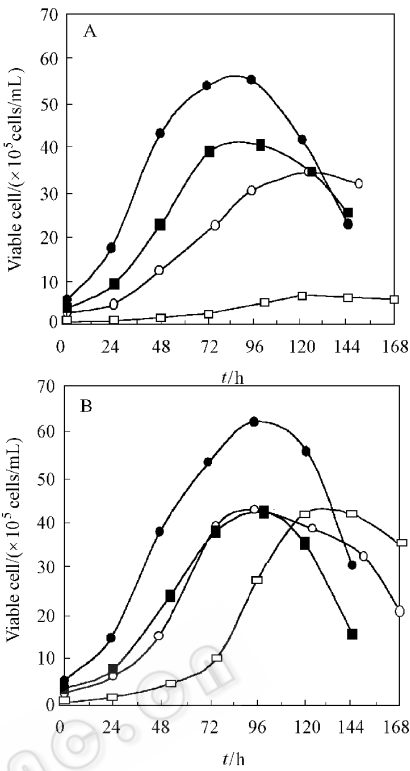
* Inoculum density 5×10^5 cells/mL

不同设计类型转瓶中 Tn5 细胞的无血清生长特性见表 1。结果表明:在 5×10^5 cells/mL 的接种密度下,以自配 IC-SFM 培养基悬浮培养 Tn5 细胞,两种转瓶最高细胞培养密度均超过了国外在同等接种密度下以市售 EX-CELL405™ 无血清培养基转瓶培养该细胞的培养水平(5×10^6 /mL)^[5]。细胞数倍增时间(PDT)也在文献报道的昆虫细胞体外培养时通常的 PDT 范围内(一般为 18~34 h)^[6],无明显延长现象,证明配制的无血清培养基在较高接种密度下可较好地支持不同类型转瓶中 Tn5 细胞的悬浮培养。

2.2 转瓶结构对 Tn5 细胞生长特性的影响

不同转瓶结构对 Tn5 细胞生长特性的影响可从各自对接种密度的需求上反映出来。一般认为,细胞在高接种量时对培养环境的适应力强,能更快地分泌某些进入对数生长期所必须的生长因子而快速增殖,因而细胞产量高^[7]。如果 Tn5 细胞对所处的培养环境不适应,就需要较高的接种密度以便利用细胞的“群体”效应来改变并适应不利的环境。

图 2 表明,Tn5 细胞在 1[#] 转瓶中的无血清悬浮生长明显受接种密度的影响很大,对低接种密度尤其敏感。当细胞接种量为 1×10^5 cells/mL 时,细胞生长速率明显减慢,最高细胞密度仅能达到 5×10^5 cells/mL。可见接种密度低,Tn5 细胞适应 1[#] 转瓶培养环境的能力也小,从而使细胞的生长处于停滞状态。2[#] 转瓶中接种密度对细胞生长的影响则与 1[#] 转瓶有很大的差异。在 $1 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ cells/mL 的接种范围内,接种量对细胞生长速率和最高培养密度并无显著影响,仅影响到细胞生长延迟期的长短。由此可以看出,2[#] 转瓶的内部结构确实可提供 Tn5 细胞一个培养环境相对温和的生存空间,使生性“脆弱”的 Tn5 细胞即使在无血清、低接种量的培养条件下也能避免外界环境对其的干扰损伤。不同转瓶中 Tn5 细胞的活性比较(图 3)也清楚地表明了转瓶间培养环境的差异对无血清悬浮培养的影响。



(A) 1[#] 转瓶 (B) 2[#] 转瓶

图 2 接种密度对不同转瓶中 Tn5 细胞无血清生长的影响
Inoculum density/($\times 10^5$) /mL: ● 5.0 ■ 4.0 ○ 3.0 □ 1.0

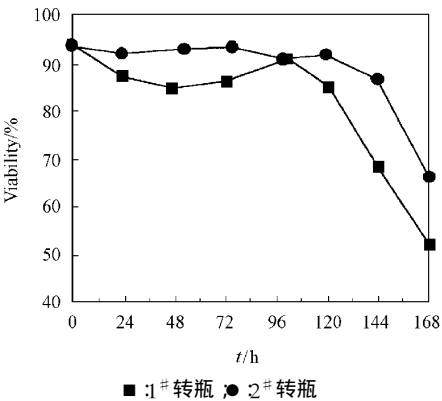


图 3 低接种密度下(1×10^5 /mL)不同转瓶中 Tn5 细胞的活性比较

就大规模培养而言,高接种量就意味着在培养开始前要制备大量的种子细胞,这不仅使操作复杂化,而且细胞的生理状态和产物表达量也常常会因种子细胞制备过程中的连续传代扩增而有所下降(即所谓的“代次效应”)。因此,尽管图 2 表明两种类型的转瓶中细胞均在 5×10^5 /mL 的高接种密度下显示出更为强劲的生长态势,工程上仍倾向于低接种量的培养工艺。2[#] 转瓶的实验结果表明设计合理的培养装置能够保证“脆弱”的 Tn5 细胞在无血清、低接种量的培养工艺下生长良好,应是无血清培养工艺优化的主攻方向之一。

2.3 转瓶结构对 Tn5 细胞代谢特性的影响

不同转瓶中 Tn5 细胞的碳源代谢见图 4(A、B)。与细胞生长相对应,2[#]转瓶在低接种密度下(1×10^5 cells/mL)葡萄糖代谢依然旺盛,当培养 140 h 以后,培养液中的葡萄糖已全部耗尽。1[#]转瓶则因细胞在低接种密度下生长停滞而导致培养液中残糖含量依然很高。

图 5(A、B)是不同转瓶中碳源的不完全代谢产物——乳酸

在培养液中的积累状况。在高接种密度下,不同转瓶中的乳酸含量均在经历了一段上升期后开始下降。由于乳酸含量的下降与培养液中葡萄糖的耗竭相对应,因而提示我们细胞在无可利用碳源的情况下会以碳源的不完全代谢产物作为其生长的替代碳源,从而导致培养液中乳酸含量的降低。在低接种量下,1[#]转瓶碳源始终充足,故乳酸因细胞生理代谢而一直呈累积状态,显示出与 2[#]转瓶在低接种密度下迥然不同的代谢特性。

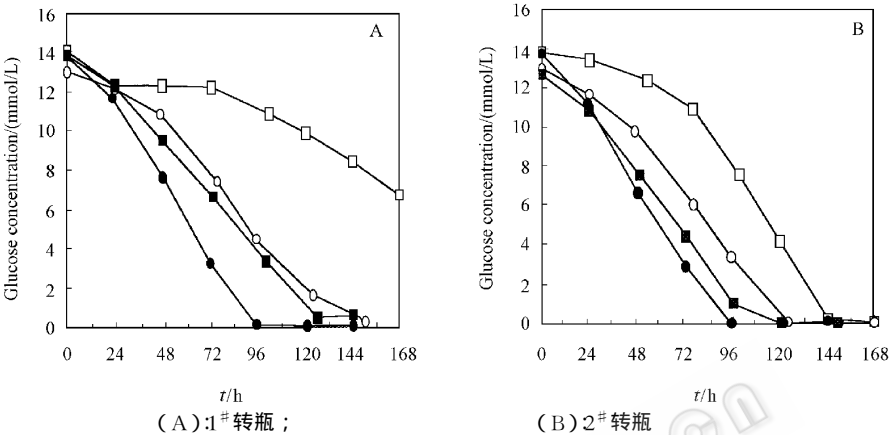


图 4 不同转瓶中 Tn5 细胞的葡萄糖代谢

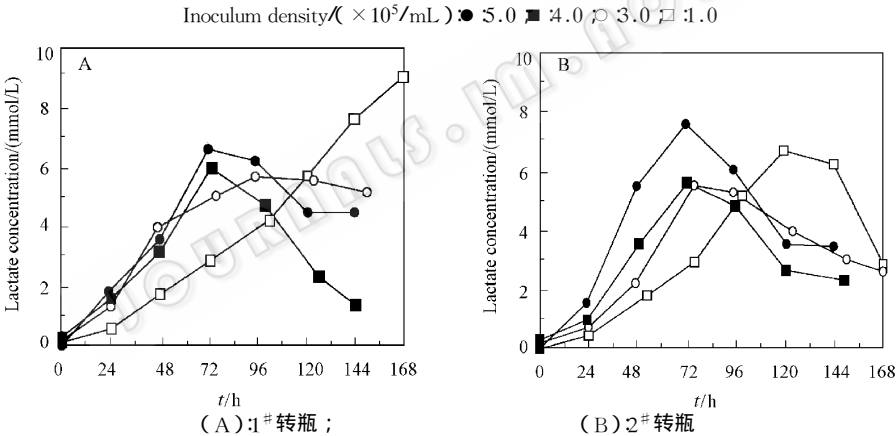


图 5 不同转瓶中 Tn5 细胞的乳酸代谢

与氨基酸代谢密切相关的重要代谢副产物——氨在培养液中的累积状况见图 6(A、B)。结果表明:不同转瓶中氨累

积状况基本相似,均在 4~6 mmol/L 之间,而且受细胞接种密度的影响不大。

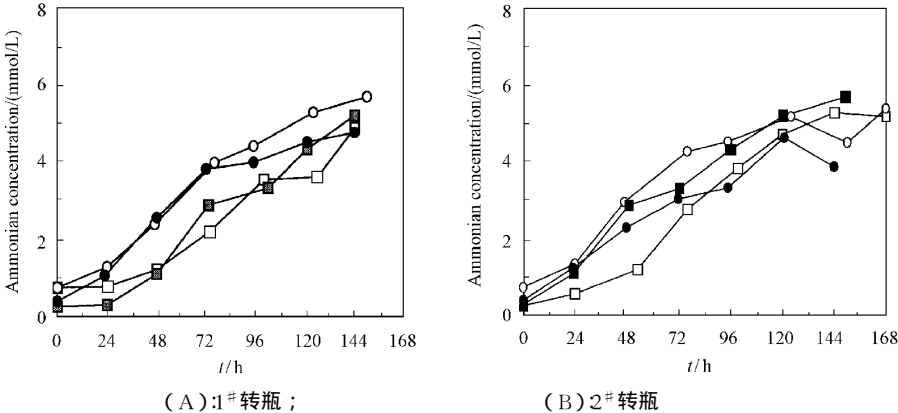


图 6 不同转瓶中 Tn5 细胞的氨代谢

上述 Tn5 细胞的代谢特征表明,此细胞的无血清悬浮培养与碳源代谢密切相关,当培养液中葡萄糖耗尽时,细胞生长即转入减速期,说明葡萄糖是 Tn5 细胞生长代谢的限制性

基质。可以预计,在设计合理的培养装置中进一步应用限制性基质补加技术将有望使这一无血清培养工艺更上一个台阶。

参 考 文 献

- [1] Goosen M F. The Can. *Journal of Chemical Eng.* 1991 **69** :450~456
- [2] Schlaeger F J. *Cytotechnology*. 1996 **20** :57~70
- [3] 邓继先,萧成祖. *生物工程进展*, 1993, **13** (4) :53~56
- [4] Kennie U D, Michael L S, Wood H A. *Biotechnology and Bioengineering*. 1997 **54** (3) :191~205
- [5] Taticek R A, McKenna K A, Granados R R *et al.* *Biotechnology Techniques*. 1997, **11** (4) :237~240
- [6] 陈因良,陈志宏. *细胞培养工程*. 上海:华东化工学院出版社, 1992, p127.
- [7] Wu J Y, King G, Daugulis A J *et al.* *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1990, **70** (2) :90~93

Effect of Inner Designs of Spinner Flasks on Serum-free Cultivation of Insect Cells in Suspension

ZHAO Jiao DAI Hu TAN Wen-Song

(*The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237*)

Abstract The good growth behavior was achieved for a *Trichoplusia ni* cell line, called Tn-5B1-4(Tn5) cells, in suspension culture by the use of IC-SFM serum-free medium developed by our lab. This medium, combined with the specially designed spinner flask with relatively good culture environment, could support the fragile Tn5 cells to grow well even in low inoculum density. The effect of inner designs of spinner flasks on cellular growth and metabolism was discussed on the basis of this culture system.

Key words Insect cells, serum-free, spinner flask, suspension culture