

流加微载体半连续培养分泌HBsAg的rCHO细胞过程研究

陈志宏 施源 丁健椿

(华东化工学院生化工程研究所, 上海)

本文在固定浓度微载体半连续培养rCHO细胞动力学研究的基础上, 通过逐步补加新的微载体以不断提高供细胞生长的表面, 提高了细胞密度和产物的表达量。建立了流加微载体半连续培养rCHO细胞收获HBsAg的工艺, 确定了此种培养方式的最大微载体浓度, 为建立微载体连续培养rCHO细胞生产HBsAg技术, 实现细胞高密度和产物高表达奠定了基础。

关键词 细胞培养; 微载体; HBsAg; CHO

对于培养乙肝基因工程rCHO细胞生产乙型肝炎表面抗原(HBsAg), 增加活性细胞密度是提高HBsAg浓度的有效途径, 在采用微载体培养贴壁细胞过程中, 当微载体浓度一定时, 供细胞生长的表面也一定, 这样, 细胞密度的提高就受到细胞生长表面的制约^[1]。如果在开始培养便采用高浓度微载体, 则势必接种大量种子细胞, 这在工业化生产中难以实现。于是, 首先采用低浓度微载体, 让细胞贴壁生长, 待细胞长满于微载体表面之后, 再逐步增加新微载体, 提供细胞生长所需的新的表面, 从而实现细胞的高密度和产物的高表达。

材料与 方法

(一)细胞株和材料

1. 细胞株: 表达HBsAg的基因工程细胞株(Bu3细胞), 是克隆HBV的HBsAg表达基因的重组DNA的rCHO细胞, 氨甲喋呤(MTX)作为基因扩增和阳性细胞筛选标志, 由中国预防医学科学院病毒学研究所建立。

2. 培养基: DMEM(GIBCO Labor-

atories, Life Technologies Inc., NY, USA)配制时加入L-脯氨酸 34.5g/L, 甘氨酸7.5g/L。使用前, 另加 200mmol/L 谷氨酰胺1%, 庆大霉素 50u/ml, 小牛血清 5—10%, 10^{-3} mmol/L 氨甲喋呤 1%。

3. 微载体: Cytodex 3(Pharmacia AB, Uppsala, Sweden)用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 缓冲液浸泡至少3h后, 更换PBS, 高压灭菌(121℃, 30min), 再用全培养基浸泡过夜, 供接种细胞。

(二)分析方法及仪器

1. 细胞计数: 取样品 1ml 于刻度试管中, 用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 缓冲液洗两次, 加入0.5%胰蛋白酶消化5min, 37℃, 离心(2000rpm, 5min), 去上清液, 加PBS缓冲液吹打, 用0.1%台盼蓝染色, 并稀释至一定倍数, 使用血球计数器计数活性细胞, 重复3次取平均值。

2. 葡萄糖浓度: 采用葡萄糖氧化酶(上海生物制品研究所)法, 在721分光光

本文于1990年4月9日收到。

本论文工作在长春生物制品研究所完成, 工作中得到了该所张权一、张兴义研究员的支持和关心以及官桂范、于洪涛等同志的帮助。同时, 也得到了中国预防医学科学院病毒学研究所任贵方教授的指导, 特此致谢。

度计(上海分析仪器三厂)上读取 A_{505nm} 值。

3. 乳酸浓度: 采用乳酸脱氢酶(Sigma)法^[2], 在日本岛津UV-265型紫外分光光度计上读取 A_{340nm} 值。

4. HBsAg 滴度: 采用反向被动血凝法^[3] (RPHA)检测。

(三) 实验装置及流程

本文采用 1.5L CelliGen™ 细胞培养系统(NBS Co., Edsion, NJ, USA), 装置流程如图 1 所示。

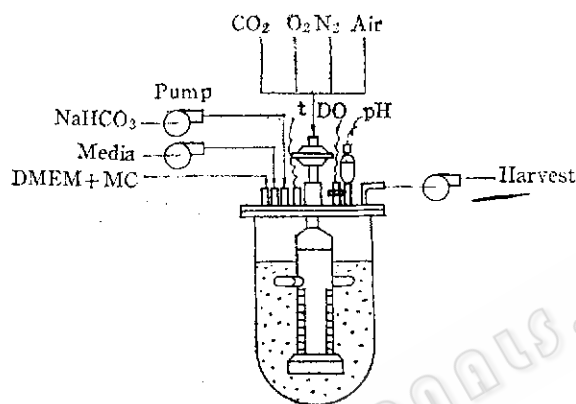


图 1 培养rCHO细胞装置流程图

Fig.1 Flow diagram of cultured rCHO cells

(四) 实验方法

让细胞在1/3体积培养液(约400ml)中与5g/L(6g)微载体接触, 然后, 补充培养液至工作体积(1200ml)培养, 48h 换液一次, 半连续培养, 待微载体上长满细胞之后, 分批加入新微载体 2g/L 至微载体浓度为 11g/L 为止。随着细胞密度的增加, 换液频率提高至24h 或 12h 一次。培养条件: pH为7.0—7.4, 溶氧(DO)为10—50%, 温度 $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 搅拌转速随微载体浓度增加而提高。

结果与讨论

(一) 补加微载体培养 rCHO 细胞生长

动力学

当最初5g/L微载体接种细胞培养7天后, 微载体上长满了细胞, 细胞密度达 2.0×10^8 cells/ml, 如图 2 所示。实验观察到rCHO 细胞在微载体表面生长呈单层后, 部分细胞开始脱落, 经显微镜观察和细胞活性分析实验证明, 这部分细胞在更新的表面和补充营养物质环境中仍具有生长繁殖能力, 经补加微载体悬浮培养实验观察到 rCHO细胞在微载体表面之间可以自由转移并贴壁生长。此时补加新的微载体给细胞以新的生长表面, 细胞则可以从长满的微载体上传递到新的微载体表面上生长, 使新的微载体表面逐渐长满细胞, 细胞密度得以增加。随着新微载体的加入, 供细胞生长的表面不断增加, 细胞密度也随之提高。当微载体浓度分别增至 7、9、11g/L 时, 细胞密度分别相应增至 2.9×10^8 、 5.6×10^8 、 7.5×10^8 cells/ml 的水平。但是微载体浓度并不是可以无限增加的^[4], 微载体作为提供细胞生长表面的载体, 存在着密度毒性抑制, 此限制的范围受到不同的反应器、不同培养工艺的制约, 其原因并不仅仅在于微载体本身, 更在于不断增加的微载体所生长的高密度细胞对培养环境中营养物质和能量供应提出了更高的要求, 而这受制于设备和工艺。当培养系统及培养方式确定情况下, 微载体浓度达到临界值时, 细胞正常生长代谢受到影响, 细胞的生理活性和密度逐步下降甚至造成细胞死亡。在 Celli-Gen™ 细胞培养系统中, 采用间歇换液的半连续方式微载体培养rCHO 细胞, 微载体最大浓度在10g/L左右。

(二) DO对rCHO细胞生长的影响

微载体悬浮培养高密度细胞过程中, 溶氧(DO)是一个重要因素之一, DO的高低直接影响到细胞的代谢途径和能量的产

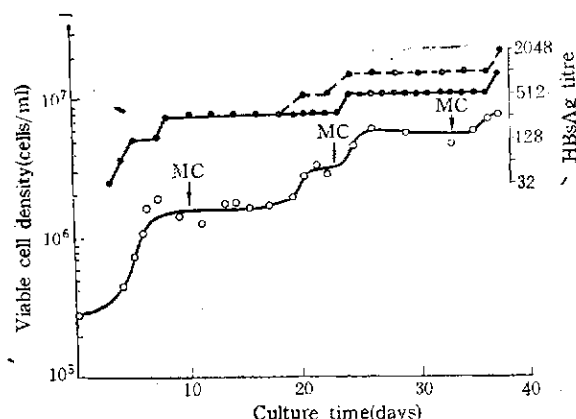


图2 流加微载体半连续培养rCHO细胞生长动力学及产物HBsAg分泌

Fig.2 Growth kinetics of rCHO cells and HBsAg secretion in semi-continuous culture by feeding of microcarriers

生, 从而影响其生长。DO 过低, 使细胞代谢受到抑制, 影响其正常生长; DO 过高, 又会对细胞产生毒性^[5], 降低其生长速率。合适的 DO 值与细胞种类及其所处的生长状态等有密切关系。细胞密度较低时, DO 水平要相应低一些, 处于对数生长期或维持期时, 随着细胞密度增加, 可以适当提高 DO 水平。以满足逐渐增多的细胞正常代谢所需。图 3 表示了 DO 对 rCHO 细胞比生长速率 (μ) 的影响, 在微载体高密度培养 rCHO 细胞过程中, DO 水平保持在 10—30% 是适宜的。

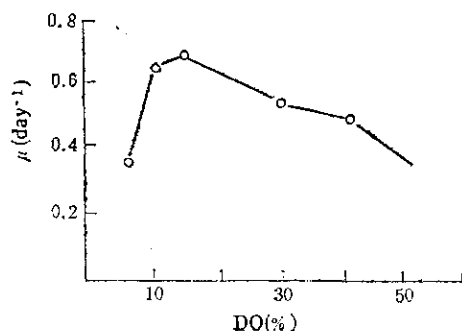


图3 DO对rCHO细胞生长的影响

Fig.3 Effects of DO on growth of rCHO cells

(三) 搅拌转速与微载体浓度的关系

对于微载体细胞培养, 搅拌程度影响

着细胞的贴壁及细胞对营养物质的吸收。在培养过程中, 转速过低造成微载体沉积, 不能提供足够的生长表面, 转速过高, 微载体上细胞易被过大的剪切力损坏或造成细胞脱落。因此, 对于微载体悬浮培养动物细胞, 选择一个合适的搅拌转速是至关重要的。在培养初期, 搅拌不利于细胞的贴壁和生长, 在培养后期, 由于细胞的生长, 微载体表面贴满细胞, 此时, 可以考虑适当增加搅拌转速, 这既可 not 致使微载体之间形成架桥, 又可改善主体溶液交换, 促进溶氧和营养物质的传递和供应。在采用分批补加微载体悬浮培养 rCHO 细胞过程中, 随着微载体的补加, 微载体浓度和细胞密度不断提高, 搅拌转速应随之相应提高。由图 4 的结果可见当微载体浓度分别为 2、4、7、9、11g/L 时, 搅拌转速分别为 25、30、35、38、40 rpm 是合适的。

(四) 补加微载体培养 rCHO 细胞的糖代谢及产物 HBsAg 分泌

采用补加微载体方式培养 rCHO 细胞时, 随着新微载体的加入, 细胞密度递

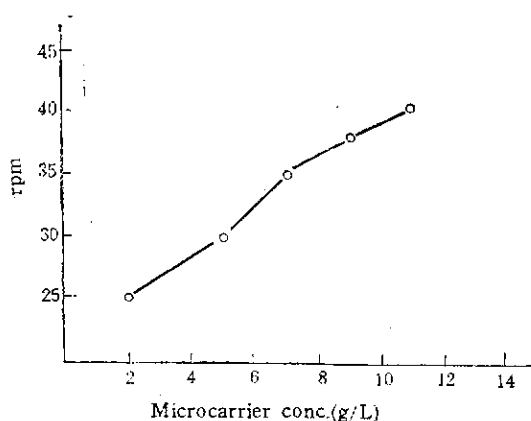


图4 搅拌转速与微载体浓度的关系

Fig.4 Relationship between stirring speed and microcarrier concentration

增, 葡萄糖的代谢和产物 HBsAg 的分泌也发生了变化。在培养初期, 微载体为

5g/L时,细胞密度相对低,耗糖慢,换液后48h糖浓度降为1g/L左右,产乳酸2g/L。当微载体增至7g/L时,耗糖加快,换液后24h,糖耗尽,同时,细胞将大量葡萄糖转化成乳酸,其浓度达3g/L。当微载体浓度增加至9g/L时,糖耗速率和乳酸生成速率进一步加快,更换新鲜培养基后12h,葡萄糖全耗尽。表明,随着微载体浓度的增加,细胞密度也提高,高密度细胞的生长和产物HBsAg的形成,使得细胞的糖耗速率和乳酸生成速率异常迅速,要求更快的换液频率以及及时提供给细胞生长所需之营养物质。当微载体浓度增至11g/L时,采用间歇换液的方式不能提供长时间维持细胞正常生长代谢所需的营养成分。表明,使用CelliGen™细胞培养系统采用间歇换液的半连续方式培养rCHO细胞,微载体最大浓度在10g/L左右。

rCHO细胞耗糖除了受细胞密度影响外,葡萄糖浓度的高低,对细胞的比糖耗速率(q_s)亦有很大影响,浓度高时,细胞的比糖耗速率快,但其利用率较低,如果定义葡萄糖消耗的选择性(β)为

$$\beta = 1 - \frac{\Delta L}{2 \cdot \Delta G}$$

其中, ΔG 表示葡萄糖的消耗量(mol/L), ΔL 为相应乳酸的生成量(mol/L)。

则 β 表示了葡萄糖的消耗中除去用于乳酸生成部分所占的比例,体现了葡萄糖利用率的高低。葡萄糖浓度在4.5g/L时,rCHO细胞对其比消耗速率快,但是,这些糖耗并不完全用于细胞生长,其选择性只有20%。如图5所示,80%的葡萄糖被细胞变成了乳酸,恶化了细胞生长环境,不利于细胞生长。糖浓度低时,rCHO细胞的比糖耗速率减慢,但其利用率提高,乳酸比生成速率(q_l)较低。如图6所示,可见,在rCHO细胞的培养过程中,宜采

用低糖浓度,但过低,不能满足细胞正常生长代谢的需求时,就会影响其生长和生存。因此,选用的糖浓度既要能维持细胞正常生长代谢,又要抑制糖酵解生成乳酸的速率。对于减少乳酸的生成,已有不少报道,如采用果糖或半乳糖替代葡萄糖^[6,7],虽都在不同程度上减少了乳酸的生成,但生产上仍采用葡萄糖作为碳源,因此,其浓度的控制显得十分重要。对于rCHO细胞的培养,实验表明,葡萄

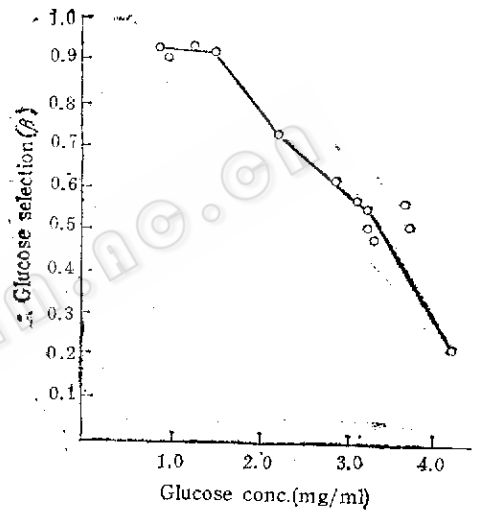


图5 葡萄糖浓度对葡萄糖选择性(β)影响
Fig.5 Effects of glucose concentration on glucose selection(β)

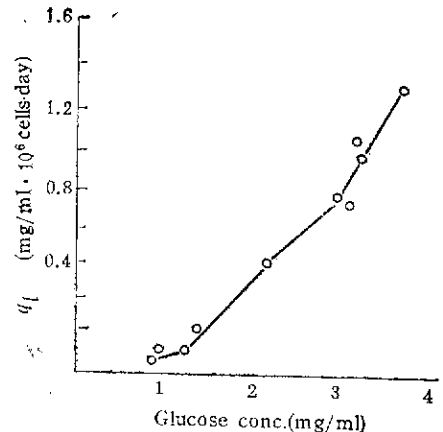


图6 葡萄糖浓度对乳酸比生成速率(q_l)影响
Fig.6 Effects of glucose concentration on lactate specific production rate(q_l)

糖浓度在 1.0g/L 时, 其利用率较好, 产生乳酸速率也较低, 而又不致对细胞生长产生影响, 因此, 将葡萄糖浓度维持在此水平对 rCHO 细胞培养是适宜的。

对于产物 HBsAg 的分泌, 如图 2 所示, 当微载体浓度为 5g/L, 微载体上长满细胞时, 每 48h 收液, HBsAg 滴度为 1:128—1:256, 随着微载体的加入, 细胞密度随之提高, 相应 HBsAg 分泌量也提高,

当微载体浓度为 7g/L 时, 每 48h 收液, HBsAg 滴度为 1:256—1:512。当微载体浓度增至 9 和 11g/L 时, 24h 收液, HBsAg 滴度分别为 1:512 和 1:1024, 相应于每 48h 收液 1:1024 和 1:2048 (如图 2 虚线所示)。表明, 采用补加微载体的方式增加微载体浓度是提高细胞密度, 从而实现 HBsAg 高表达的有效方法。

参 考 文 献

- [1] Van Hemert, P. et al., *Biotech. and Bioeng.*, 11:875—885, 1969.
- [2] Miller, W. M. et al., *Biotech. and Bioeng.*, 32:947—965, 1989.
- [3] 武建国等, 实用临床免疫学检验, 江苏科学出版社, pp.296—297, 1989.
- [4] Matthew, S. C. et al., *Biotech. and Bioeng.*, 32:975, 1989.
- [5] Taylor, W. G. et al., *Exp. Cell Res.*, 86:152—156, 1974.
- [6] Imamura, T. et al., *Fed. Proc.*, 39:2145, 1980.
- [7] Reitzer, L. J. et al., *J. Biol. Chem.*, 254:2659—2676, 1979.

Semi-continuous Microcarrier Culture of rCHO Cells Secreting HBsAg by Feeding Microcarriers

Chen Zhihong Shi Yuan Ding Jianchun

(Biochemical Engineering Institute, East China University of Chemical Technology, Shanghai)

On the basis of culturing rCHO cells semi-continuously on constant concentration of microcarriers, the cell yield and HBsAg expression were increased by feeding microcarriers step by step. The process for culturing rCHO cells semi-continuously to secrete HBsAg was established. The foundation has been laid for culturing rCHO cells continuously to reach high cell yield and high HBsAg expression.

Key words

Cell culture; microcarrier; HBsAg; CHO