

CHO 工程细胞无血清悬浮分批培养的生长代谢特征及动力学模型

刘兴茂, 刘红, 叶玲玲, 李世崇, 吴本传, 王海涛, 谢靖, 陈昭烈

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

摘要: 以悬浮适应的表达尿激酶原 CHO 工程细胞为研究对象, 在 100 mL 的摇瓶中进行无血清悬浮培养, 以细胞密度、细胞活力、Pro-UK 活性、葡萄糖比消耗速率 (q_{glc})、乳酸比生产速率 (q_{lac})、乳酸对葡萄糖的得率系数 ($Y_{\text{lac}/\text{glc}}$) 为观察指标, 同时以细胞有血清悬浮培养作为参照, 考察 CHO 工程细胞无血清悬浮培养生长和代谢特征。观察结果表明, CHO 工程细胞在无血清及有血清悬浮培养条件下表现为大致相似的细胞生长和代谢特征。在此基础上, 依据实际检测的数据, 应用 MATLAB 软件对细胞对数生长期的细胞生长、乳酸生成及葡萄糖消耗的模型参数进行非线性规划, 获得全局性收敛的最优参数估计值, 建立了细胞在无血清培养条件下的生长及代谢动力学模型。

关键词: CHO 工程细胞, 无血清培养基, 分批培养, 代谢动力学

Metabolic characteristics and kinetic model of recombinant CHO cells in serum-free suspension batch culture

Xingmao Liu, Hong Liu, Lingling Ye, Shichong Li, Benchuan Wu, Haitao Wang, Jing Xie, and Zhaolie Chen

Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: By using the cell density, cell viability, Pro-UK activity, specific consumption rate of glucose (q_{glc}), specific production rate of lactate (q_{lac}), yield of lactate to glucose ($Y_{\text{lac}/\text{glc}}$) and as the evaluation indexes, the growth and metabolism characteristics of pro-urokinase (Pro-UK) expressing CHO cells in serum-free suspension batch culture were examined and compared to those in serum-containing suspension batch culture. We observed hardly differences in growth and metabolism characteristics between the CHO cell populations grown in serum-free suspension batch culture and serum-containing suspension batch culture. The optimal mathematical model parameters for the CHO cells grown in suspension batch culture were obtained by non-linear programming of data representing the growth, substrate consumption and product formation of the CHO cells during logarithmic growth phase using MATLAB software, and the kinetic model of the cell growth and metabolism in serum-free culture were established.

Keywords: recombinant CHO cells, serum-free medium, batch culture, metabolic dynamics

基于实验数据的建模分析是实现细胞培养优化控制的基础。通过细胞生长动力学模型的建立, 不

Received: August 6, 2009; **Accepted:** November 9, 2009

Supported by: National Major Special Program of New Drug Research and Development (No. 2009ZX09503-011).

Corresponding author: Zhaolie Chen. E-mail: chenzl23@hotmail.com

重大新药创制科技重大专项 (No. 2009ZX09503-011) 资助。

仅有助于理解细胞的代谢和生理特征,也可以为过程控制和优化提供理论依据。在建模分析的过程中,常常需要借助于数学工具软件,在众多的数学工具软件中,目前 MATLAB 软件以其功能强大、使用方便的特点,成为建模分析最常用的数值处理软件,近年来 MATLAB 也被广泛地应用到微生物发酵及动物细胞大规模培养优化控制中^[1-2]。本研究以低血清悬浮适应的表达尿激酶原 (pro-urokinase, Pro-UK) CHO 工程细胞为研究对象,以自行设计的无血清培养基为培养介质,在悬浮分批培养模式下,以细胞有血清悬浮分批培养作为参照,考察了 CHO 工程细胞无血清悬浮分批培养的生长和代谢特征。在此基础上,为了更准确地描述细胞在无血清悬浮培养条件下的生长及代谢过程,应用 MATLAB 软件,根据 CHO 细胞无血清悬浮分批培养的实验结果,并分别依据 Logistic 方程^[3]、Luedeking & Piret 方程^[4]及质量平衡方程对细胞在对数生长阶段的细胞生长、乳酸生成及葡萄糖消耗进行了模拟,建立了细胞在无血清培养条件下的生长及代谢动力学模型。

1 材料

1.1 细胞株

适应悬浮培养的表达尿激酶原 CHO 工程细胞。

1.2 培养基

自行设计的无血清培养基: DMEM/F12(1:1) 为基础培养基,其他添加成分主要包括胰岛素、转铁蛋白、腐胺、微量元素等。

有血清培养基: 在 DMEM/F12(1:1) 中添加 1% 的小牛血清。

2 方法

2.1 细胞的悬浮培养

CHO 细胞以 $3 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^5$ cells/mL 接种于 100 mL 摇瓶内,培养体积 35 mL,培养时加入含有 5 mmol/L 谷氨酰胺、Pluronic F-68 (0.1%) 及硫酸葡聚糖 (25 μ g/mL) 的无血清或有血清培养基,摇床转速 90 r/min,置于 37℃ 温箱中培养。

2.2 细胞密度及活率测定

采用 Cedex AS20 细胞密度和活力自动分析系

统 (Innovatis, Germany) 进行细胞计数和活力分析。

2.3 培养上清中生化指标的测定

采用 YSI 7100 多参数生物分析系统 (Yellow Springs Instruments, USA) 定量检测细胞培养上清的葡萄糖、乳酸和谷氨酰胺的浓度。

2.4 蛋白表达活性的测定及计算

采用体外纤维蛋白琼脂板溶圈法检测 Pro-UK 体外纤维蛋白溶解活性^[5]。

2.5 无血清悬浮批培养的细胞生长代谢特征

在 100 mL 的摇瓶中进行无血清悬浮批培养,以细胞密度、细胞活力、Pro-UK 活性、葡萄糖比消耗速率 (q_{glc})、乳酸比生产速率 (q_{lac})、乳酸对葡萄糖的得率系数 ($Y_{\text{lac}/\text{glc}}$) 为考察指标,同时以有血清悬浮批培养作为参照,考察无血清培养条件下 CHO 细胞的生长和代谢特征。

2.6 无血清悬浮分批培养的细胞生长及代谢动力学模型的建立

依据细胞分批培养的细胞生长、底物消耗及产物形成的相关经验模型,并依据 2.5 中无血清分批培养实际检测的实验数据,应用 MATLAB 软件进行非线性规划,采用全局收敛的 Levenberg-Marquardt 法,获得了细胞对数生长期的细胞生长、葡萄糖消耗及乳酸生成的模型参数最优估计值,建立了细胞无血清分批培养对数生长期的生长及代谢动力学模型。

2.6.1 细胞生长动力学

目前常用 Monod 及 Logistic 方程来描述细胞生长动力学。Monod 方程是一种理论化的简单模型^[6],主要用来描述非抑制性单一底物限制情形下的细胞生长,Logistic 方程是一个典型的 S 型曲线,能较好地反映细胞分批培养过程中因细胞密度的增加对自身生长的抑制作用,且能较好地反映细胞分批培养的生长规律。

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) X \quad (1)$$

式 (1) 中, X 为细胞密度, μ_{\max} 为最大比生长速率, X_{\max} 为细胞密度生长上限。

初始条件 $t=0$ 时, 细胞密度 X 等于细胞初始密度 X_0 。求解式 (1) 分方程, 可得:

$$X = \frac{X_0 X_{\max} e^{\mu_{\max} t}}{X_{\max} - X_0 + X_0 e^{\mu_{\max} t}} \quad (2)$$

2.6.2 产物生成动力学模型

细胞代谢产物生成非常复杂, 定性的描述也很多, 产物生成动力学模型中较为通用的模型是由 Luedeking & Piret 所提出的数学表达式, 把产物生成率看作细胞生长率和细胞生长量的函数。

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (3)$$

式 (3) 中 α 、 β 为动力学参数, $\alpha \frac{dX}{dt}$ 为与细胞生长率相关的产物生成率, βX 为非伴随细胞生长的产物生成率。将 (1) 代入 (3) 式得:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \mu_{max} (1 - \frac{X}{X_{max}}) X + \beta X \quad (4)$$

初始条件 $t=0$ 时, 乳酸浓度 P 等于接种初始的乳酸浓度 $P=0$ 。对 (4) 式积分可得:

$$P = \alpha (\frac{X_0 X_{max} e^{\mu_{max} t}}{X_m - X_0 + X_0 X_{max} e^{\mu_{max} t}} - X_0) + \beta \frac{X_{max}}{\mu_{max}} \ln[1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - e^{\mu_{max} t})] \quad (5)$$

其中, P 为乳酸浓度, μ_{max} 为最大比生长速率; X_0 为细胞初始接种密度; X_{max} 为细胞密度生长上限, α 和 β 为常数。

2.6.3 底物消耗动力学模型

在细胞无血清批次悬浮培养的过程中, 其消耗主要有 3 个方面: 一是细胞生长的消耗, 用以合成新的细胞; 二是细胞维持基本生命活动的消耗; 三是用于合成代谢产物的消耗。因此底物消耗动力学模型可表示为:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dX}{dt} \frac{1}{Y_{X/S}} + m_x X + \frac{dP}{dt} \frac{1}{Y_{P/S}} \quad (6)$$

其中 $Y_{X/S}$ 为葡萄糖用于细胞生长的得率常数; $Y_{P/S}$ 为葡萄糖用于产物积累的得率常数; m_x 为细胞的维持系数。将 (3) 式代入 (6), 整理后可得:

$$-\frac{dS}{dt} = (\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{\alpha}{Y_{P/S}}) \frac{dX}{dt} + (\frac{\beta}{Y_{P/S}} + m_x) X \quad (7)$$

初始条件 $t=0$ 时, 葡萄糖浓度 S 等于初始葡萄糖浓度 S_0 。求解式 (7) 积分得:

$$S = S_0 - (\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{\alpha}{Y_{P/S}}) (\frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} - X_0) - (\frac{\beta}{Y_{P/S}} + m_x) \frac{X_m}{\mu_m} \ln[1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu_m t})] \quad (8)$$

3 结果

3.1 CHO 工程细胞无血清分批培养条件下的生长代谢特征

图 1 所示细胞在无血清和有血清培养条件下的细胞增殖呈现大致相似的变化趋势, 随着培养时间的增加, 细胞密度逐渐增加, 在培养至 96 h 细胞密度达到最大, 分别为 3.9×10^6 cells/mL 和 2.5×10^6 cells/mL, 细胞在对数生长期平均比生长速率分别为 0.61 d^{-1} 和 0.49 d^{-1} , 随后细胞密度呈现逐渐下降的趋势, 至培养结束时细胞密度分别为 2.5×10^6 cells/mL 和 1.4×10^6 cells/mL; 两种培养条件下的细胞存活率没有明显差异, 细胞在无血清培养条件下的细胞活率总体略好于有血清培养, 且在整个培养过程中细胞维持较高的活率。两种培养条件下的 Pro-UK 活性变化趋势也大致相近, Pro-UK 最大活性分别为 5614 IU/mL 和 3513 IU/mL, 结果表明细胞在无血清培养条件下的细胞密度及 Pro-UK 活性, 与有血清培养相比均有了较大程度地提高。

图 2 所示为细胞在无血清和有血清培养条件下细胞的代谢特征。在无血清及有血清培养条件下, 培养上清葡萄糖浓度随着培养时间的延长而逐渐降低, 呈现出培养前期下降较快、中后期下降减缓的趋势, 至培养结束时上清中葡萄糖浓度降至最低, 分别为 5.03 mmol/L 和 7.19 mmol/L。两种培养条件下葡萄糖比消耗速率 (q_{glu}) 变化趋势大体相近, 总体呈现先升后降的变化趋势, 在培养初期 q_{glu} 随着细胞密度的增加而逐渐增加, 培养至 72 h q_{glu} 达到最大, 分别为 $1.81 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$ 和 $2.25 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$, 之后随着细胞密度的增大, q_{glu} 逐渐下降, 在培养后期由于细胞密度的下降及细胞生理特性的改变, q_{glu} 略有升高。两种培养条件下在对数生长期葡萄糖平均比消耗速率分别为 $1.33 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$ 和 $1.40 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$, 结果说明两种培养条件下葡萄糖平均比消耗速率没有明显差异。

在无血清及有血清培养条件下, 在培养初期培养上清中乳酸浓度随着培养时间的延长而不断累积, 培养至 120 h 浓度达到最大, 分别为 8.97 mmol/L 和 6.52 mmol/L, 随后培养上清中乳酸的浓度又呈现

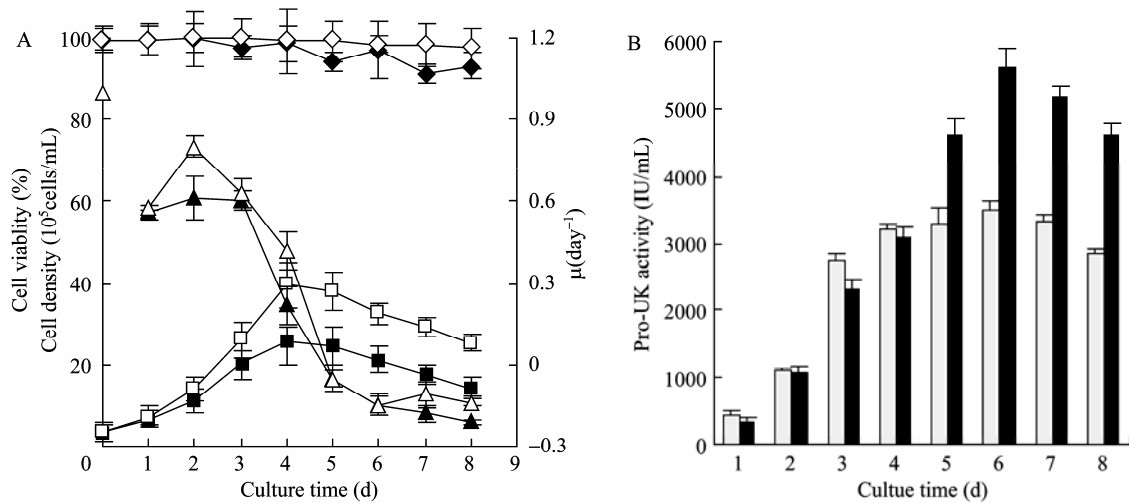


图1 细胞在不同培养条件下的细胞生长 (A) 及Pro-UK活性 (B)

Fig. 1 Growth (A) and Pro-UK activity (B) of CHO cells in different culture conditions. (A) ▲: the specific growth rate of cells cultured in serum-containing medium; △: the specific growth rate of cells cultured in serum-free medium; ■: density of cells cultured in serum-containing medium; □: density of cells cultured in serum-free medium; ◆: viability of cells cultured in serum-containing medium; ◇: viability of cells cultured in serum-free medium. (B) ▤: protein activity of cells cultured in serum-containing medium; ■: protein activity of cells cultured in serum-free medium. Data presented in figure are averages from three experiments, expressed in $M \pm SD$.

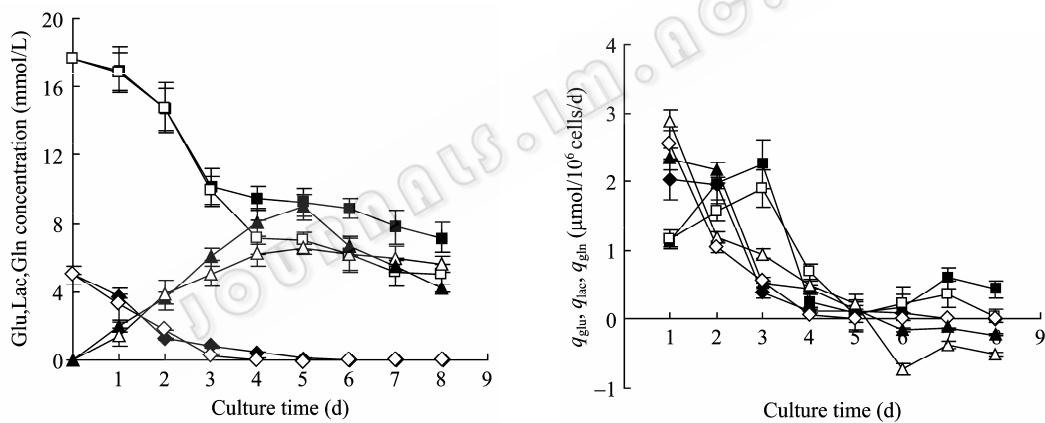


图2 细胞在不同培养条件下的生长代谢

Fig. 2 Metabolism characteristics of CHO cells cultured in different culture conditions. ■: the glu concentration and q_{glu} of cells cultured in serum-containing medium; □: the glu concentration and q_{glu} of cells cultured in serum-free medium; ▲: the lac concentration and q_{lac} of cells cultured in serum-containing medium; △: the lac concentration and q_{lac} of cells cultured in serum-free medium; ◆: the gln concentration and q_{gln} of cells cultured in serum-containing medium; ◇: the gln concentration and q_{gln} of cells cultured in serum-free medium. Data presented in figure are averages from three experiments, expressed in $M \pm SD$.

逐渐下降的趋势, 至培养结束时上清中乳酸浓度分别降至 5.62 mmol/L 和 4.19 mmol/L; 提示在培养后期, 由于细胞生理状态的改变, 细胞同时消耗葡萄糖及乳酸, 用于维持细胞的活力。两种培养条件下乳酸比生产速率 (q_{lac}) 变化总体呈现下降的趋势, 两种培养条件下在对数生长期乳酸平均比生产速率分别为 $1.38 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$ 和 $1.36 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$, 且两种培养条件下在对数生长期乳酸对葡萄糖平均得率系数 ($Y_{lac/glu}$) 分别为 $1.06 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 、 $0.97 \mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ 。

结果说明两种培养条件下乳酸平均比生产速率及乳酸对葡萄糖平均得率系数没有明显差异。在无血清及有血清培养条件下, 培养上清中谷氨酰胺的浓度随着培养时间的延长而逐渐降低, 培养至 72 h 时, 培养上清中谷氨酰胺分别降为 0.39 mmol/L 和 0.56 mmol/L; 两种培养条件下谷氨酰胺比消耗速率 (q_{gln}) 变化总体呈现下降的趋势, 两种培养条件下谷氨酰胺平均比消耗速率分别为 $1.06 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$ 和 $1.12 \mu\text{mol}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$, 说明两种培养条件下 q_{gln}

没有明显差异。

3.2 细胞无血清分批培养生长及代谢动力学模型的建立

在动物细胞的动力学研究中，所用的动力学模型多为经验模型，并且大多数只能分段描述，对于细胞对数生长期的生长及代谢过程可以较好地模拟，但都不能很好地模拟细胞生长的整个过程。在细胞无血清分批培养生长及代谢动力学研究中，根据 CHO 细胞无血清悬浮分批培养的实验结果，并分别依据 Logistic 方程、Luedeking & Piret 方程及质量平衡方程对细胞在对数生长阶段的细胞生长、乳酸生成及葡萄糖消耗进行了模拟。将式 (2)、(5)、(8) 自定义为拟合函数，根据实际测得的细胞无血清及有血清分批培养中所测得的细胞密度、乳酸生成及葡萄糖消耗实验数据，并运用 MATLAB 软件中的曲线拟合工具箱对数据进行非线性拟合，可分别求得各个参数，结果见表 1。细胞在两种培养条件下在细胞对数生长期细胞生长、乳酸生成及葡萄糖消耗的实验值与模型拟合图见图 3~5。

从图 3 可以看出在细胞对数生长期，模拟计算的细胞密度变化曲线与实验数据吻合较好，置信度选为 0.95。模型经 F 检验后显著性很高，无血清及有血清培养条件下的 R^2 分别为 0.979 和 0.985，即在无血清及有血清培养条件下模型分别在 97.9% 及 98.5% 的概率水平上非常显著。说明这一模型较好地描述了两​​种培养条件下细胞生长的实际过程。

表 1 细胞无血清及有血清悬浮分批培养各参数比较
Table 1 Kinetics model parameter of the CHO cells in serum-free and serum-containing suspension batch culture

Culture parameter	Culture mode	
	Serum-free	Serum-containing
$\mu_{max}(d^{-1})$	1.21	1.17
$X_0(10^6\text{ cells/mL})$	0.19	0.22
$X_{max}(10^6\text{ cells/mL})$	4.21	2.66
$\alpha(\text{mmol/L}/10^6\text{ cells})$	2.69	3.31
$\beta(\text{mmol/L}/(10^6\text{ cells}\cdot\text{d}))$	-0.14	-0.15
$Y_{x/s}(10^6\text{ cells}/\mu\text{mol})$	1.27	0.97
$Y_{p/s}(\mu\text{mol}/\mu\text{mol})$	1.26	1.22
$m_x(10^6\text{ cells}/(10^6\text{ cells}\cdot\text{d}))$	0.12	0.13

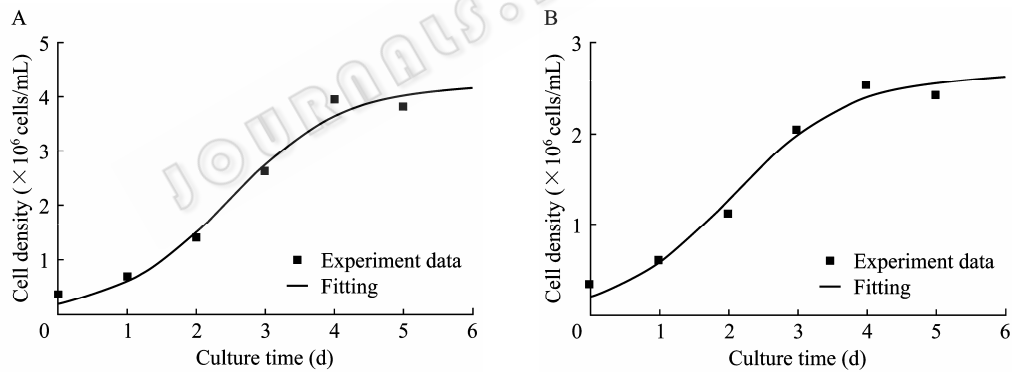


图 3 无血清 (A) 及有血清 (B) 悬浮分批培养细胞生长实验值与模型拟合值的比较
Fig. 3 Fitting curve of the cells growth in serum-free and serum-containing suspension batch culture. (A) Serum-free. (B) Serum-containing.

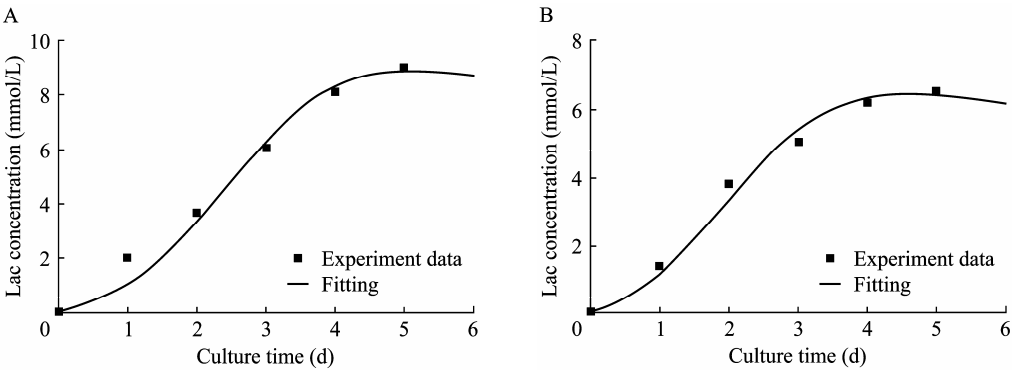


图 4 无血清 (A) 及有血清 (B) 悬浮分批培养乳酸生成实验值与模型拟合值的比较
Fig. 4 Fitting curve of the lactate accumulation of cells in serum-free and serum-containing suspension batch culture. (A) Serum-free. (B) Serum-containing.

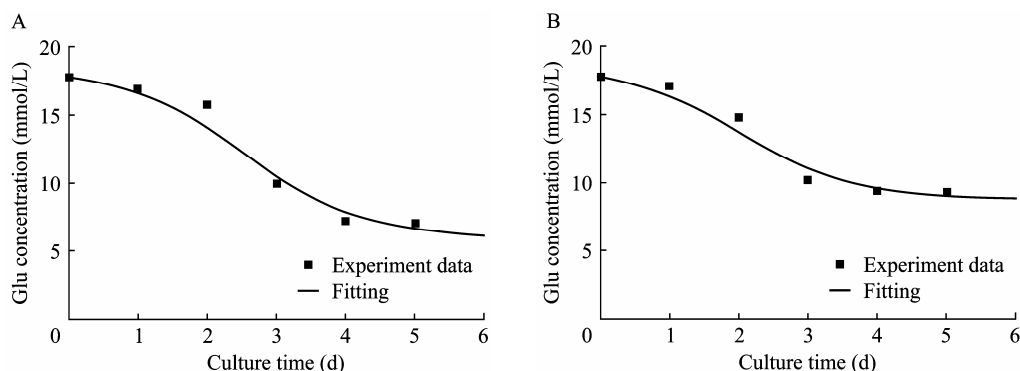


图5 无血清 (A) 及有血清 (B) 悬浮分批培养葡萄糖消耗实验值与模型拟合值的比较

Fig. 5 Fitting curve of the glucose consumption of cells in serum-free and serum-containing suspension batch Culture. (A) Serum-free. (B) Serum-containing.

从图4可以看出,在细胞对数生长阶段,模拟计算的乳酸生成变化曲线与实验数据拟合情况比较理想,置信度选为0.95。模型经 F 检验后显著性很高,无血清及有血清培养条件下的 R^2 分别为0.971和0.983,即在无血清及有血清培养条件下模型分别在97.1%及98.3%的概率水平上非常显著。说明建立的产物生成模型可用于描述两种培养条件下细胞悬浮分批培养乳酸的生成。

从图5可以看出在细胞对数生长阶段,模拟计算的葡萄糖消耗变化曲线与实验数据拟合情况比较理想。模型经 F 检验后显著性很高,无血清及有血清培养条件下的 R^2 分别为0.963和0.961,即在无血清及有血清培养条件下模型分别在96.3%及96.1%的概率水平上非常显著。说明该方程在细胞对数生长阶段能很好地描述两种培养条件下细胞悬浮分批培养葡萄糖消耗随时间变化的关系。

综上所述,细胞在无血清批次培养条件下的对数生长期的细胞生长、乳酸生成及葡萄糖消耗的力学模型方程如下:

$$\text{细胞生长: } \frac{dX}{dt} = 1.21(1 - \frac{X}{4.2})X \quad (9)$$

$$\text{乳酸生成: } \frac{dP}{dt} = 2.69 \frac{dX}{dt} - 0.14X \quad (10)$$

$$\text{葡萄糖消耗: } -\frac{dS}{dt} = \frac{dX}{dt} \frac{1}{1.37} + 0.05X + \frac{dP}{dt} \frac{1}{1.05} \quad (11)$$

4 讨论

通常情况下,当细胞从有血清的状态下进入无

血清环境时,由于存在代谢转换,会出现细胞生长滞迟的现象,因此细胞常常需要在无血清培养环境中进行适应^[7-8]。在本研究中,当CHO工程细胞从有血清培养基转入无血清培养基中时,细胞并没有出现常见的细胞生长滞迟的现象,对比有血清及无血清条件下细胞培养初期的比生长速率(图1),在培养至24 h时,两种培养条件下比生长速率分别为 0.56 d^{-1} 和 0.58 d^{-1} ,培养至48 h时两种培养条件下比生长速率达到最大,分别为 0.61 d^{-1} 和 0.80 d^{-1} ,说明在进行CHO工程细胞无血清悬浮培养时,当细胞经历了低血清的悬浮适应后,细胞无须再进行无血清悬浮适应,就可以较快地生长。但从图2可以看出,在无血清培养条件下,细胞在培养初始的葡萄糖比消耗速率、谷氨酰胺比消耗速率及乳酸比生产速率明显高于有血清培养条件,之后细胞的葡萄糖比消耗速率及乳酸比生产速率总体上低于有血清,结果提示当细胞从有血清培养基转入无血清培养基后,细胞可能需要一个较为短暂的适应过程,因此在培养初始增加了能耗,产生了较多的乳酸。

一些研究表明,杂交瘤细胞系葡萄糖代谢过程中,乳酸的生成存在着切换作用,最近通过对这种代谢切换的分子机制进行研究,发现当葡萄糖浓度从高变低时会引起代谢的变换,切换的结果是乳酸的产率下降,有时会降到零^[9-10]。图2所示在细胞培养的平台期及衰退期由于细胞密度及培养上清中葡萄糖浓度的逐步下降,细胞的葡萄糖的消耗基本维持在一个较低的水平,同时乳酸也不再产出,培养

上清中乳酸累积量呈现出逐渐下降的趋势。结果提示细胞在悬浮培养的后期,可能是由于细胞生理状态的改变,细胞的代谢途径发生了变化,细胞同时消耗葡萄糖及乳酸,用于维持细胞的活力。总体而言,依据细胞在两种培养条件下对数生长期的葡萄糖平均比消耗速率及乳酸平均比生产速率,表明细胞在无血清培养条件下对葡萄糖具有更高的利用效能,不仅有效地支持了细胞的生长及蛋白的表达,也提高了细胞对葡萄糖的利用效率。

细胞培养的动力学模型可以分为非结构模型和结构模型两大类结构模型,非结构模型是一种经验性模型,来自对生物过程基本现象的观察,可用于描述细胞培养中很多重要的特性,在生物过程的控制和优化中经常用到^[11-12];结构模型是基于细胞内部的结构和生化反应及其调节机制,主要包括化学计量平衡模型、代谢流模型及控制论模型等,在动物细胞培养中,用化学计量平衡和代谢流分析的方法研究代谢路径已经开展了多年,并取得了不少成果^[13-14]。然而由于动物细胞系统非常复杂,对于细胞内生物过程的数学描述只能是近似的,因此在对动物细胞培养的研究中,多使用非结构模型。在建立细胞生长及代谢动力学模型时,需根据经验和细胞生长代谢特性,并经反复验证,不断修正参数,从而使模型能更好地反映细胞生长代谢的内在规律。在求解参数时,常需借助各类计算机软件如 SAS、Origin 及 SPSS 等软件,对动力学模型参数进行非线性拟合,并以绝对误差平方和最小为目标,多采用 Runge-Kutta 法、Marquardt 法及遗传算法等方法求解参数。近年来随着 MATLAB 软件功能的日益完善及各类工具箱的开发, MATLAB 软件的应用几乎覆盖了各行各业。MATLAB 软件也被逐渐应用于动物细胞的生长及代谢动力学模型的建立。

本研究应用 MATLAB 软件的拟合工具箱,并根据实验数据和经验获得模型参数的初估值,采用经 Levenberg-Marquardt 修正的高斯-牛顿法,以全局性收敛为目标,不断修正模型参数的初估值,获得最优估计参数。结果表明细胞在无血清培养条件下的对数生长期的细胞生长、乳酸生成及葡萄糖消耗的动力学模型方程基本反映了细胞对数生长期的细胞

生长、基质葡萄糖消耗及乳酸产出的内在规律。虽然 Logistic 方程只涉及到了最大比生长速率,未能对整个培养过程中的比生长速率的变化规律进行详尽的描述,但是也比较本质地反映了细胞生长的快慢。通过产物生成动力学模型确定的乳酸与细胞耦联参数 α 和非耦联参数 β ,较清晰地反映了细胞生长与乳酸产出的关系。底物消耗动力学模型所确定的碳源用于细胞生长的得率常数 $Y_{x/s}$ 和碳源用于乳酸生成的得率常数 $Y_{p/s}$ 与细胞在无血清及有血清条件下生长的实际状况基本吻合,也进一步印证了细胞在无血清培养条件下对葡萄糖具有更高的利用效能。

REFERENCES

- [1] Sauer PW, Burky JE, Wesson MC. A high-yielding generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **67**(5): 585-597.
- [2] Senger RS, Karim MN. Optimization of fed-batch parameters and harvest time of CHO cell cultures for a glycosylated product with multiple mechanisms of inactivation. *Biotechnol Bioeng*, 2007, **98**(2): 378-390.
- [3] Bailey JE, Ollis DF. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd Ed. New York: Mc-Graw-Hill Book Company, 1986.
- [4] Luedeking R, Piret EL. A kinetic study of the lactic acid fermentation: batch process at controlled pH. *J Biochem Microbiol Technol Eng*, 2004, **1**(4): 393-412.
- [5] Han SW, Yu WY, Li XZ, *et al.* Study on plasminogen activators secreted by various cultured cells. *Bull Acad Mil Med Sci*, 1987, **11**: 101-108.
韩素文, 俞伟源, 李秀珍, 等. 培养细胞分泌的血纤蛋白溶解酶原激活物的研究. 军事医学科学院院刊, 1987, **11**: 101-108.
- [6] Monod J. The growth of bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol*, 1949, **3**: 364-371.
- [7] Kurano N, Leist C, Messi F, *et al.* Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. Effects of physical and chemical environments. *J Biotechnol*, 1990, **15**(1): 101-112.
- [8] Ozturk SS, Palsson BO. Physiological changes during the adaption of hybridoma cells to low serum and serum-free media. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **37**(1): 35-46.
- [9] Europa AF, Gambhir A, Fu PC, *et al.* Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*, 2000,

- 67(1): 25–34.
- [10] Korke R, Gatti Mde L, Lau AL, *et al.* Large scale gene expression profiling of metabolic shift of mammalian cells in culture. *J Biotechnol*, 2004, **107**(1): 1–17.
- [11] Zeng AP, Bi J. Cell culture kinetics and modeling//Ozturk SS, Hu WS. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Therapies. Atlanta: Taylor & Francis Group, 2003: 299–347.
- [12] Goudar CT, Joeris K, Konstantinov KB, *et al.* Logistic equations effectively model mammalian cell batch and fed-batch kinetics by logically constraining the fit. *Biotechnol Prog*, 2005, **21**(4): 1109–1118.
- [13] Provost A, Bastin G. Dynamic metabolic modeling under the balanced growth condition. *J Proc Cont*, 2004, **14**(7): 717–728.
- [14] Novák B, Tyson JJ. A model for restriction point control of the mammalian cell cycle. *J Theor Biol*, 2004, **230**(4): 563–579.

《生物工程学报》2010 年“代谢工程”专刊征稿通知

代谢工程自 1991 年诞生以来,在改造植物、动物、微生物的代谢功能方面得到了广泛的应用。为了展现代谢工程科研工作者取得的最新进展,促进我国代谢工程研究的进步和发展,本刊 2009 年第 9 期设立了“代谢工程与细胞工厂”专栏,国内该领域著名学者对代谢工程的技术发展进行了总结,介绍了合成生物学等新理论和新技术,并发表了一些最新的研究成果。此专栏出版后,推动了代谢工程领域国内外同行的交流,并因刊出周期短和内容质量高得到了广大作者和专家的一致好评。代谢工程是一门快速发展的新兴学科,创新成果不断涌现,为及时、集中反映该领域的最新研究进展,本刊编辑部计划于 2010 年 9 月继续出版“代谢工程”专刊。

为缩短审稿时间、加快专刊稿件的出版速度,本刊将专门组织 6~10 人的专家评委会,严格按照《生物工程学报》评审要求对稿件进行认真评审。对所收稿件进行快速处理,最终择优筛选出一定数量的稿件以专刊出版,具体安排如下:

一、征文范围

本专刊收录代谢工程领域所取得的最新研究成果和技术成果,包括研究论文和综述,但不限于此:

1. 基因组学和基因组尺度的代谢网络模型;
2. 代谢组学和代谢控制分析;
3. 生物转运系统工程;
4. 代谢途径工程;
5. 进化代谢工程;
6. 生理功能工程;
7. 系统生物技术和系统代谢工程;
8. 菌株改造的新技术和新方法;
9. 用于代谢工程的遗传工具;
10. 合成生物学技术

二、投稿要求

1. 投稿方式:通过《生物工程学报》投稿系统在线投稿,详见主页 (<http://journals.im.ac.cn/cjbcn/ch/index.aspx>) /投稿须知/投稿方式。

注意事项:投稿时,请在稿件标题栏注明“代谢工程专刊”字样,否则将以普通稿件进行处理。

2. 稿件格式:参照《生物工程学报》论文格式,详见主页/投稿须知/书写要求。
3. 投稿文章应未在正式出版物上发表过,也不在其他刊物或会议的审稿过程中,不存在一稿多投现象;应保证投稿文章的合法性(无抄袭、剽窃、侵权等不良行为)。

三、本专刊几个关键的时间

1. 收稿截止日期:2010 年 4 月 30 日
2. 决定是否录用日期:2010 年 6 月 20 日
3. 录用后作者修回截止日期:2010 年 7 月 10 日
4. 出版日期:2010 年 9 月 25 日

四、特别说明

1. 本专刊不是增刊,而是在 2010 年第 9 期《生物工程学报》正刊上刊出。
2. 由主编邀请的专刊投稿文章免收审理费;录用后正式刊发的文章将请作者提交版权转让协议,并按照《生物工程学报》相关规定收取版面费和支付作者稿酬,同时赠送样刊及单行本。

五、联系方式

电话:010-64807509 传真:010-64807327 E-mail: cjb@im.ac.cn

邮寄地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物研究所 B401《生物工程学报》编辑部(邮编:100101)

如果您还有什么问题,欢迎随时与我们联系,我们将在第一时间给您答复。

欢迎您的来稿!

《生物工程学报》编辑部

2009-12-30