

无血清培养昆虫细胞(BTI-Tn-5B1-4)的适应过程

戴 琥 赵 佼 谭文松* 杨曜中

(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 昆虫细胞培养, 无血清, 适应过程

中图分类号 Q343.6 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)02-0232-03

昆虫细胞培养是近年来迅速发展起来的动物细胞培养工程中的一个新领域。人们可以利用杆状病毒在昆虫细胞内的感染、复制, 来大量生产昆虫病毒作为生物杀虫剂^[1]。而昆虫细胞-杆状病毒表达载体系统的建立, 则可通过昆虫细胞的体外培养大量表达病毒携带的外源基因。实践证明, 这一系统高效、安全、容量大, 表达的产物具生物活性, 从而为生产许多具有重要生物学价值的重组蛋白提供了相当有吸引力的新途径^[2-5]。

目前一般是在含有昂贵胎牛血清的培养基中培养昆虫细胞, 成本高, 限制了大规模培养技术的发展; 而且血清的存在还会给基因工程表达产物的后处理带来困难; 此外, 血清还是支原体和其其它异源病毒污染的重要来源^[6]。因此, 70年代以来, 发展昆虫细胞无血清培养基一直是细胞培养工程领域的研究热点^[7-10]。

昆虫细胞 BTI-Tn-5B1-4 是 90 年代开发的新型宿主细胞, 初步研究表明其具有外源基因高表达的优良特性^[11-13], 因此在外源生物活性蛋白工业化生产方面有重要应用前景。本文应用本实验室自行研制开发的无血清培养基 IC SFM, 考察了该昆虫细胞系在无血清培养基中培养的适应过程, 并进一步分析了胎牛血清浓度和接种密度对该细胞生长的影响。

1 材料与方 法

1.1 细胞株

昆虫细胞 BTI-Tn-5B1-4 来自粉蚊夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 卵, 由华中师范大学洪华珠教授惠赠。

1.2 培养基

无血清培养基 IC SFM 由本实验室自行研制开发, 其中以 IPL-41 为基础培养基 (SIGMA Co. USA), 添加 2.0 g/L 水解乳蛋白 (Lactalbumin Hydrolysate, Oxoid Ltd. UK), 2.0 g/L 酵母提取物 (TC Yeastolate, DIFCO Laboratories, USA), 以及由胆固醇等组成的脂质微乳浊液。配制时加 NaHCO_3 0.35 g/L, 调 pH 至 6.2 左右, 然后用 0.2 μm 的 Millipore 过滤器过滤除菌, 放 4℃ 冰箱保存。实验时根据需要添加不同浓度的胎牛血清 (FBS, GIBCO BRL)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养: 实验中用根据需要配制的新鲜培养基将贴壁细胞吹打成单个悬浮细胞。按所需接种密度接种于 15 cm^2 方瓶中, 每瓶 5 mL 细胞悬液, 置 28℃ 静置培养, 每 24 h 取样一次。细胞计数完毕后离心去除细胞 (1500 r/min, 10 min), 取上清液冻存于低温冰箱 (-30℃), 以备进一步分析之用。

1.3.2 无血清培养的适应过程: 将在含 10% FBS 培养基中稳定生长的细胞, 传代于含 5% FBS 的培养基中, 28℃ 静置培养。每天观察细胞生长情况, 待细胞长至单层后, 将细胞吹打成悬浮液, 测定活细胞数, 再按一定的细胞密度传代于 5% FBS 的培养基中。如此重复若干代, 直至细胞在 5% FBS 的培养基中活性维持在 90% 以上, 比生长速率趋于稳定。此时, 再将细胞转入 3% FBS 的培养基中。用同样的方法使细胞在 3%、2%、1% FBS 及无血清培养基中得到适应。

2 结果与讨论

2.1 细胞在低血清和无血清培养基中的适应过程

图 1 和图 2 显示了昆虫细胞 BTI-Tn-5B1-4 从含 10% FBS 的培养基经含 5%、3%、2%、1% FBS 的培养基, 最后至无血清培养基中稳定生长这一适应过程中的生长情况。由图可见, 细胞由 10% 转入 5% FBS 的培养基后, 生长情况没有较大改变; 当细胞转入 3% FBS 的培养基后, 在培养的第一代, 细胞生长缓慢, 但此后细胞很快恢复, 生长加快, 3 代后已可适应在 3% FBS 浓度下生长; 细胞在由 3% FBS → 2% FBS 和 2% FBS → 1% FBS 的时候, 则都有一个活性、比生长速率 (μ) 明显下降的过程, 此时细胞形态也变得粗壮、模糊, 细胞的适应过程需较长的时间 (5 代以后)。但细胞一旦在 1% FBS 中适应后, 则生长速度加快, μ 可达到 5% FBS 时的水平。此时再将细胞转入无血清培养基中, μ 只是在第一、第二代时有所降低, 随后能很快恢复到原先的水平, 并且细胞活性一直维持在 90% 以上。

出现这种现象可能是因为: 低于 3% 浓度的 FBS 即已成为细胞生长的限制性因素, 细胞需要在营养物质利用和代谢途

收稿日期: 1999-03-15, 修回日期: 1999-11-10。

* 通讯联系人。

径的选择上作出较大的改变,因此适应时间较长。当细胞在 1% FBS 中适应后,已基本可以利用基础无血清培养基中的营养物质,代谢途径也类似于无血清时的,因此转入无血清后的适应时间较短。1% FBS 可能是某些代谢途径选择的临界浓度。

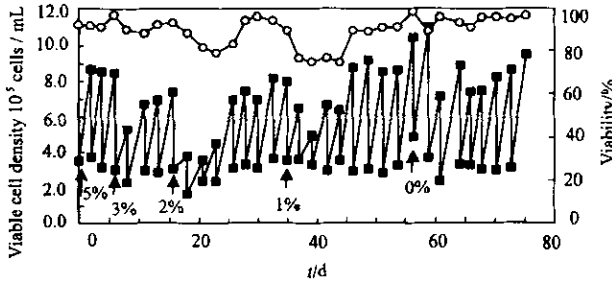


图 1 无血清适应过程中细胞密度和活性的变化
■活细胞; ○活性

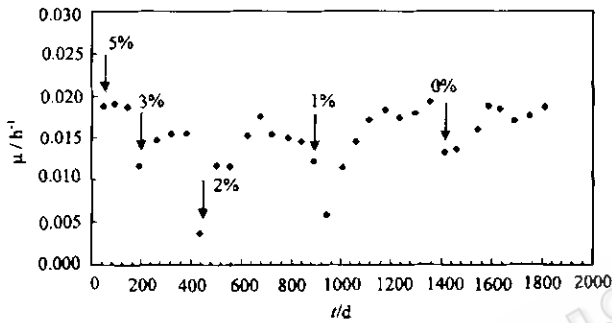


图 2 无血清适应过程中比生长速率的变化

2.2 血清浓度对细胞生长的影响

胎牛血清(FBS)在昆虫细胞贴壁培养中有相当大的作用,它不仅促进细胞的生长增殖,还在细胞的贴壁、保护、受损细胞的修复中有明显作用。在无血清的适应过程中细胞的生长情况已充分说明了这点。图 3 进一步显示了已在不同浓度 FBS 的培养基中适应的细胞的生长情况。实验表明,细胞在 3 种含 FBS 的培养基中,无明显延迟期,且最大活细胞密度无显著差异;而在无血清培养基中,该接种密度下的细胞有明显的延迟期,最大活细胞密度也略低于含 FBS 的培养基中的值。这一结果说明,细胞能否迅速进入对数生长期,取决于某种能够刺激细胞分裂的活性物质在培养基中是否达到一定的临界浓度。当在 2.0×10^5 cells/mL 这一较低的接种密度下,靠细胞自身分泌的此种物质不足以使细胞直接进入对数生长期,因此无血清培养中存在 12h 的延迟期。而 FBS 中则含有促进细胞增殖的物质,相同的接种密度下,细胞立即进入对数生长期。无血清培养的最大活细胞密度略低,说明本实验中所用的血清替代物还不能完全取代 FBS 的作用, FBS 中仍含有某些未知的促进细胞生长的因子,无血清培养基还需进一步优化。

2.3 接种密度对细胞在无血清培养基中生长的影响

细胞接种密度在一定程度上影响细胞的生长是一种普遍现象。这可能是由于细胞生长、代谢所需的某些刺激因子

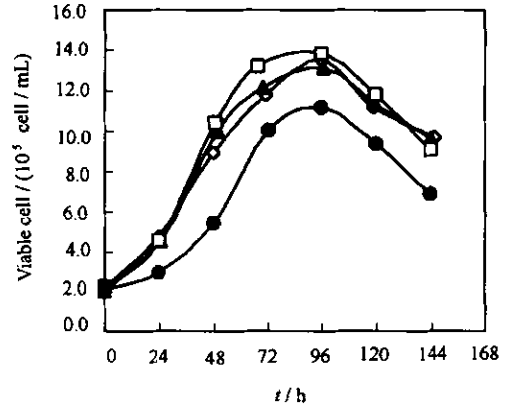


图 3 血清对 BTI-Tn-5B1-4 细胞生长的影响
◇ 2% FBS; ▲ 5% FBS; □ 10% FBS; ● 0% FBS

要靠细胞本身分泌获得所致。细胞接种密度较低时,细胞周围环境难以较快改善,使细胞增殖较慢,到培养后期,难以铺满介质表面,影响细胞产量。接种密度高时,细胞增殖快,产量高。但接种量过高时,会在培养初期大量消耗营养并生成大量有可能对细胞进一步生长产生抑制的代谢副产物。而且在大规模生产中,以高接种量换取高产量也是不经济的,因此有必要通过实验确定最佳的接种密度。不同接种密度的对比实验表明(图 4),当接种密度低至 1×10^5 cells/mL 时,

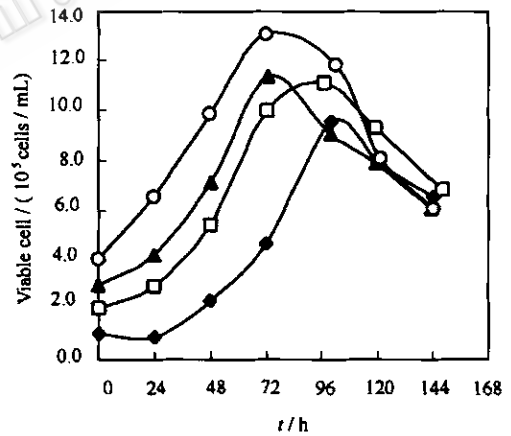


图 4 接种密度对 BTI-Tn-5B1-4 的影响
◆: 1×10^5 cells/mL; □: 2×10^5 cells/mL;
▲: 3×10^5 cells/mL; ○: 4×10^5 cells/mL

细胞不仅有 24 h 的延迟期,而且最大活细胞密度也较低。在 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ cells/mL 范围内,接种密度对最大活细胞密度无显著影响,区别仅在于 2×10^5 cells/mL 时达到最大密度较晚(96 h)。当接种密度达 4×10^5 cells/mL 时,细胞迅速进入对数生长期,且最大活细胞密度可达 1.307×10^6 cells/mL,与在含 FBS 培养基中的水平近似。但此后细胞很快衰亡,这可能是高接种密度使营养物质在生长期时被过早地消耗,同时积累大量的代谢副产物的缘故。因此综合各项因素,BTI-Tn-5B1-4 在无血清培养基中静态培养的接种密度以 2×10^5 cells/mL $\sim 3 \times 10^5$ cells/mL 为佳。

参 考 文 献

- [1] Murhammer D W. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **59**:199~220
- [2] Caron A W, Archambault J, Massie B. *Biotechnol Bioeng*, 1990, **36**:1133~1140
- [3] Goosen M F A. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 1991, **69**:450~456
- [4] Maiorella B, Inlow D, Shauger A *et al.* *Bio/Technology*, 1988, **6**:1406~1410
- [5] 邓继先. *生物工程进展*, 1993, **13**(1):53~56
- [6] Ernst-Jürgen Schlaeger. *Cytotechnology*, 1996, **20**:57~70
- [7] Goodwin R H. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1991, **27a**:470~478
- [8] Hink W F. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1991, **27a**:397~401
- [9] Vaughn L, Fan F. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1989, **25**:143~145
- [10] 余泽华, 刘冬连, 陈曲候. *生物工程进展*, 1996, **16**(1):45~47
- [11] Hink W F, Thomsen D R, Davidson D J *et al.* *Biotechnol Prog*, 1991, **7**:9~14
- [12] Rhiel M, Mitchell-Logenan C M, Murhammer D W. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **55**:909~920
- [13] Sugiura T, Amann E. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **51**:494~499

Adaptation of Insect Cells(BTI-Tn-5B1-4) to Serum-free Culture

DAI Hu ZHAO Jiao TAN Wen-Song YANG Yao-Zhong

(The State Key Lab of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237)

Abstract The insect cells(BTI-Tn-5B1-4) were adapted, from the medium supplemented with 5% FBS, via 3%, 2%, 1% FBS, to grow in serum-free medium by sequential adaptation for about three months. After adaptation, the cells could successfully grow in the specifically designed serum-free medium with the viability above 90%. In addition, the effect of FBS concentrations and inoculum sizes on the insect cell growth was also investigated.

Key words Insect cell culture, serum-free, adaptation