

# 应用动力学方法在线检测 Vero 细胞培养过程中的摄氧率

周亚竞 谭文松\* 赵 佼 华 平 孙祥明 俞俊棠

(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 Vero 细胞, 在线检测, 摄氧率

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0525-03

流加和灌注培养已被广泛应用于动物细胞培养,以获得高活性、高密度的细胞和高的产物得率。在这些培养过程中,一般通过离线检测关键参数(如细胞密度、营养和代谢产物的浓度)来人为调整灌注速率和补料策略,但是当细胞密度较高时,由于细胞代谢旺盛使得培养的微环境变化很快,这就需要更加频繁快速地调整操作条件,从而导致因频繁取样和离线分析所带来的污染危险及大量人力、物力的浪费。这在大规模细胞培养过程中是不可取的。因此,要建立大规模、高效动物细胞培养过程,有必要研究和探索在线检测技术,以实时掌握细胞培养过程所处的状态。

在微生物发酵过程中,摄氧率(OUR)一般采用分析进出口气体成分的方法来测定,而在一般动物细胞培养过程中,由于动物细胞 OUR 很小(和微生物相比),使得分析装置复杂,误差大。Frame 和 Huf<sup>[1]</sup>提出,通过测定取出的培养悬浮液中溶氧(DO)变化来测定 OUR,但这种方法操作繁琐,不能做到在线检测。

本文在相关研究<sup>[2]</sup>的基础上,提出一种在 1.5 L Celli-Gen 反应器中简单、经济、可靠的 Vero 细胞 OUR 的测定方法,通过测定 OUR 来快速、准确地了解细胞的生理状态,为在流加和灌注培养中及时调整灌注时间和速率、决定补料时间和补料策略提供了可靠的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 原理

在应用动力学方法测定 Vero 细胞 OUR 过程中,反应器内培养液的氧平衡可由下式表示:

$$\frac{dc}{dt} = K_L a (c_m^* - c) - OUR \quad (1)$$

式中:  $c_m^*$ : 与气相氧分压平衡的液相氧浓度, mmol/L;  $c$ : 培养基中实际溶氧浓度, mmol/L; OUR: 细胞摄氧率, mmol/L/h;  $K_L a$ : 体积氧传递系数, 1/h。

在细胞培养过程中在线检测 OUR 时,为消除表面通气的影响,需要在培养液上方通以氮气,此时气相中氧分压为

0。根据亨利定律,  $c_m^*$  为 0, 积分式(1)得:

$$OUR = \frac{c_o - c_f}{t_f - t_o} + \frac{\int_{t_o}^{t_f} K_L a (0 - c) dt}{t_f - t_o} \quad (2)$$

式中:  $c_o$ : 开始测定时初始溶氧浓度, mmol/L;  $c_f$ : 测定结束时溶氧浓度, mmol/L;  $t_o$ : 开始测定之时间/h;  $t_f$ : 测定结束之时间/h。

体积氧传递系数  $K_L a$  的测定可在无活性细胞的培养液中进行,由于此时  $OUR = 0$ , 在培养液上方通氮气的状态下:

$$\frac{dc}{dt} = K_L a (0 - c) \quad (3)$$

积分得:  $Ln(c_o/c_f) = K_L a t$  (4)

以  $Ln(c_o/c_f)$  对  $t$  作图,得一直线,其斜率即为  $K_L a$ 。

### 1.2 材料

1.2.1 Vero(非洲绿猴肾)细胞由中国药物生物制品检定所惠赠,代次为 129~131。

1.2.2 DMEM(GIBCO, 美国), 使用前添加 10% 新生小牛血清(华东理工大学动物细胞与组织工程研究室)。

1.2.3 用于 Vero 细胞培养的贴壁介质为 Cytodex 3(Pharmacia Biotech, Sweden)微载体,先用 PBS 浸泡 24 h,灭菌后再用 PBS 洗 1 次,并用培养基浸泡置于培养箱过夜,使用前倾去培养基后再接入细胞。

### 1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养: 种子细胞由置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱的扁瓶提供。当处于对数生长期的细胞达到所需密度时用 0.25% 的胰酶进行消化,并以  $3 \times 10^5$  cells/mL 的活细胞密度接入 1.5 L CelliGen 生物反应器系统(New Brunswick Scientific, USA), 反应器工作体积为 1.2 L, 微载体浓度 5 g/L。用空气、氧气、氮气和二氧化碳气体体积分调节控制 pH=7.2、溶氧(DO)50% 空气饱和度,控制转速 30~45 r/min, 温度 36.8℃。

1.3.2 细胞计数: 每天取样 1 次,其中取 1 mL 样品加入 0.1% 结晶紫和 0.1 mol/L 柠檬酸溶液,混合均匀后置于

收稿日期: 1999-05-31, 修回日期: 2000-03-15。

基金项目: 部分得到上海市启明星计划的资助。

\* 联系人。

37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中,大约 40 min 后细胞脱离微载体且细胞核被结晶紫染色,此时即可用血球计数板计数。其余样品经离心后取上清,冷冻保存于 -30℃ 冰箱,待作其它分析用。

**1.3.3 葡萄糖和乳酸浓度测定:** 培养基中葡萄糖和乳酸的浓度采用 YSI 2700 生化分析仪 (Yellow Springs Instruments, USA) 检测。

**1.3.4 饱和溶氧浓度  $C_m^*$  的测定:** 在反应器中,首先以水为介质,控制温度 36.8℃,先后通入氮气和空气校正溶氧 (DO) 电极,然后控制搅拌速率 45 r/min,以 1.2 L/min 的速度向水中通入氮气,使 DO 降至 55% 以下,再用 1.5 L/min 的速率向水中通入饱和空气直到 DO 为恒定,设定此值为饱和溶氧浓度 ( $c_w^* = 100\%$ )。最后将水换成培养基 (未接入细胞),重复上述操作,记录恒定时的饱和溶氧浓度 ( $c_m^*$ )。

**1.3.5  $K_La$  的测定:** 在细胞培养开始前实验测定  $K_La$ ,反应器的搅拌速率、温度、通气流量均与培养过程中测定  $OUR$  时一致。采用表面通气方式以 1.5 L/min 的氮气赶走培养液上层的空气,记录溶氧随时间的变化,由式 (4) 以  $\ln(c_0/c_t)$  对时间  $t$  作图,斜率即为  $K_La$ 。

**1.3.6 细胞摄氧率  $OUR$  在线检测:** 细胞培养过程中在线检测  $OUR$  时,首先使溶氧上升到 65% 以上,切断空气、氧气和二氧化碳气体,然后用 1.5 L/min 的氮气通入培养液上方以吹去空气,记录溶氧 (60% ~ 30%) 随时间的变化。由式 (2) 计算  $OUR$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $c_m^*$ 的实验测定

空气中氧在水和培养基中的饱和浓度测定结果如图 1 所示。由图中曲线可见,氧在培养基中的饱和浓度  $c_m^*$  仅为水中饱和浓度  $c_w^*$  的 88%。在常压 ( $1.01 \times 10^5 Pa$ ) 和 36.8℃ 时,纯氧在水中溶解度为 1.0684 mmol/L,则水中溶氧与空气平衡时的饱和浓度  $c_w^*$  为 0.224 mmol/L,因此  $c_m^* = 0.197 mmol/L$ 。 $c_m^*$  与  $c_w^*$  之间的差别主要是由于培养基中含有大量无机离子、蛋白质、氨基酸等物质,使得氧的溶解度降低,其传统的校正法是用 Sechenov<sup>[3]</sup> 公式计算,由于培养基成分复杂,Sechenov 常数不全,故计算困难,本文通过实验方法校正  $c_m^*$ ,所得结果与文献值基本一致<sup>[4]</sup>。

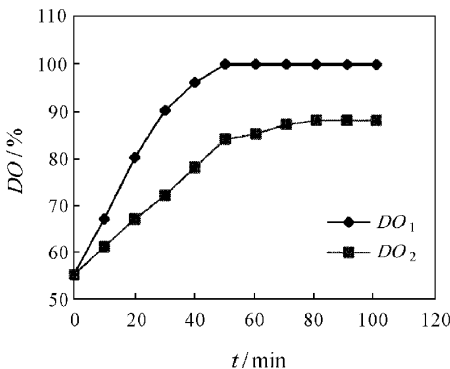


图1 空气中氧在水 ( $DO_1$ ) 和培养基 ( $DO_2$ ) 中的饱和浓度测定结果

### 2.2 $K_La$ 的实验测定

在细胞培养前实验测定  $K_La$  时,反应器的搅拌速率、温度、通气流量均与培养过程中测定  $OUR$  时一致。溶氧变化与测定时间的关系如图 2 所示。由图可见,  $\ln(c_0/c_t)$  与  $t$  成良好的线性关系,其斜率  $K_La$  为  $0.948 h^{-1}$ 。通过在培养前、后分别对  $K_La$  进行测定,结果证明在细胞培养过程中可作为常数。

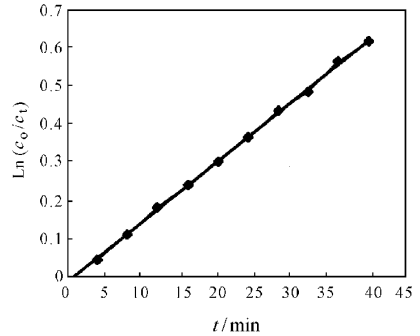


图2  $\ln(c_0/c_t)$  随时间的变化

### 2.3 $OUR$ 与细胞密度、葡萄糖消耗和乳酸生成之间的关系

Vero 细胞以  $3 \times 10^5 cell/mL$  的密度接种到 1.5L Celli-Gen 反应器中进行批培养,定时取样测定细胞密度、葡萄糖和乳酸浓度,同时在线检测  $OUR$ 。其细胞密度和  $OUR$  随时间的变化如图 3 所示。以  $OUR$  对细胞密度作图得图 4,

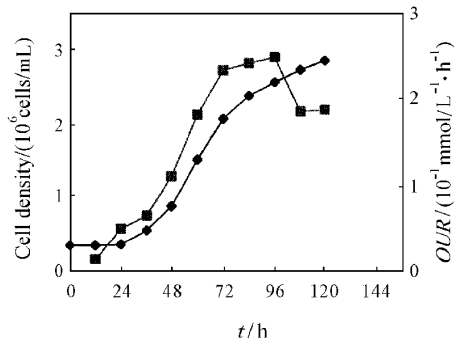


图3 细胞密度和  $OUR$  随时间的变化

◆ - 细胞密度 ■ -  $OUR$

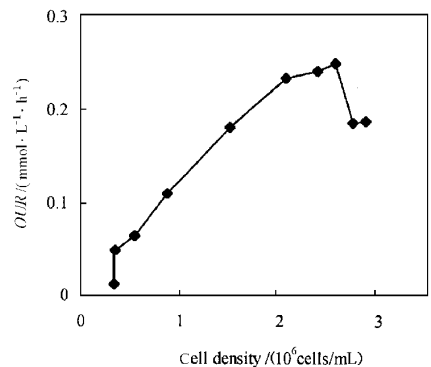


图4  $OUR$  与细胞密度的关系

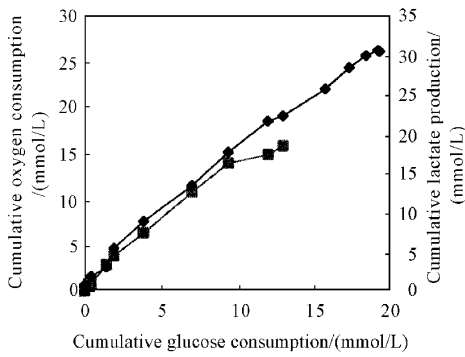


图5 累积葡萄糖消耗、氧消耗、乳酸生成之关系

■ - 累积氧消耗 ◆ - 累积乳酸生成

在对数生长期  $OUR$  与细胞密度成正比。计算积分  $\int ORU dt$  得出累积氧消耗,以累积氧消耗和累积乳酸生成对累积葡萄糖消耗作图得图 5。由图 5 可知,氧消耗及乳酸生成与葡萄糖消耗具有良好的线性关系,从直线斜率得到:每消耗 1 mmol 葡萄糖要消耗 1.34 mmol 氧及生成 1.66 mmol 乳酸。其他实验也得到类似的结果<sup>[5]</sup>。

在 Vero 细胞培养过程中,利用图 4 中  $OUR$  与细胞密度在对数生长期呈线性关系这一特性,可方便地通过在线检测  $OUR$  来及时了解细胞数,从而避免了因频繁取样而导致污染的危险。利用图 5 中葡萄糖消耗—氧消耗—乳酸生成之间的关系,可以通过在线检测  $OUR$  估计出葡萄糖的消耗和乳酸生成,结合这些参数可确定细胞的生理状态,并通过计算机专家系统设计最佳的加料或灌注策略,从而更加有效地调控细胞生理状态。

## 参 考 文 献

- [1] Frame K K and Hu W S. *Biotechnology Letters*, 1985, 7: 147~152
- [2] 赵 佼,谭文松,周亚竞等. 华东理工大学学报, 1997, 23(5): 540~544
- [3] 俞俊棠,唐孝宣. 生物工艺学,上海:华东化工学院出版社, 1994, 43~46
- [4] Singh V. *Biotech and Bioeng*, 1996, 52: 443~448
- [5] Kyung Y S, Peshwa M V, Gryte D M et al. *Cytotechnology*, 1994, 14: 183~190

## On-line Measurement of Oxygen Uptake Rate in the Cultivation of Vero Cells Using the Dynamic Method

ZHOU Ya-Jin TAN Wen-Song ZHAO Jiao HUA Ping SUN Xiang-Ming YU Jun-Tang

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

**Abstract** The oxygen uptake rate ( $OUR$ ) during the cultivation of Vero cells in 1.5L CelliGen bioreactor was on-line determined using the dynamic method. The results showed that the cell growth and metabolic state during the exponential growth phase was lineally related to the  $OUR$ . This implies that the on-line measurement of  $OUR$  can be used to promptly monitor the physiological state of cultured cells and to efficiently avoid contamination because of frequent sampling in the large-scale cultivation of mammalian cells.

**Key words** Vero cell, on-line measurement,  $OUR$

## 2.4 氧解析对 $OUR$ 测定的影响

细胞培养过程中  $DO$  的变化是细胞耗氧和氧解析两个过程共同作用。在微生物发酵过程中,往往忽略氧解析而不至于影响  $OUR$  的准确性。但在动物细胞培养过程中,由于细胞的  $OUR$  很小,故氧解析对  $OUR$  的影响很大。

表 1 氧解析对  $OUR$  测定的影响

$t/h$	Cell density ( $10^6$ cells/mL)	$OUR_s /$ ( $mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$OUR_k /$ ( $mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$\frac{OUR_k - OUR_s}{OUR_k}$
12	0.334	0.0120	0.1103	0.8910
24	0.341	0.0480	0.1450	0.6690
36	0.539	0.0635	0.1570	0.5960
48	0.872	0.1090	0.1900	0.4263
60	1.500	0.1810	0.2760	0.3442
72	2.060	0.2330	0.3251	0.2833
84	2.380	0.2410	0.3350	0.2810
96	2.560	0.2490	0.3415	0.2709
108	2.730	0.1850	0.2760	0.3297
120	2.860	0.1870	0.2890	0.3530

$OUR_s$ : 本实验所得的摄氧率;  $OUR_k$ : 忽略溶氧解析所得的摄氧率

由表中可看出,在细胞生长初期,细胞摄氧率较小,氧解析对  $OUR$  影响很大,随着细胞密度的增加,摄氧率增大,氧解析对  $OUR$  的影响逐步减小,但仍占有一定比例,所以在  $OUR$  测定时,必需考虑氧解析的影响。

综上所述,本文在 1.5 L CelliGen 反应器中应用动力学方法在线检测 Vero 细胞的  $OUR$ ,不但简单可靠,而且能准确地反映细胞  $OUR$  的变化情况、迅速判断细胞所处的生理状态。