

适合棉铃虫细胞 HzAm1 生长的培养基筛选及低血清驯化 Screen of Media for Insect Cells(HzAm1) Growth and Its Adaptation to Low Serum Culture

张佑红^{1*}, 王华林², 朱雄伟¹, 秦 琴¹, 陈 燕¹, 吕 中¹, 马 洁¹, 张 菁¹
ZHANG You-Hong^{1*}, WANG Hua-Lin², ZHU Xiong-Wei¹, QIN Qin¹, CHEN Yan¹, LÜ Zhong¹,
MA Jie³ and ZHANG Jing³

1 武汉工程大学省新型反应器与绿色化学工艺重点实验室, 武汉 430073

2 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071

1 Hubei Key Laboratory of Novel Chemical Reactor & Green Chemical Technology, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430073, China

2 Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

摘 要 昆虫细胞-杆状病毒系统是昆虫杀虫剂生产和医用外源基因表达的有效工具。昆虫细胞的无血清或低血清培养是十分必要的。从三种商业化的培养基 TC-100、GRACE 和 IPL-41 中筛选出了最适合棉铃虫细胞 HzAm1 生长的基础培养基 TC-100。以该培养基为基础, 将血清用量从常用的 10% 降至 1%, 同时补加一定量的水解乳蛋白以及酵母提取物等, 对棉铃虫细胞 HzAm1 进行驯化培养, 效果良好。

关键词 棉铃虫细胞, 无血清培养, 细胞浓度, 比生长速率

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0686-03

Abstract Insect cell-baculovirus system is a useful tool for both insecticidal virus production and the expression of medically useful foreign genes. Serum-free culture or low serum culture for insect cells is essential and significant. Media for the growth of insect cells HzAm1 from three kinds of commercial media TC-100, GRACE and IPL-41 with 10% serum were investigated and screened. The result shows that medium TC-100 is the most suitable medium for the growth of cells HzAm1. Adaptation of insect cells HzAm1 to cultures in medium TC-100 with serum reduction from 10% to 1% was carried out as cultures were supplemented with lactalbumin hydrolysate and yeastolate etc. Growth of insect cells HzAm1 in medium TC-100 with serum 1%, lactalbumin hydrolysate and yeastolate was well.

Key words *Helicoverpa armigera* cells, HzAm1, serum-free culture cell concentration, specific growth rate

昆虫细胞-杆状病毒表达体系给真核生物重组
医用蛋白和生物杀虫剂的工业化生产带来了希望^[1-4], 为了提高杆状病毒在昆虫细胞中的复制量

或异源蛋白在昆虫细胞中的表达量, 传统的方法是在昆虫细胞培养基中添加 10% 左右的胎牛血清。由于血清成本高、来源少, 而且血清成份复杂, 还是

Received: December 12, 2005; Accepted: March 3, 2006.

This work was supported by the grants from Wuhan Municipal Science and Technology Bureau (No. 20052002044) and Fund of Hubei Key Lab(No. RCT2004004).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87195727; E-mail: youhong64@yahoo.com.cn

武汉市科技攻关项目(No. 20052002044)和省重点实验室开放基金(No. RCT2004004)资助。

支原体和其它异源病毒污染的重要来源,给基因工程表达的重组蛋白的下游分离处理发展带来了困难,因此,至今还没有用这一体系进行大规模的商业化生产^[5,6]。

棉铃虫是一种世界性的杂食害虫,我国涉及棉花及蔬菜的受灾面积近 1 亿亩。当前棉铃虫对各种化学农药均产生了很高的抗性,而且超量使用化学农药造成,如人、畜中毒、水土污染、破坏生态等严重问题。杆状病毒生物杀虫剂正日益成为替代化学农药的最佳选择。中国科学院武汉病毒所对野生型棉铃虫杆状病毒及基因工程重组杆状病毒作为生物杀虫剂进行了系统的研究^[2,7],本工作为进行杆状病毒离体培养的大规模化生产,研究开发棉铃虫细胞 HzAm1 无(或低)血清培养基。

1 材料与方法

1.1 细胞株和培养基

棉铃虫细胞 HzAm1 由中国科学院武汉病毒所友好提供。

实验所用的基础培养基为 TC-100、Grace、IPL-41 (GIBCO) 酵母提取物、脂类复合物及水解乳蛋白 (GIBCO),L-谷氨酰胺(上海伯奥生物科技有限公司)胎牛血清(FBS,GIBCO)。

1.2 实验和分析方法

1.2.1 细胞传代培养:TC-100,Grace 昆虫细胞培养基配制溶液时加入 NaOH(1mol/L)调 pH 至 6.2 然后用 0.22 μ m 的过滤器过滤除菌,并放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。将棉铃虫细胞 HzAm1 在含 10% 胎牛血清的 TC-100、Grace 和 IPL-41 三种培养基的 25mL T-Flask 培养瓶中于 27 $^{\circ}$ C 下静置恒温培养,每 5 天传代 1 次。

1.2.2 细胞悬浮培养:将 50mL 含 10% 胎牛血清的 TC-100,GRACE,IPL-41 三种培养基分别加入到 100mL 摇瓶中,并加入 0.1% 细胞保护剂(Pluronic F-68,GIBCO),然后将传代保种的细胞接种至摇瓶,调节其细胞初始密度为 1×10^5 cell/mL 左右,将在 90r/min 的转速下进行温度为 27 $^{\circ}$ C 振荡培养。细胞计数用血球计数板(hemocytometer),在光学显微镜下进行计数。活细胞由 0.4% 台盼蓝染色排除法确定,每隔 24h 从悬浮培养瓶中采样进行细胞计数。

1.2.3 低血清培养基中细胞的驯化:将在含 10% FBS 培养基中稳定生长的细胞,传代于 4mL 含 8% FBS 的培养基中,在 27 $^{\circ}$ C 下静置培养。每天观察细胞生长情况,每 3 天或 4 天待细胞长满底层后测其成活率,直到成活率达到 90% 以上后,再将其传代

于 5% FBS 的培养基中,然后再以同样的方法使细胞在含 3%、1% FBS 及无血清的培养基中适应。在血清(FBS)含量为 5% 和更低的情况下,在 1L 培养基中,加入 1.2g 水解乳蛋白(粉末状固体)、1.4g 谷氨酰胺(粉末状固体)、1.5g 酵母提取物(已灭菌液体)、4.0 μ g 脂类复合物(已灭菌液体)。

2 结果与讨论

2.1 不同培养基对细胞生长的影响

棉铃虫细胞 HzAm1 接种到含 10% FBS 的 TC-100、Grace 和 IPL-41 三种培养基中,细胞初始浓度在 1.0×10^5 cell/mL 左右,相同培养条件的情况下,实验结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,TC-100 培养基中的细胞 HzAm1 生长情况较 Grace 和 IPL-41 培养基好。细胞在 TC-100 培养基中的对数生长期比在 Grace 和 IPL-41 中要长 24h。细胞在 TC-100、IPL-41 和 Grace 培养基中培养的最大细胞浓度分别为: $3.73E+05$ 、 $2.08E+05$ 和 $1.40E+05$,所有细胞浓度不高,可能由于棉铃虫细胞 HzAm1 在摇瓶中的生长受到限制,将细胞 HzAm1 在气升式反应器中培养可能解决这一问题,我们下一步将做这一工作。但是,可以看出最大细胞浓度与 TC-100 相对应。一般认为相对低细胞初始浓度会导致较长的适应期(滞后期),这可能是由于细胞自身的合成生长因子及其分泌能够刺激细胞的增殖,于是较高初始细胞浓度的适应期较短^[8]。根据细胞浓度与时间的变化以及比生长速率定义,获得细胞 HzAm1 在培养基 TC-100、IPL-41 和 Grace 中的比生长速率分别为 $0.016h^{-1}$ 、 $0.010h^{-1}$ 和 $0.008h^{-1}$,如图 2 所示,细胞 HzAm1 在培养基 TC-100 中的比斜率 μ ($0.016 h^{-1}$) 较大,说明细胞 HzAm1 在 TC-100 培养基中生长的最好,因此,在我们的实验中,TC-100 培养基最适合细胞 HzAm1 的生长。

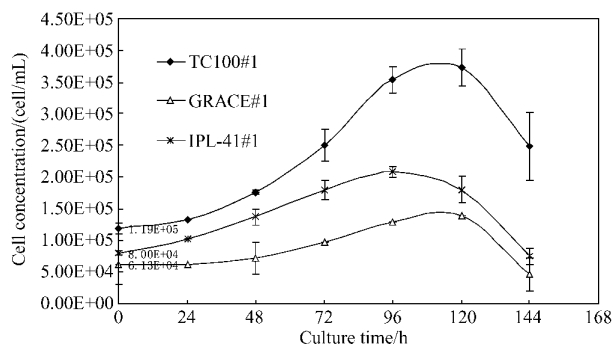
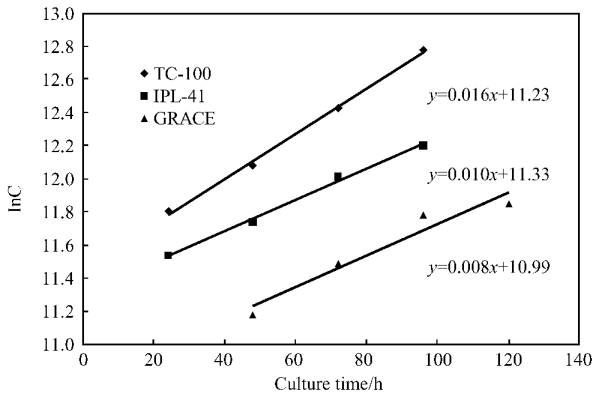


图 1 培养基对细胞 HzAm1 生长的影响

图2 比生长速率 (h^{-1})Fig.2 Specific rate (h^{-1})

2.2 细胞 HzAm1 在血清含量递减的 TC-100 培养基中的驯化

由实验观察及数据(图3)可知,细胞由含10% FBS转到8% FBS的TC-100培养基中培养3d后,生长情况没有较大改变;当细胞由含8%刚刚转传到含5% FBS的培养基后,细胞形态变得粗壮、模糊,生长缓慢,且死亡率变高,即使培养几代后,仍不能改观。这说明FBS低于一定的浓度,其对细胞膜的保护作用减弱,传代过程中的吹打更易对细胞膜造成损害。其次,血清含量减少,也就是由血清所提供的一些细胞生长所必需的生长因子、激素、脂质、蛋白和多种微量元素等的含量都有所降低,从而导致细胞生长不好。鉴于此,我们加入了一些补充因子作为所减少血清的替代物,同时,由于不同种类的昆虫细胞对氨基酸有不同的要求,有14种必需的氨基酸,细胞本身不能合成,必须由培养基提供。细胞需要谷氨酰胺合成核酸和蛋白质,几乎所有的昆虫细胞对谷氨酰胺都有较高的要求,在缺少谷氨酰胺时,细胞生长不良而最后死亡,所以基础培养基中补给了较多的谷氨酰胺。水解乳蛋白和酵母提取物是昆虫细胞培养基中最常用的添加物,酵母提取物是维生素和嘌呤的主要来源,而水解乳蛋白是不定成分氨基酸的主要来源,所以考虑在含5%血清的培养基中开始加入一定量的水解乳蛋白、谷氨酰胺、酵母提取物及脂类复合物等,此时,再继续观察实验,细胞的生长速度明显加快,经过3次传代后,细胞成活率可达到97%以上,于是,再将5%转到3% FBS中,在第一、二代时,细胞成活率不是很高,但是到第四代时,成活率仍可达到97%左右。然后,将3%转到

1% FBS中培养几代后,成活率也可达到92%左右。

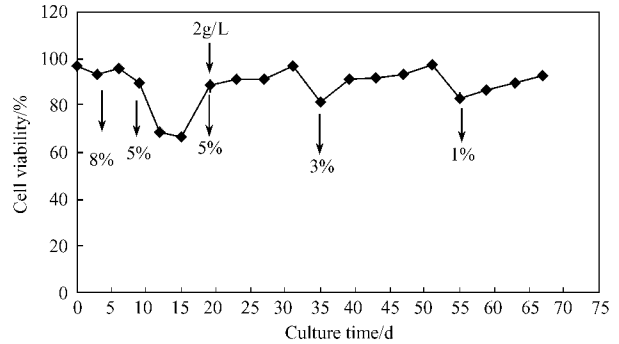


图3 低血清适应过程中细胞成活率的变化

Fig.3 The viability of cell in low serum medium culture

同样从实验也得出,对细胞 HzAm1 确实可以用一些特定的补充因子来取代血清而不影响其生长速度和成活率。这提示在以后的实验中,尽可能找一些其它的替代因子,使其在低血清或无血清的情况下能够更好生长。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Luckow VA. Baculovirus systems for the expression of human gene products. *Current Opinion Biotechnology*, 1993 **4**: 564 - 572
- [2] Chen X, Sun X, Hu Z *et al*. Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus as an improved pesticide. *J Invertebrate Pathology*, 2000 **76**: 140 - 146
- [3] Zhang YH, Enden G, Merchuk JC. Insect cells-Baculovirus system: factors affecting growth and low MOI infection. *Biochemical Engineering Journal* 2005 **27**: 8 - 16
- [4] Zhang YH, Merchuk JC. A Mathematical model of baculovirus infection on insect cells at low multiplicity of infection. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004 **36**(11): 729 - 740
- [5] Wang X(王新建), Yu ZH(余泽华), Yao HC(姚汉超) *et al*. Study on serum-free medium for 5B1 cell growth. *Journal of Central China Normal University (华中师范大学学报)*, 2001, **35**: 208 - 208
- [6] Gu HY(顾涵英), Feng YM(冯佑民). Serum-free medium and main supplementation. *The Evolution of Biochemistry and Biophysics (生物化学与生物物理进展)*, 1990, **17**(4): 255 - 259
- [7] Sun XL, Wang HL, Chen XW *et al*. Biological activity and field efficacy of a genetically modified *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus expressing an insect-selective toxin from a chimeric promoter. *Biological Control*, 2004, **29**: 124 - 137
- [8] Kioukia N, Nienow AW, Emery AN *et al*. Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus. *Journal of Biotechnology*, 1995 **38**: 243 - 251