

流行性出血热病毒杂交瘤细胞的悬浮培养

张茂金 苑锡同* 吴晶珉

刘洪喜 王琳 贾茜 朱关福*

(华北制药厂研究所 石家庄)

动物细胞悬浮培养是大量生产细胞, 制备有关产品的一种重要的方法。在 BHK₂₁C₁₃ 细胞^[1]及 C_{6/36} 细胞^[2] 悬浮培养的基础上, 开展了流行性出血热病毒(EHFV)杂交瘤(IAP)细胞的悬浮培养研究。现报道如下。

材料和方法

(一) 细胞

流行性出血热病毒杂交瘤(IAP)细胞。用含 10%小牛血清代用品(S)^[3]的 Eagle's MEM 培养基培养。

(二) 悬浮培养

将静置培养长成基本单层, 形态良好的细胞, 用生长培养基吹下, 以 $1.0-1.5 \times 10^5$ 细胞/ml 接种发酵罐。按培养量 400—600 ml, pH7.0—7.2, 搅拌速度 80rpm, 温度 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 进行培养。每天取样, 以 1:500 台酚蓝液染色, 血球计数板计数测定细胞生长。留下样品作单克隆抗体(McAb)测定。

(三) McAb 测定

按间接免疫酶标法^[4]进行。染色液为 0.5% 苏木素。

(四) 培养装备

Biostat M型发酵罐, 实验用 2L 罐。

结果

(一) IAP 细胞的悬浮培养生长

IAP细胞在所试验的悬浮培养条件下, 能连续悬浮培养生长(图1)。图1表明, 此细胞培养每 48h 取出部分细胞悬液, 加回相应量新鲜培养基, 保持细胞数在 $1.0-2.0 \times 10^5/\text{ml}$ 连续培养时, 细胞生长量为 2—3 倍。在第二个生长峰后, 由于突然停电达 5h, 细胞无明显生长, 但

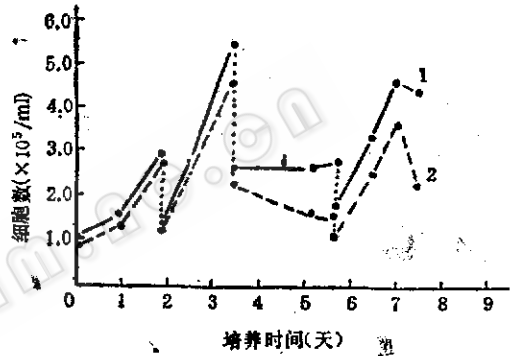


图 1 IAP 细胞连续悬浮培养生长曲线
图中箭头所示为停电 5h
1. 总细胞数 2. 活细胞数

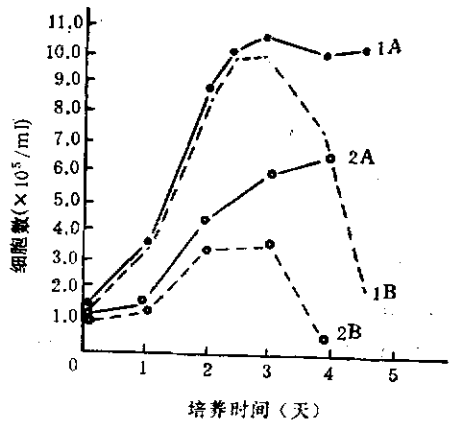


图 2 IAP 细胞的生长曲线
1. 悬浮培养 2. 静置培养
A 总细胞数 B 活细胞数

本文于 1989 年 4 月 17 日收到。

* 军事医学科学院五所。

经一段时间一旦恢复后, 细胞又生长。

悬浮培养细胞的生长曲线(图 2)表明, 细胞生长高峰在培养的 48h。与静置培养相比, 细胞生长量比较高。

(二) 悬浮培养 IAP 细胞的 McAb

表 1 IAP 细胞悬浮培养和静置培养 McAb 滴度比较

培养时间(天)		0	1	2	3	4	5
McAb 滴度	悬浮培养	1 1:1	1:4	1:16	1:64	1:128	1:128
		2 1:1	1:8	1:32	1:128	1:256	1:256
	静置培养	1 1:1	1:1	1:4	1:32	1:64	3 天后
		2 1:1	1:8	1:32	1:32	1:64	细胞死亡

讨 论

细胞悬浮培养是获取大量细胞及其有关产品的一种重要方式。自从生产 McAb 技术问世以来, 为获取大量有关 McAb, 开展了杂交瘤细胞的悬浮培养。目前最大培养量已达 40L^[5]。我们利用流行性出血热病毒杂交瘤(IAP)细胞, 对杂交瘤细胞的连续悬浮培养生长, 悬浮细胞的生长周期及悬浮细胞分泌 McAb 进行了研究。细胞可在不含小牛血清的培养基中良好地生长, 生长

IAP 细胞悬浮培养时, McAb 分泌量随培养时间而增加。到细胞全部死亡时达到最大值。表 1 表明, 培养 3 天后, McAb 滴度几乎达到最大值。最高滴度为 1:128—1:256。而此细胞静置培养时, McAb 滴度较低, 最高只能达 1:64。

密度(约 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$) 近于国外有关研究的水平^[6]。悬浮细胞分泌能力不变, 但滴度高于静置培养。表明 McAb 滴度与细胞浓度有关。但 IAP 细胞生长期较短, 3 天后细胞急剧死亡。这可能与营养贫乏及代谢产物累积有关。本试验表明, 以悬浮培养大量生产 McAb 是可行的。但仍需提高细胞密度。微胶囊细胞悬浮培养是解决该问题的一种可行办法。

参 考 文 献

- [1] 张茂金等: 细胞生物学杂志, 3(1):27, 1981.
- [2] 张茂金等: 病毒学集刊, 5:129, 1987.
- [3] 张茂金等: 军事医学科学院院刊, 12(4):306, 1988.
- [4] 纪绍忠等: 中华流行病学杂志, 5(5):297, 1984.
- [5] Leberherz, W. B.: Commercial Production of monoclonal antibodies. A Guide for Scale-up (Sally S. Seaver) New York, p.93, 1987.
- [6] Fazakas, G. S.: J. Immunol. Methods, 57:121, 1983.

SUSPENSION CULTURE OF HYBRIDOMA CELLS OF EPIDEMIC HEMORRHAGIC FEVER VIRUS

Zhang Maojin Yuan Xitong Wu Jingmin

Liu Hongxi Wang Lin Jia Qiang Zhu Guanfu

(Institute of North China Pharmaceutical corporation, Shijiazhuang)

In this paper, we reported suspension culture growth of hybridoma cells of epidemic hemorrhagic fever virus. The cells could be propagated continuously in 2 L impeller agitated fermenter. It showed maximum in population density during 48 h of incubation. When suspended, the cell concentration is higher compared with static culture, McAb titre of the suspended cells is greater than static culture, too.

Key words

Hybridoma cells; suspension culture; monoclonal antibody