

# 鸡胚细胞的微载体培养

张立 张元兴 范卫民 严春 俞俊棠

(华东理工大学生化工程研究所 上海 200237)

国外有许多利用微载体培养各种贴壁细胞的报道<sup>[1,2]</sup>。鸡胚细胞 (CEF cells) 是最早用于体外培养的细胞之一, 用它可生产多种鸡的疫苗, 如法氏囊、新城疫、马立克疫苗等<sup>[3,4]</sup>。我国生产上多采用滚瓶法, 近年来才有微载体法培养的探索<sup>[5]</sup>。要进行细胞的大规模培养, 转瓶是有效的模拟, 可以模拟生物反应器培养的一些条件, 为放大作准备。本文模拟生物反应器的培养条件, 用 500ml 转瓶 (装液 200ml) 研究了鸡胚细胞在微载体上贴壁和生长的规律, 为放大培养作了准备。

## 1 材料与方 法

### 1.1 鸡胚孵化和细胞制备

受精种蛋由上海松江生物制药厂提供。细胞制备方法见文献 [5]。

### 1.2 培养基

用 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Sigma, USA) 加 10% (V/V) 小牛血清 (由本实验室制备, 用 0.1 $\mu$ m 膜过滤) 培养细胞, pH7.0~7.2

### 1.3 微载体及其处理

实验中全部采用 GT-2 微载体 (本实验室制备)。微载体的处理方法见文献 [5] 所述方法。

### 1.4 细胞培养

将细胞悬液接种于含有微载体的转瓶 (500ml, Wheaton USA) 中, 补加新鲜培养基, 使转瓶中最终体积为 200ml, 用无菌螺旋塞盖好, 置于转瓶机上, 转速为 80r/min, 将转瓶机放在 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 37℃ 培养, 隔一定时间取样或换液。

### 1.5 病毒

传染性腔上囊病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 由上海松江生物制药厂提供。

### 1.6 分析方法

1.6.1 细胞计数: 用胰蛋白酶消化细胞 10min, 加培养基轻轻吹打, 用血球计数板计数, 以贴壁细胞为活细胞, 细胞数取 3 次计数平均值<sup>[5]</sup>。

1.6.2 葡萄糖浓度: 用葡萄糖氧化酶法 (GOD-POD) 测定<sup>[6]</sup>。

1.6.3 乳酸浓度: 用乳酸脱氢酶法 (LDH) 测定<sup>[6]</sup>。

1.6.4 氨浓度: 用尿素氮试剂盒测定 (上海生物制品研究所生产)<sup>[7]</sup>。

1.6.5 病毒滴度: 采用 Behrens-kärber 法, 以 TCID<sub>50</sub> 表示<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 鸡胚细胞在不同接种浓度下的贴壁率

在 500ml 转瓶中装 200ml 培养基, 微载体浓度为 2.0g/L, 接种细胞浓度分别为 1.0, 2.0, 3.0, 5.0

本文于 1994 年 6 月 22 日收到。

$\times 10^5/\text{ml}$ , 接种后 12h 取样, 细胞计数, 结果如表 1.

表 1 接种细胞浓度对贴壁率 ( $\Phi$ ) 的影响

接种细胞密度/ $\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$	1.0	2.0	3.0	5.0
贴壁细胞/ $\times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$	0.45	1.25	1.67	2.38
贴壁率 ( $\Phi$ ) /%	45	63	56	48

从表 1 可以明显地看出, 接种量为  $2.0 \times 10^5/\text{ml}$  时, 鸡胚细胞的贴壁率最高. 当接种浓度低时, 贴壁率较低. 这是因为贴壁细胞存在一个最低接种密度, 对于微载体系统就是每个微载体上的最低细胞数, 接种细胞密度过低, 细胞贴壁不良. 对于鸡胚成纤维细胞 (CEF cells) 等原代细胞的最低接种密度报道很少. 本实验中采用的 GT-2 微载体, 每克有  $3 \times 10^6$  个微载体, 微载体的浓度为  $2\text{g/L}$ ,  $1.0 \times 10^5/\text{ml}$  细胞接种计, 则平均每个微载体上有 17 个细胞. 由此可见, 鸡胚成纤维细胞增加了, 但贴壁率反而降低, 实际利用率较低. 由此可得出, 鸡胚成纤维细胞的接种浓度以  $2.0 \times 10^5/\text{ml}$  为宜. 无论接种浓度高低, 最终贴壁的细胞都不到接种浓度的  $2/3$ , 这与原代细胞的性质有关. 鸡胚组织经过胰蛋白酶消化解离等预处理, 细胞总要受到一定的损伤, 部分细胞的活性降到了失去贴壁能力的程度是很可能的. 从这个角度, 每批细胞都可能因预处理程度的差别而活力有所不同, 最终导致贴壁率上的差别.

## 2.2 鸡胚细胞在最佳接种浓度下的贴壁过程

微载体浓度为  $2.0\text{g/L}$ , 接种细胞浓度为  $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ . 接种后, 每隔 1~2h 取样细胞计数, 结果如图 1. 从图上可见, 开始时贴壁速率较快, 这是因为具有贴壁能力的游离细胞和微载体上未被占有的可贴壁的位点都多, 随着时间的延续, 具有贴壁能力的游离细胞和微载体上未被占位点都减少, 故贴壁率 ( $\Phi$ ) 增加比较缓慢.

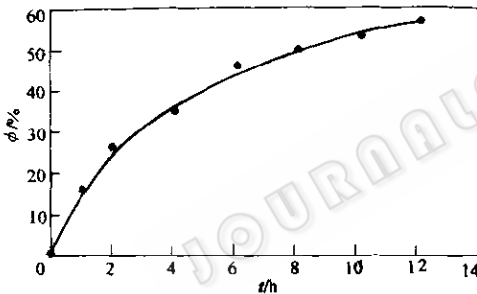


图 1 鸡胚细胞的贴壁过程

## 2.3 鸡胚细胞在转瓶中的生长和代谢

微载体浓度和接种浓度与 2.2 相同, 接种后每天取样分析. 在培养过程中, 根据细胞生长情况进行间歇换液, 每次换液  $50 \sim 150\text{ml}$ . 由图 2 可以看出. 开始时, 细胞生长缓慢, 随着细胞逐步适应环境进入对数生长期而快速增殖. 在细胞生长过程中, 葡萄糖作为一种营养物质不断消耗, 乳酸和氨作为代谢产物不断积累. 在培养过程中, 进行间歇换液, 弃掉部分培养液, 补充新鲜培养基, 从而使营养物质得到补充, 同时乳酸和氨等代谢产物的浓度降低, 使细胞在适宜的条件下生长. 在此过程中, 细胞的最大比生长速率可达  $0.5\text{d}^{-1}$ , 葡萄糖的最大比消耗速率可达  $0.22\text{mg/d} \cdot 10^{-5}$  (cells), 乳酸和氨的最大比生成速率分别为  $0.19$  和  $0.001\text{mg/d} \cdot 10^{-5}$  (cells). 当培养到第 8 天, 细胞密度可达  $1.15 \times 10^5/\text{ml}$ , 是接种浓度的 6 倍, 此时, 微载体上已被细胞紧密贴附, 细胞继续增殖已很困难, 这时接种法氏囊病毒. 接毒时滴度小于 4.00, 培养 3d 后, 病毒滴度可达 6.25.

## 2.4 补加微载体对细胞培养的影响

接种细胞浓度为  $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ , 实际贴壁细胞数为  $2.4 \times 10^5/\text{ml}$ . 接种后每天取样分析计数. 在培养过程中, 根据细胞生长情况, 进行间歇换液, 在微载体上已大部分长满细胞后补加微载体. 由于接种

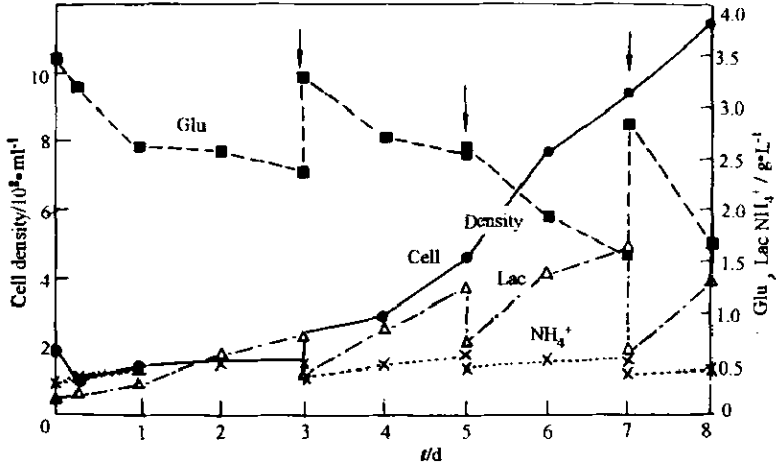


图2 鸡胚细胞在转瓶中的生长代谢

接种量(细胞):  $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ , “↓”为换液时间

浓度比较高,接种3d后,微载体上细胞已基本长满,补加微载体  $2\text{g/L}$ ,使微载体最终浓度达  $4\text{g/L}$ 。原来微载体上的细胞与新的微载体接触,在新老微载体间出现架桥现象,从而使细胞在新的微载体上生长。由于微载体浓度的增加,可供细胞贴壁的面积增加,细胞密度增加,8d后,细胞密度可达  $1.9 \times 10^6/\text{ml}$ 。第8天接种病毒,培养3天后,病毒滴度可达7.25。

因为用于制作细胞悬液的鸡胚是SPF非免疫胚,价格昂贵,来源紧张,成为鸡疫苗生产中的限制因素。鸡胚细胞在微载体上球转球实验的成功,可以缓解这一问题。用较低的接种密度,通过微载体培养,提高细胞密度;补加新的微载体后,细胞密度可以大幅度提高,从而使病毒的表达也可以大大提高,这就为大规模培养鸡胚细胞生产鸡病毒奠定了基础。

致谢 本工作得到了上海松江生物制药厂的大力支持,在此表示由衷感谢。

## 参 考 文 献

- [1] Van Wezel A L. Nature, 1967, 216: 64~65.
- [2] 卢圣栋,顾方舟. 生物工程进展, 1988, 1: 34~39.
- [3] Reuveny S, Silrstin L, Shahar A *et al.* Develop Biol Standard, 1982, 50: 115~123.
- [4] Reuveny S, Silrstin L, Shahar A *et al.* In Vitro, 1982, 18: 92~98.
- [5] 张立,张元兴,华平等. 华东理工大学学报, 1994, 20: 331~336.
- [6] Miller W M, Miller W M, Blanch H W *et al.* Biotechnol & Bioeng, 1988, 32: 947~965.
- [7] 董树沛,陈因良,顾小华等. 生物工程学报, 1992, 8(4): 389~393.
- [8] Purchase H G主编,唐桂运,武华译. 禽病原分离鉴定实验室手册. 第3版. 北京:北京农业大学出版社, 1993, pp. 236~238.
- [9] 陈因良,陈志宏. 细胞培养工程. 上海:华东化工学院出版社, 1992, 90~101.

## The Culture of Chicken Embryo Fibroblast Cells on Microcarriers

Zhang Li Zhang Yuanxing Fan Weimin Yan Chun Yu Juntang

*(Research Institute of Biochemical Engineering,*

*East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)*

**Abstract** The culture of primary chicken embryo fibroblast (CEF) cells on microcarriers in spinner bottles to produce infectious bursal disease virus (IBDV) has been investigated. It was found that there existed significant difference in the plating efficiency and growth rate of CEF cell at different inoculation density on GT-2 microcarriers. Therefore, the inoculation density for the CEF cell culture was optimized, and the plating process of CEF cells on GT-2 microcarriers was studied. While the additive microcarriers were fed during the culture, the cell density and IBDV yield increased. All the above experimental results have laid the foundation for high density culture of CEF cells and process scale-up.

**Key words** Chicken embryo fibroblast cell, microcarrier, GT-2, cell culture