

# 昆虫细胞(Sf21)悬浮培养过程中生长限制性基质 间歇补加技术的应用

赵 佼 谭文松 周 燕 周 利 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)

**摘 要** 基于 Sf21 昆虫细胞在悬浮培养过程中所表现出的生长代谢特征,提出以培养液中残糖浓度作为控制参数,并利用限制性基质(葡萄糖和蛋白水解物)的间歇补加技术调控细胞生长的方案。实际控制表明:与批培养相比,Sf21 细胞在两种具代表性的昆虫细胞培养基(IPL-41 和 TC-100)中的生长期和稳定期都得到了有效的延长。TC-100 培养液中最高细胞培养密度由  $3.0 \times 10^6$  cells/mL 提高到  $6.5 \times 10^6$  cells/mL;IPL-41 培养液中最高细胞培养密度则由  $7.05 \times 10^6$  cells/mL 提高到  $9.0 \times 10^6$  cells/mL。由于限制性基质的间歇补加技术是利用较确定的营养成分来代替复杂昂贵的补料培养基,因此更适用于昆虫细胞的大规模高密度培养。

**关键词** 昆虫细胞,悬浮培养,限制性基质,间歇补加,生长

中图分类号 Q813.1<sup>+</sup>1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0357-06

以昆虫细胞为宿主生产病毒杀虫剂或进行基因工程产品的开发,正成为生物技术研究中的一个重要内容,倍受生化工程界的关注<sup>[1,2]</sup>。与众多哺乳动物细胞表达系统所面临的问题类似,高成本/低产量仍是制约昆虫细胞-杆状病毒表达系统全面走向市场的关键因素。通过各种研究方法了解昆虫细胞对环境条件的特殊需求进而对其实施合理调控,则是解决这一问题的关键所在。

影响细胞生长的外部环境分为物理环境和生化环境。所谓物理环境,指的是细胞所处的 pH、溶氧和剪切力等外部环境,而生化环境指的是诸如细胞培养液的成分、浓度和代谢副产物等与细胞生化代谢直接相关的环境因素。利用特制转瓶系统,作者已对体外培养昆虫细胞的物理环境实施了有效调控<sup>[3]</sup>。本文在此基础上,将利用限制性基质的间歇补加技术调节细胞悬浮培养过程中的生化环境因素,力求以经济有效的方式延长昆虫细胞的生长期,从而为实现表达产物的高产奠定基础。与动物细胞高密度培养过程中广泛使用的灌注技术相比,限制性基质的间歇补加技术能够控制或改变培养基中一种或一种以上限制性成分的浓度,并做到利用较确定的营养成分来代替复杂昂贵的补料培养基。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验装置

实验装置采用自行设计的 500 mL 转瓶培养系统<sup>[4]</sup>。与传统转瓶相比,本装置可在线控制溶氧并监测细胞摄氧率的变化规律,并具备批培养、流加培养及连续培养等多种形式的操作功能。

### 1.2 材料

**1.2.1 细胞系:** 秋黏虫细胞 IPLB-Sf21-AE (Sf21),由中国科学院上海生物化学研究所吴祥甫研究员惠赠。

**1.2.2 培养基:** 实验中采用两种颇具代表性的昆虫细胞培养基 IPL-41(GIBCO,美国)和 TC-100(GIBCO,美国),以使实验结果更具广泛性。培养基中添加保护剂 Pluronic F68(0.2% BASF,德国)以适应悬浮培养的需要。根据 Sf21 细胞对营养物质的特殊需求以及所用培养基的配方特点,配制时对基础培养基中的部分成分进行了添加强化:TC-100 培养基中葡萄糖和谷氨酰胺的初始浓度分别增至 2.2 g/L 和 1.0 g/L,并补加酵母提取物(DIFCO,美国)至 4.0 g/L;IPL-41 培养基中则补加胰蛋白(OXOID,英国)至 2.5 g/L。两种培养基在使用前均添加 4%(GIBCO,美国)的胎牛血清。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养：**用方瓶贴壁培养 Sf21 昆虫细胞，以提供悬浮培养所需的接种细胞。待细胞铺满单层后，用移液管吹打成细胞悬浮液，并以  $2 \times 10^5$  cells/mL 左右的接种量将细胞悬浮液接种于转瓶中。转瓶装液量 300 mL，培养温度 28℃，搅拌转速 90 r/min。由于昆虫细胞在培养过程中 pH 的变化幅度很小，因此仅通过改变进气中空气、氧气和氮气的比例而对溶氧实施 PID 控制，并以表面通气的方式使溶氧控制在 50% 空气饱和度。定时取样分析若干生化环境参数，并以此为依据指导间歇补加技术的具体实施。

**1.3.2 测定方法：**活细胞计数用台盼蓝染色法，葡萄糖浓度由生化分析仪(YS12700, 美国)检测；采用改进的尿素氮测定试剂盒(卫生部上海生物制品研究所)测定氨浓度<sup>[5]</sup>；以 HPLC(Waters, 美国)荧光检测法结合氨基酸自动分析仪法(日立 835-50 型, 日本)测定培养基中游离氨基酸的浓度。采用改进的动态法在线检测昆虫细胞的摄氧率<sup>[6]</sup>，这种方法考虑了超小型培养装置中溶氧的解析过程，因而结果更为合理可靠<sup>[7]</sup>。摄氧率测定的具体算法和计算机程序详见文献[5]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 批培养过程中 Sf21 细胞的生长代谢规律

为了延长 Sf21 细胞的对数生长期并最终获得表达产物的高产，首先应对批培养过程中细胞的生长和代谢特征有一全面的认识。图 1 和图 2 分别是 Sf21 细胞在不同培养基中细胞生长和葡萄糖消耗的对对应关系。图 1 表明，IPL-41 培养基中的葡萄糖浓度在经历一段时间的平缓期后，于 96 h 左右开始大幅度降低，并在 192 h 后消耗殆尽。培养前期葡萄糖浓度变化平缓的原因是 IPL-41 培养基中所含的双糖(麦芽糖)经细胞代谢分解成葡萄糖，从而抵消了葡萄糖的消耗<sup>[8]</sup>。在只含有唯一碳源(葡萄糖)的 TC-100 培养基中，葡萄糖在 24 h 后即开始大幅度下降，并在 108 h 后消耗殆尽(图 2)。

两种培养基中，Sf21 细胞的生长具有共同的特征，即细胞生长速率的变化趋势与葡萄糖代谢密切相关，因而提示我们可能是由于葡萄糖浓度低于某一临界值才导致细胞生长的受阻。因此，在后续细胞生长的调控方案中，我们将残糖浓度作为首选的控制参数。

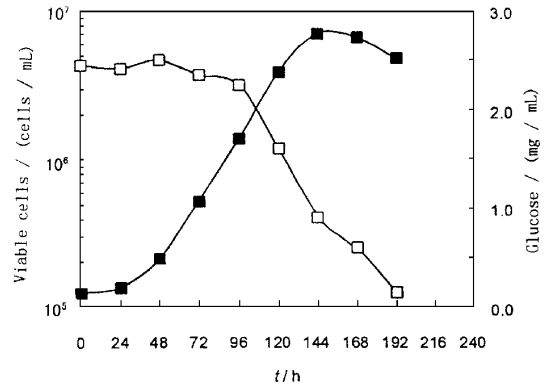


图 1 IPL-41 培养基中 Sf21 细胞生长与葡萄糖代谢的关系

Fig. 1 Relationship of Sf21 cell growth to glucose metabolism in IPL-41 medium

■ Viable cells/(cells/mL)  
□ Glucose/(mg/mL)

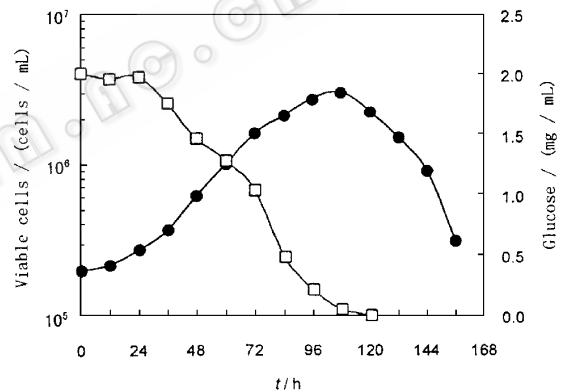


图 2 TC-100 培养基中 Sf21 细胞生长与葡萄糖代谢的关系

Fig. 2 Relationship of Sf21 cell growth to glucose metabolism in TC-100 medium

● Viable cells/(cells/mL)  
□ Glucose/(mg/mL)

由于培养基中须含有一定量细胞生长所必须的氨基酸，因此我们对处于对数生长期后期的细胞培养液进行了游离氨基酸的全分析(图 3 和图 4)。结果显示：两种培养液中多数氨基酸为 Sf21 细胞所消耗，但因初始含量充足，故未成为生长限制性因素。培养过程中氨基酸代谢的一个显著特征是丙氨酸的积累现象，这是因为培养液中的谷氨酰胺经脱氨降解形成的谷氨酸与葡萄糖经酵解途径产生的丙酮酸会在丙氨酸脱氢酶的催化下生成丙氨酸并由细胞分泌于培养液中，从而导致游离丙氨酸的积累<sup>[8]</sup>。

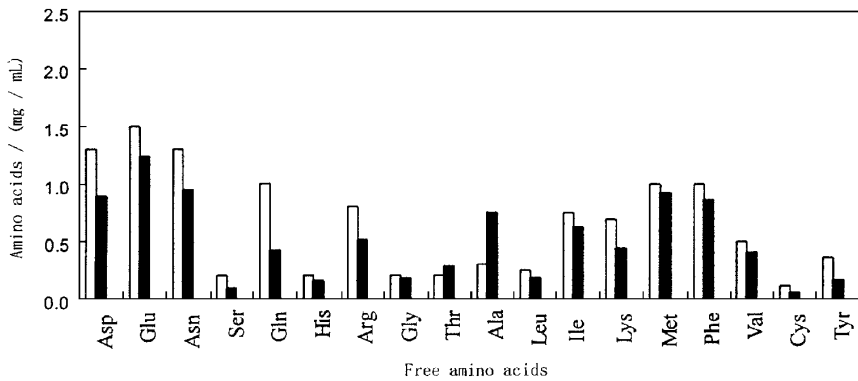


图3 IPL-41 培养基中分批培养 Sf21 细胞时的氨基酸代谢

Fig.3 Amino acid(AA)metabolism of Sf21 batch cultivation in IPL-41 medium

□ Initial AA concentration ;

■ AA concentration at the end of the exponential phase

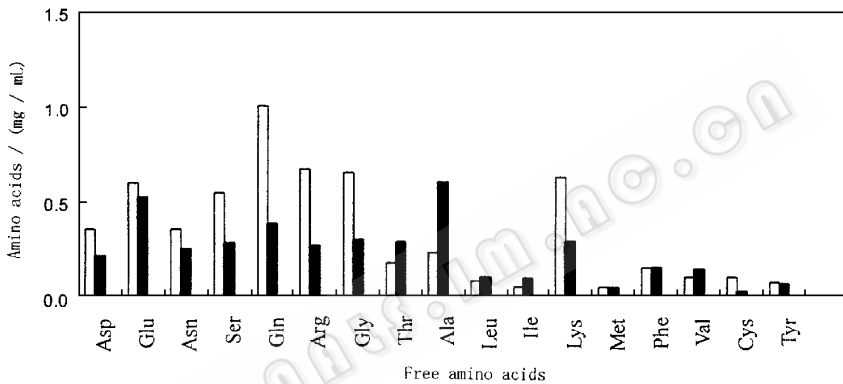


图4 TC-100 培养基中分批培养 Sf21 细胞时的氨基酸代谢

Fig.4 Amino acid(AA)metabolism of Sf21 batch cultivation in TC-100 medium

□ Initial AA concentration ;

■ AA concentration at the end of the exponential phase

在细胞培养过程中,限制细胞生长的关键因素除了营养物的耗竭之外,尚有细胞代谢副产物(乳酸和氨等)的毒害。对于 Sf21 细胞的批培养,溶氧控制在 50% 空气饱和度的水平上,碳源的不完全代谢产物-乳酸在培养液中无积累<sup>[3]</sup>,从而导致培养过程中 pH 的变化幅度很小。与哺乳动物细胞的批培养不同,谷氨酰胺的代谢副产物-氨在 Sf21 细胞的培养液中积累甚少(图 5),这是因为昆虫细胞代谢所产生的氨是以尿酸的形式分泌于培养液中<sup>[9]</sup>,因而在培养液中难以检测到高浓度的游离氨。

## 2.2 以限制性基质的分批补加技术调控 Sf21 细胞的生长

由上所述,Sf21 细胞的批式培养具有如下特征(1)培养过程中 pH 变化幅度很小(2)无细胞培养领域已知的有毒代谢副产物-乳酸和氨的积累;(3)细胞生长速率的下降与葡萄糖的消耗有关。

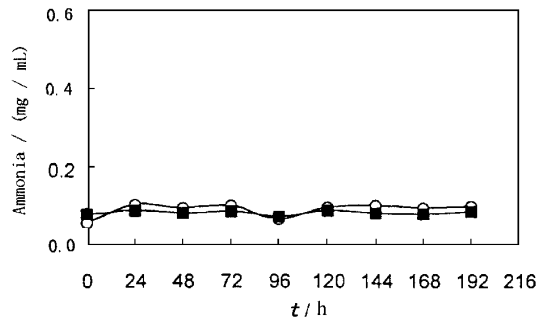


图5 批培养 Sf21 细胞时氨浓度的变化

Fig.5 Accumulation of ammonia in Sf21 batch cultivation

○ TC-100 ; ■ IPL-41

以上特征尤其适合于限制性营养成分的补加技术的应用。采用补加技术一方面可以避免某些营养成分初始浓度过高而引发分解代谢物阻遏效应,进

而影响细胞的生长和产物的形成 ;另一方面 ,又能防止限制性营养成分在培养过程中被消耗殆尽而影响细胞的生长。与动物细胞培养领域广泛使用的灌注培养技术相比 ,确定成分的分批补加技术可最大限度地节约昂贵的补料培养基 ,因此更适用于昆虫细胞的高密度大规模培养。

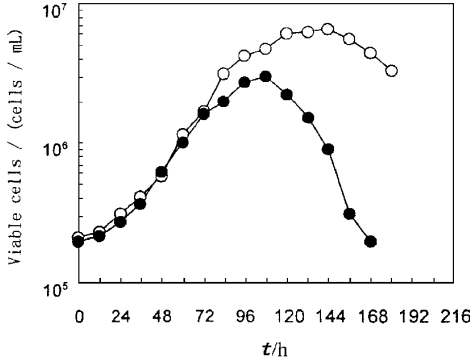


图 6(A) TC-100 培养基中间歇补加葡萄糖/酵母提取物对 Sf21 细胞生长的影响

Fig. 6(A) Effect of intermittent feeding of glucose/yeastolate on Sf21 growth in TC-100 medium

● Batch cultivation  
○ Cultivation with intermittent feeding

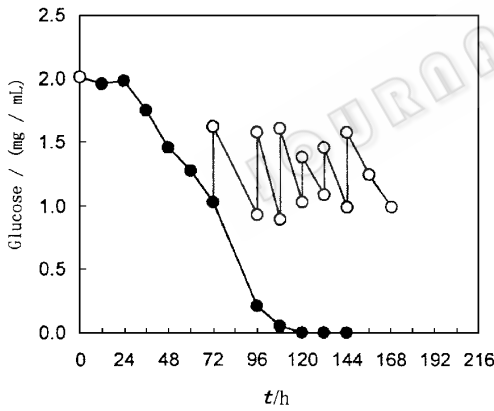


图 6(B) TC-100 培养基中间歇补加葡萄糖/酵母提取物对葡萄糖代谢的影响

Fig. 6(B) Effect of intermittent feeding of glucose/yeastolate on glucose metabolism in TC-100 medium

● Batch cultivation ;  
○ Cultivation with intermittent feeding

由 Sf21 细胞生长与残糖浓度的依赖关系 ,我们通过间歇取样测定培养液中的残糖浓度 ,并以此作为控制参数来指导补液量。有研究表明<sup>[10]</sup> ,在昆虫细胞培养过程中加入适量蛋白水解物 ,将有利于细胞的持续生长 ,因此在实验中 ,根据不同培养基的配方特点 ,分别以 10% (W/V) 的酵母提取物 (针对 TC-100 培养基<sup>[11]</sup>) 和 10% 的胰蛋白 (针对 IPL-41

培养基<sup>[12]</sup>) 浓缩液作为补加葡萄糖的溶剂 ,意图是通过蛋白水解物和葡萄糖的协同作用来刺激昆虫细胞的生长。根据间歇补加的特点 ,控制指标定为培养液中的残糖含量维持在 1.0~2.0 g/L 的范围内。

图 6(A、B) 是 TC-100 培养基中间歇补加葡萄糖/酵母提取物混和液后葡萄糖的控制曲线以及相应的 Sf21 细胞的生长趋势。由图可见 ,采用间歇补加技术后细胞的生长期和平稳期都得到了明显的延伸 ,最高细胞培养密度可达  $6.5 \times 10^6$  cells/mL ,高于批式培养  $3 \times 10^6$  cells/mL 的细胞密度。

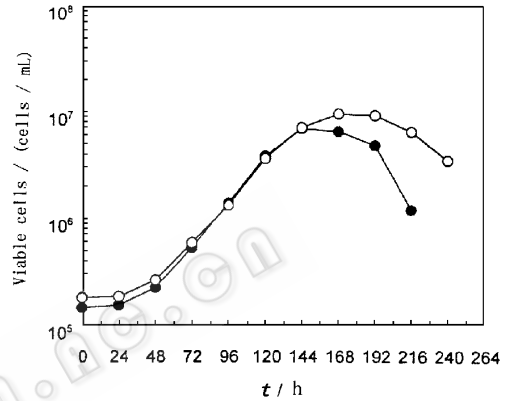


图 7(A) IPL-41 培养基中间歇补加葡萄糖/胰蛋白对 Sf21 细胞生长的影响

Fig. 7(A) Effect of intermittent feeding of glucose/tryptone on Sf21 growth in IPL-41 medium

● Batch cultivation  
○ Cultivation with intermittent feeding

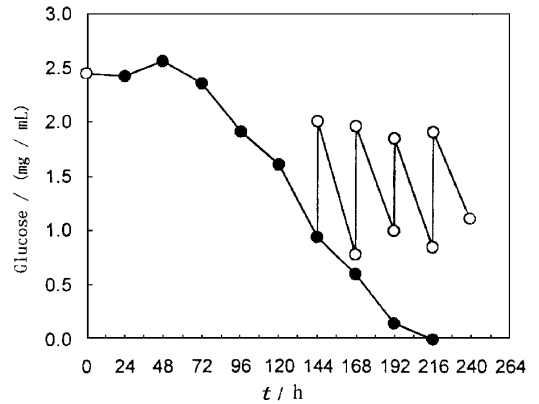


图 7(B) IPL-41 培养基中间歇补加葡萄糖/胰蛋白对葡萄糖代谢的影响

Fig. 7(B) Effect of intermittent feeding of glucose/tryptone on glucose metabolism in IPL-41 medium

● Batch cultivation ;  
○ Cultivation with intermittent feeding

在上述操作方式中 ,通过改变进气中氧、氮和空气的比例 ,能控制溶氧在其适宜水平 (50% 空气饱和

度)因而可排除因供氧不足而导致的细胞生长期的最终停止。尝试在生长末期追加另一重要能源物质—谷氨酰胺,但也不能挽回颓势,说明尚有未知因素(诸如其它限制性营养成分、未知有毒代谢产物等)阻碍了细胞在 TC-100 培养基中的进一步高密度生长。明确这些未知因素,是后续研究中需重点解决的问题。

IPL-41 培养基是一种富含各类营养成分的昆虫细胞培养基,尤其适合于细胞的悬浮培养。图 7 (A、B)表明,在基础培养基中添加胰蛋白后进行 Sf21 细胞的批式培养,活细胞密度已可达  $7.05 \times 10^6$  cells/mL。培养过程中间歇补加葡萄糖/胰蛋白,细胞的生长期和平稳期都得到了有效的延伸,最高细胞密度可达  $9.0 \times 10^6$  cells/mL。

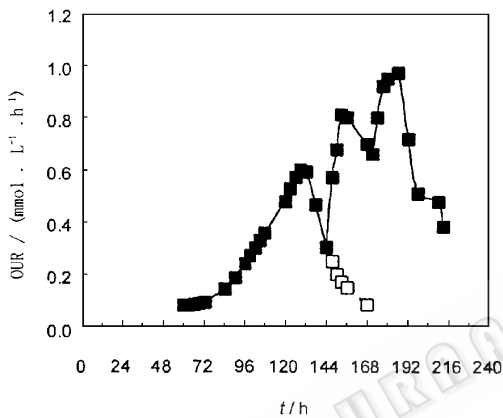


图 8 IPL-41 培养基中间歇补加葡萄糖/胰蛋白对 Sf21 细胞摄氧率的影响

Fig.8 Effect of intermittent feeding of glucose/tryptose on Sf21 OUR in IPL-41 medium

■ Batch cultivation

□ Cultivation with intermittent feeding

与 TC-100 培养基中的培养状况不同,氧的供需矛盾是 IPL-41 培养基中细胞生长期最终停止的重要原因之一。对于表面通气方式,培养装置的供氧存在着一定的限制,当细胞耗氧随着限制性营养成分补加技术的应用而急剧上升并超过一定的限度(图 8),即使以通入纯氧或提高转速的方式也不能长时间缓解氧的供需矛盾(图 9),溶氧一度降为 5% 以下,从而成为进一步高密度培养昆虫细胞的重要限制性因素。由此可见,因生化环境的改善而导致的细胞在密度培养状态下物理环境的失衡问题在后续研究中也应引起足够的重视。图 7 和图 8 还显示,在补加葡萄糖/胰蛋白后,即使细胞因溶氧所限

而转入稳定期,细胞仍具有较强的活性,具体表现在此阶段细胞的葡萄糖代谢和摄氧率等方面仍一度保持较高水平,说明采用限制性基质补加技术后,细胞自身的生理状态也较常规培养发生了很大的改变。

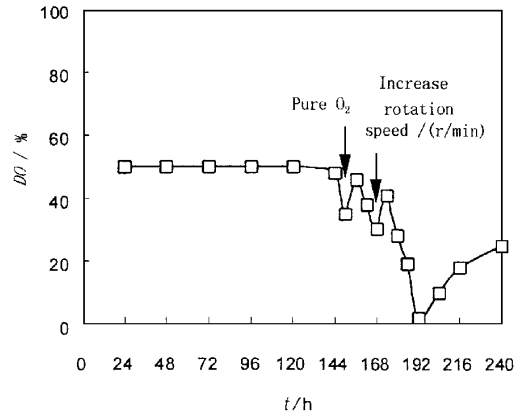


图 9 IPL-41 培养基中间歇补加葡萄糖/胰蛋白对培养 Sf21 细胞时溶氧的影响

Fig.9 Effect of intermittent feeding of glucose/tryptose on DO in IPL-41 medium

### 3 结 论

上述结果表明,Sf21 昆虫细胞悬浮培养过程中一种或一种以上的营养成分可根据所选控制参数(在此为葡萄糖浓度),通过改变补液量而从外部予以控制。这种技术所体现的优点是给予操作者灵活改进过程工艺的机会,同时通过间歇补加营养成分还可进一步考察昆虫细胞各类生长限制性营养因素。由于此法是用较确定的营养成分来代替灌注培养方式中复杂昂贵的补料培养基,因此更适用于昆虫细胞的大规模高密度培养。

昆虫细胞的生长和代谢是物理、生化环境因子及细胞自身生理特性协同作用的结果。本文的研究发现生化环境的改善在延长细胞生长期的同时,也对物理环境的调控提出了更高的要求。在进一步优化生化环境因子的同时,仍须对因细胞高密度生长而导致的物理环境失衡问题给予足够的重视。此外,对由生化环境的调控所引发的细胞生理特性的改变也应给予同样的关注。以上两方面将是后续研究中须着重解决的问题。

致 谢 本文中游离氨基酸的分析测试工作得到了中国科学院上海生物化学研究所陈德明先生的帮助,作者在此深表谢意。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Maiorella B ,Inlow D ,Shauger A *et al.* *Bio/Technology* ,1988 **6** :1406~1410
- [ 2 ] Lery X J. *Invertebrate Pathology* ,1990 **55** :342~349
- [ 3 ] Zhao J ,Tan W S ,Yu J T ,*Biochemical Engineering :Marching Toward the Century of Biotechnology* ,Proceedings of APBIOCHEC '97 ,1997 **1** : 138~142
- [ 4 ] 赵 佼 ,谭文松 ,俞俊棠. *华东理工大学学报* ,1998 **24**(3) :298~302
- [ 5 ] 赵 佼. *昆虫细胞培养和杆状病毒感染的基础研究* [博士学位论文] ,上海 :华东理工大学 ,1998
- [ 6 ] 赵 佼 ,谭文松 ,俞俊棠. *华东理工大学学报* ,1997 **23**(5) :540~544
- [ 7 ] Zhao J ,Tan W S ,Yu J T. *Biotechnology Techniques* ,1997 **11**(10) :755~759
- [ 8 ] Charles B ,Rosanne T ,Amine K. *Biotechnol Prog* ,1993 **9** :615~624
- [ 9 ] Dimitrios A S ,Nicolas K ,Leo A B. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* ,1991 **69** :457~464
- [ 10 ] Lee H ,Park T H. *Biotechnol Letter* ,1994 **16**(4) :327~332
- [ 11 ] Schlaeger E J. *Cytotechnology* ,1996 **20** :57~70
- [ 12 ] Maiorella B ,Inlow D ,Shauger A *et al.* *Bio/Technology* ,1988 **6** :1406~1410

### Application of Intermittent-feeding of Growth-limiting Nutrients in Suspension Culture of Insect Cells(Sf21)

ZHAO Jiao TAN Wen-Song ZHOU Yan ZHOU Li YU Jun-Tang  
(The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ,ECUST ,Shanghai 200237)

**Abstract** On the basis of the growth and metabolism behavior inherent in suspended Sf21 insect cells ,the intermittent feeding of growth-limiting nutrients( glucose and protein hydrolysates )was employed in the regulation of cellular growth during the cultivation by using the residual glucose concentration as a reference point. It was shown that as compared with the batch cultivation ,the intermittent-feeding of growth-limiting nutrients effectively prolonged the growth and stationary phase for Sf21 insect cells grown in two representative culture medium( TC-100 and IPL-41 ). The maximum cell density was increased from  $3.0 \times 10^6$  cells/ml to  $6.5 \times 10^6$  cells/mL in TC-100 medium ,and in IPL-41 medium ,the maximum cell density was increased from  $7.05 \times 10^6$  cells/mL to  $9.0 \times 10^6$  cells/mL. As the defined nutrient solution was used for feeding in lieu of the complicated and expensive base medium ,the technique would find prospects in large scale high-density cultivation of insect cells.

**Key words** Insect cells , suspension culture , growth-limiting nutrients , intermittent-feeding , growth