

在中空纤维细胞培养系统内用无血清培养基生产单克隆抗体

周维松 蔡少华

(中国农业科学院生物技术研究中心, 北京)

用1640SFM无血清培养基在VF-2中空纤维细胞培养系统内培养7E8杂交瘤细胞, 最大活细胞密度为 $2.34 \times 10^6/\text{ml}$, 该活细胞密度分别是转瓶培养和静态瓶培养结果的3.7倍和2.2倍。培养42天共收获7E8细胞培养液10000ml, 其单克隆抗体(简称单抗)的ELISA效价为1:20000左右, 该效价是转瓶培养和静态瓶培养结果的25倍。1000ml培养液经50%饱和硫酸铵盐析和Sephadex G-200柱层析提纯, 获纯化单抗IgG 51.82mg。该系统平均每天生产单抗12.3mg。研究结果表明, 在中空纤维培养系统内用无血清培养基培养杂交瘤细胞的方法可望用于体外大规模生产单抗。

关键词 杂交瘤细胞; 单克隆抗体; 中空纤维培养系统

自从Kohler和Milstein创立了可用于生产单克隆抗体(简称单抗)的淋巴细胞杂交瘤技术以来^[1], 该技术的发展十分迅速, 随着各种单抗的相继问世, 单抗在医学、农业、生物学、生物化学等许多领域得到了非常广泛的应用, 研究工作和商品市场对单抗的需求量也愈来愈增加, 象普查性诊断、疾病治疗、免疫提纯等方面都可能需要克或千克量级的单抗, 而通过制备小鼠单抗腹水生产单抗的常规方法已不能适应这类需要, 这就使体外大规模培养杂交瘤细胞生产单抗技术的研究越来越迫切。

十多年来, 国内外有不少体外大规模培养杂交瘤细胞生产单抗的报道, 主要有两类培养系统, 一是均一培养系统, 如批量悬浮培养, 转瓶培养系统, 发酵罐培养系统等; 二是非均一培养系统, 如分子微囊培养系统, 平面膜培养系统, 陶瓷基质培养系统, 中空纤维培养系统等^[2-5]。中空纤维培养系统曾被用于一些肿瘤细胞

和传代细胞系的培养^[6], 由于中空纤维培养系统具有类似于生理状态的纤维毛细管模式和灌注式培养基循环系统, 既有利于高密度细胞在纤维管壁和周围的停留、生长和增殖, 也便于营养物质的供应和代谢产物的转移, 近年来, 已被越来越多地用于杂交瘤细胞的体外培养^[7-9]。

由于含小牛血清的杂交瘤细胞培养上清含有复杂的蛋白组份和其它大分子物质, 使得单抗的提纯十分困难, 也限制了单抗的应用。在进行本研究之前, 我们设计了两种无血清培养基用于杂交瘤细胞培养试验^[10], 它们都能较好地维持细胞增殖密度和抗体产生能力, 本研究选用了其中一种无血清培养基在中空纤维细胞培养系统中进行杂交瘤细胞的大规模培养, 比静态瓶培养能获得更高的最大活细胞密度和抗体产量, 从细胞培养液中提纯抗体也方便易行。

本文于1990年10月30日收到。
农业部资助项目。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 无血清培养基: RPMI1640 培养基干粉10.3g(Gibco产品)加1000ml水, 丙酮酸钠110 μ g/ml; L-谷氨酰胺300 μ g/ml, HEPES2.5 $\times 10^{-2}$ M, NaHCO₃1.4g, 胸腺嘧啶1.0 $\times 10^{-4}$ M, 次黄嘌呤1.6 $\times 10^{-5}$ M, 柠檬酸铁500 μ M, 乙醇胺30 μ M, 亚硒酸钠50nM, 维生素C20 μ M, 胰岛素25mM, 2-巯基乙醇50 μ M, 亚油酸4 μ g/ml, 牛血清白蛋白400 μ g/ml, 青链霉素100 IU/ml配成无血清培养基(1640SFM)。

2. 杂交瘤细胞: 小鼠抗马铃薯X病毒淋巴细胞杂交瘤7E8 细胞株由本室李汝刚同志提供该杂交瘤细胞分泌小鼠 IgG₂ 类单抗。用含10%小牛血清的 RPMI1640 培养基培养 7E8 细胞, 待生长至最佳状态, 用于接种中空纤维培养系统和转瓶培养系统, 进行杂交瘤细胞的大规模培养。

3. 单抗腹水的制备: 按 Goding 氏的方法制备7E8单抗腹水^[11]。

(二) 中空纤维培养系统及其实验操作

杂交瘤细胞在中空纤维培养系统(VF-2系统, Amicon Corp. Danvers, MA, USA, 见图1)的纤维管壁与管间区生长。用转瓶培养系统(江苏省农科院实验工厂产品)作对照培养, 两个系统的特性和培养条件见表1。

VF-2中空纤维培养系统是由1000条内径为200 μ m的纤维管束成, 放在圆筒形外壳里面, 每条纤维管内以及管与管之间是中空的, 这种构造形成两种空间, 其一是管与管之间, 供细胞在其中停留、生长, 因为纤维管的外壁极有渗透性, 所以细胞也可渗入管壁内生长, 又因管的内壁

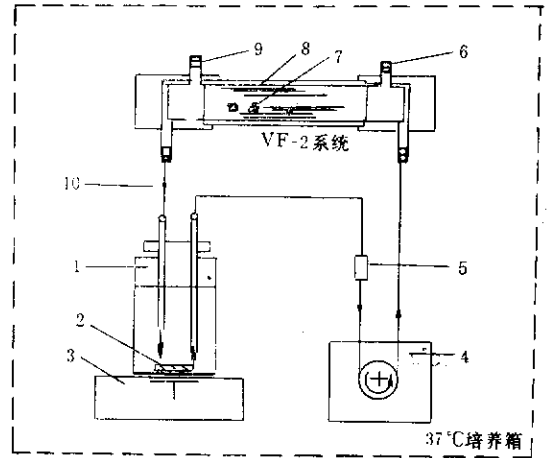


图 1 中空纤维培养系统图示

Fig.1 Diagram of the hollow fiber culture system

1. 贮液瓶; 2. 磁棒; 3. 磁力搅拌器; 4. 恒流泵; 5. 管间过滤器; 6. 细胞接种口; 7. 细胞; 8. 中空纤维管; 9. 细胞液取样口; 10. 培养基流向

1. Medium reservoir; 2. Magnet; 3. Magnet mixer; 4. Roller pump; 5. In-line filter; 6. Cell inoculation port; 7. Cells; 8. Hollow fiber tube; 9. Sample port; 10. Flow direction

是具有半透膜性质的超滤层, 所以接种于管间区的细胞不能通过内壁进入管腔和贮液瓶的培养基中, 局限于管壁和管间区; 其二是管腔空间, 供培养基从中不断流过。

按 VF-2 系统使用说明书安装中空纤维培养系统, 用 5% 福尔马林水溶液运转两天, 用经灭菌的三蒸水洗三天, 其间换液两次, 用 RPMI1640 培养基的基础液运转 2 天, 其间换液一次, 用 1640SFM 预运转一天后接种细胞。

收获 7E8 细胞, 用 RPMI1640 洗一遍, 将 1×10^8 个细胞悬浮于 10ml RPMI 1640 SFM 中, 接种于 VF-2 系统管间区, 将该系统移至 37 $^{\circ}$ C 培养箱中, 不时翻转该系统, 使细胞均匀地分布于纤维管间和管壁, 1h 后, 开启恒流泵, 贮液瓶中的 RPMI1640SFM 培养基源源不断地通过恒流泵, 经管间过滤器进入中空纤维系统后, 回

表 1 培养系统的特征
Table 1 Characters of culture system

	中空纤维培养系统 Hollow fiber bioreactor	转瓶培养系统 Spinner cul- ture system
贮液瓶容量 Total reservoir volume	1600ml	250ml
培养基用量 Medium volume in reservoir	1100ml	100ml
细胞生长区体积 Volume of cell residential area	25ml	100ml
培养基混匀方式 Means of me- dium mixing methods	磁力搅拌 Magnet stirring	连续旋转转瓶 Spinner rotation
培养方式 culture methods	培养基灌注式连续 培养 Perfusion	悬浮培养 Suspension
细胞分布状态 cell distribution character	局限在纤维管壁和 管间区 Traped in extra- capillary space	悬浮于培养基中 Suspended in medium
培养条件 Culture condition	37℃, 不通气 37℃, No aeration	37℃, 不通气 37℃, No airlift

流到贮液瓶, 不断循环。当培养基流经纤维管时, 其中的营养物质便通过纤维管内壁进入管间区以满足细胞生长、增殖所需。三天后, 培养基中的营养成分消耗后, 及时换入新鲜培养基。

(三) 静态瓶培养和转瓶培养

收获7E8细胞, 用1640SFM洗一遍, 进行7×4cm²培养瓶培养和250ml转瓶培养, 1640SFM培养基用量分别为8ml/瓶和100ml/瓶, 初始细胞密度均为1×10⁵个细胞/ml。转瓶培养时, 用含10%小牛血清的RPMI1640培养基培养7E8细胞作无血清培养的对照。

(四) 测定

1. 抗体检测: 提纯的马铃薯X病毒由肖小文, 李汝刚提供, 按Goding氏的

间接ELISA方法测定7E8细胞培养液和腹水中的单抗效价^[11]。用pH9.6碳酸盐缓冲液将经密度梯度离心提纯的马铃薯X病毒稀释至27μg/ml包被96孔ELISA酶标板, 用含0.1%牛血清白蛋白的pH7.2 pBS封闭未包被抗原的位点。待检7E8单抗样品加到板孔中, 37℃孵育1h, 同时用SP₂/O骨髓瘤细胞培养上清做阴性对照。将工作浓度的HRP-兔抗鼠IgG加入板孔, 37℃孵育1h。底物用邻苯二胺(OPD), 显色10min。用Multiskan MCC 340型酶标仪(芬兰制造)测定各孔的光密度值, 以OD值大于阴性对照OD值2倍以上为阳性样品的判定标准。

2. 抗体产量测定: 将收获的7E8细胞培养上清和单抗腹水, 经10000g离心澄清, 经50%饱和硫酸铵盐析, 产物再经10mM pH7.2PBS透析, 进一步浓缩后, 过Sephadex G-200层析柱(Pharmacia产品), 测定对应于层析峰的分馏液的抗体效价、OD_{280nm}值和抗体IgG量。

3. 抗体的纯度用SDS-PAGE电泳鉴定。对LKB公司介绍的方法稍作改变, 用含2-巯基乙醇的样品液处理样品后, 在浓度为4—22.5%的1mm超薄梯度胶上进行电泳, 考马氏亮兰染色。

结 果

(一) 培养瓶培养和转瓶培养

在培养瓶中用1640SFM培养7E8细胞的增殖曲线见图2。最大活细胞密度为1.07×10⁶/ml, 抗体ELISA效价为1:800。

在转瓶培养接种7E8细胞后3—4天内, 取出适量细胞液接种于另一转瓶中, 使初始细胞密度为10⁵/ml继续培养。

若培养时间超过4天, 将导致大部分细胞死亡。这样连续培养18天, 共收获有血清和无血清细胞培养液各6批, 测得的活细胞密度见图3, 最大活细胞密度分别为 $7.8 \times 10^5/\text{ml}$ 和 $6.3 \times 10^5/\text{ml}$, 培养液中的抗体ELISA效价分别为1:1600和1:800。

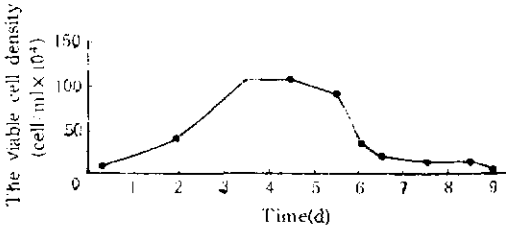


图2 静态瓶培养7E8细胞的增殖曲线

Fig.2 Proliferation curve of 7E8 cells in static flask culture

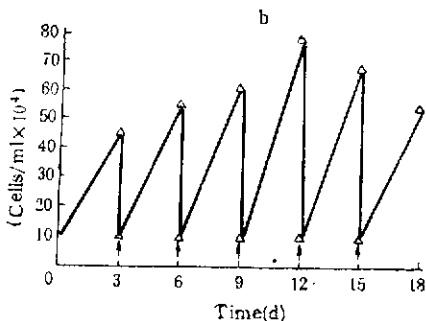
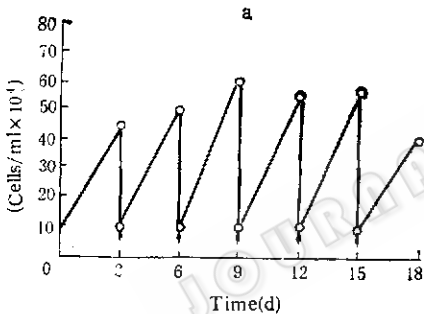


图3 转瓶培养7E8细胞的活细胞密度

Fig.3 The viable 7E8 cell density in spinner flask culture

a. 用1640SFM无血清培养基,

b. 用含10%小牛血清RPMI1640培养基培养

a. Culture in 1640SFM; b. Culture in medium containing 10% calf serum

(二) 中空纤维培养系统

7E8细胞在VF-2中空纤维培养系统中连续培养42天, 每隔1~2天从管间区收集细胞液10ml, 测得细胞密度和抗体效价, 结果见图4。培养第6天和第12天分别收获贮液瓶中的培养液, 换入1600ml新配1640SFM, 以后每隔3~4天, 收获贮液瓶中的培养液, 换入1100ml新配1640SFM。贮液瓶中的细胞培养液的抗体效价为1:20000左右, 高于纤维管间区细胞液的抗体效价, 在培养的第28天, 抗体效价达到最大值1:40000, 见图5。40天中, 共收获10000ml含高效价抗体的培养液。

贮液瓶中的细胞培养液含有高效价的抗体, 表明本研究所用的中空纤维培养系统纤维管内壁半透膜超滤层的分子排阻限较高, 纤维管间区细胞分泌的单抗并不局限在管间区富集, 大量抗体在培养基灌注循环过程中穿过半透膜, 被转移到管内和贮液瓶中的培养基中。培养第37天, 纤维管间区细胞液的抗体ELISA效价为1:625, 明显高于其它时间收获的细胞培养液的抗体ELISA效价, 是由于当时恒流泵发生故障, 停转了数小时, 培养基的循环灌注过程停止, 管间区细胞产生的抗体不能及时转移至管内和贮液瓶内的培养基中, 以至在管间区富集。

(三) 抗体产量和纯度鉴定

1000ml贮液瓶中的无血清细胞培养液和10ml单抗腹水经一步盐析提纯得到抗体IgG粗提物的产量分别为57.57mg和40.57mg, 再经Sephadex G-200层析后得纯化抗体IgG的量分别为51.82mg和26.06mg。从无血清培养液中纯化的抗体IgG在降解状态下进行SDS-PAGE电泳显示一条分子量为57000道尔顿和一条分子量为23000道尔顿的蛋白条带(见图6)。该中空纤维培养系统平均每天可生产单抗

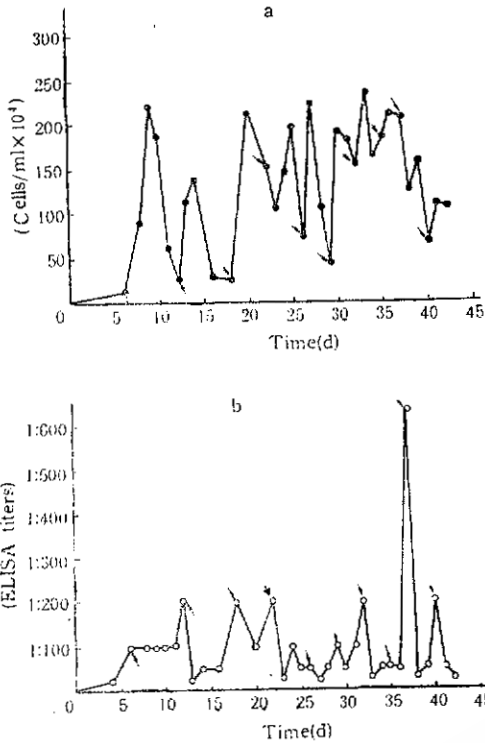


图4 在中空纤维培养系统内培养7E8细胞
Fig.4 Culture of 7E8 cells in hollow fiber bioreactor

- a. 活细胞密度 The viable cell density
- b. 单抗ELISA效价 The ELISA titers of McAb
- ↑: 换入1600ml新配1640SFM Replacing medium with 1600ml fresh 1640 SFM
- ↓: 换入1100ml新配1640SFM Replacing medium with 1100ml fresh 1640SFM

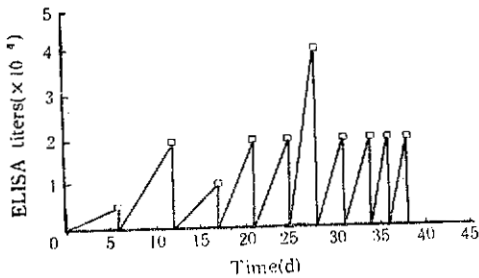


图5 贮液瓶内7E8细胞培养液的双抗效价
Fig.5 The ELISA titers of 7E8 McAb in the reservoir cultural supernatant

12.3mg。500ml 1640SFM 7E8细胞转瓶培养液经50%饱和硫酸铵盐析得抗体 IgG

粗提物7.59mg, 含10%小牛血清的RPMI 1640 7E8细胞转瓶培养液500ml, 盐析后得IgG粗提物189.12mg。

7E8 细胞的培养及其抗体产生的比较见表 2。

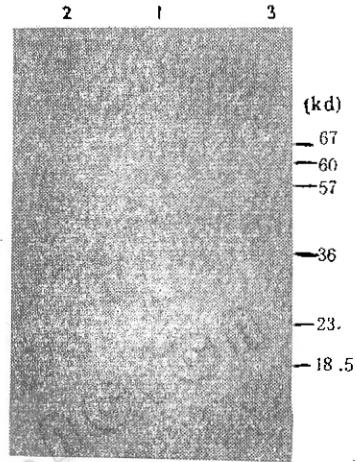


图6 7E8单抗IgG产物的 SDS-PAGE 电泳纯度鉴定
Fig.6 SDS-PAGE analysis of 7E8 McAb IgG production

- 1. 中空纤维培养系统7E8培养液的纯化IgG样品
7E8 purified IgG sample
- 2,3. 标准分子量蛋白 Molecular weight markers

表 2 7E8细胞的培养及抗体产生
Table 2 Culture of 7E8 cells and McAb Production

方法 Methods	最大活细胞密度 Max. cell density	抗体液体积 Volume	抗体 (Antibody)		
			效价 Titer	产量 Yield	浓度 Concentration
腹水 Ascites	(cells/ml × 10 ⁴) 1000	(ml) 3.4 × 3 (3mice)	1:10 ⁶	26.06	2606
中空纤维系统 Hollow fiber system	234	10000	1:20000	518.2	51.82
转瓶系统 Spinner system	63	100 × 6	1:800		
静态瓶培养 Static flask culture	107	8	1:800		

讨 论

本研究为了监测中空纤维培养系统培养 7E8 细胞的细胞密度和抗体效价, 每隔 1—2 天就从纤维管间区收集细胞液, 这样一部分细胞就从管间区被转移出来, 避免了过多的细胞在管间区积聚和形成固体细胞团块、限制营养物质和气体的扩散的状况^[7]。中空纤维培养系统具有很大的纤维毛细管表面积供物质交换。其培养基灌注式循环体系配合及时更换培养基, 既为细胞生长提供充足的营养物质, 同时也将细胞的代谢产物带走, 使细胞能在良好的环境中长时间保持高的活细胞密度和抗体分泌能力(图4), 在该系统中用无血清培养基 1640SFM 培养 7E8 细胞所达到的最大活细胞密度为 $2.34 \times 10^6/\text{ml}$, 为静态瓶培养的 2.2 倍, 为转瓶培养的 3.7 倍; 培养液中的抗体 ELISA 滴度为静态瓶培养和转瓶培养的 25 倍。结果显示了中空纤维培养系统与转瓶培养系统相比, 所具有的优点。7E8 细胞在转瓶培养系统中用无血清和有血清培养基培养达到的最大活细胞密度分别为 $6.3 \times 10^5/\text{ml}$ 和 $7.8 \times 10^5/\text{ml}$, 远低于静态瓶培养的结果, 这可能是因为不通气的培养条件、代谢产物在培养基中的积累和贴近瓶壁的细胞在转瓶旋转时易发生生长微环境改变, 导致细胞死亡、崩解。

中空纤维培养系统半透膜超滤层的分子量排阻限会影响管间区和管内培养基之

间的营养物质、气体、代谢产物和 IgG 的渗透转运^[8], 本研究中所用系统的分子量排阻限较高, 虽然有利于物质转运, 但是产生的单抗却能通过半透膜进入贮液瓶的大量培养液中, 不便于单抗提纯。如果在含抗体的培养基回流至贮液瓶之前, 先通过安装在管道中的合适的离子交换层析柱将抗体吸附在柱上, 既避免了大量培养液的收集、保存之不便, 又使系统内产生的单抗得以直接提纯。纤维管间区收获的细胞液的抗体效价远没有贮液瓶中培养液的抗体效价高, 可能是因为管间区高密度活细胞产生的以及死细胞释放的酶对单抗的降解作用。Gordon 等也曾报道过贮液瓶中培养液有抗体效价而管间区细胞液没有抗体的现象^[7]。

有血清培养基用于中空纤维培养系统培养细胞, 不但使单抗培养液中含有大量杂蛋白, 不利于单抗的提纯和应用, 高浓度的血清蛋白吸附于纤维管半透膜超滤层表面还会影响半透膜的物质转运功能^[7]。本研究将无血清培养基用于中空纤维培养系统培养 7E8 细胞, 获得了较好的细胞培养和抗体产生效果, 抗体产量平均每天为 12.3mg。

本研究通过在中空纤维培养系统和转瓶培养系统内培养 7E8 杂交瘤细胞的对比试验表明: 在中空纤维培养系统中用无血清培养基培养杂交瘤细胞的培养时间长, 活细胞密度高, 单抗提纯方便, 该方法可望用于体外大规模生产单抗。

参 考 文 献

- [1] Kohler, G. and Milstein, C.: *Nature (London)*, 256:495, 1975.
- [2] Handa-Corrigan, A.: *Bio/Technology*, 6 (7):784—786, 1988.
- [3] Seaver, S. S.: *Commercial Production of Monoclonal Antibodies*, Merce! Dekker, Inc., New York, 1987.
- [4] Birch, J. K. et al.: *Trends in Biotechnology*, 3 (7):162—166, 1985.
- [5] 朱德厚等: 上海免疫学杂志, 10 (1): 40—42, 1990.
- [6] Hopkinson, J.: *Bio/Technology*, 3:225, 1985.

- [7] Gordon, L. A.: *Biotechnology and Bioengineering*, 18:646—653, 1986.
[8] Wolfe, R. A. et al.: *Bio/Techniques*, 6 (1):62—67, 1988.
[9] Wiemann, M. C. et al.: *Clin. Res.*, 31 (2):511A, 1983.
[10] 周维松、蔡少华: 中国农业科学, 待发表。
[11] Goding, J. W.: *Monoclonal Antibodies*, London-New York, Academy Press, 1983.

Production of Monoclonal Antibody in Hollow Fiber Culture System with Serum-free Medium

Zhou Weisong Cai Shaohua

(*Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing*)

Hybridoma 7E8 cells, which produced IgG₂, against potato virus X, were cultured in VF-2 hollow fiber cell culture system with 1640 SFM serum-free medium. The maximum viable cell density was 2.34×10^6 cells/ml that was 3.7 times and 2.2 times of the maximum viable cell density achieved in spinner flask culture system and in static flask culture system, respectively. 10000 ml cell cultural supernatant had been collected in 42 days cultural period. The ELISA titer of monoclonal antibody (McAb) in the supernatant was about 1:20000 that was 25 times of the titers attained in spinner flask culture system and in static flask culture system. From 1000ml cell cultural supernatant, an amount of 51.2mg 7E8 McAb IgG had been purified by 50% saturated ammonium sulfate precipitation and Sephadex G-200 chromatography. The average yield of McAb in the hollow fiber cell culture system was 12.3mg/d. The results of the study suggest that it is hopeful for hybridoma cell culture in the hollow fiber cell culture system with serum-free medium for McAb production on larger-scale.

Key words

Hybridoma; monoclonal antibody; hollow fiber cell culture system