

应用生物反应器连续培养基因重组 CHO细胞的研究

李志强 官桂范 王妍 张兴义
叶世德 张权一

(长春生物制品研究所基因疫苗室, 长春 130062)

应用5L生物反应器悬浮培养乙肝重组DNA转化的CHO细胞 B_{43} 株生产HBsAg。试验了细胞接种量、微载体的加入方式、培养方法(半流加培养和连续灌流培养)对细胞生长形态和HBsAg分泌的影响,初步建立了5L生物反应器的生产工艺。在5L生物反应器最适合连续灌流培养的条件是pH 7.30—7.40, DO 25—35%, T 36.5℃, 微载体6—8g/L, 灌流速度5.5—7.5L/24h 细胞连续培养60天, 细胞密度维持在 5.0×10^6 — 1.0×10^7 /ml之间, 收获细胞液的RPHA效价为1:512—1:1024, HBsAg含量为3—5mg/L。

关键词 生物反应器; 微载体Cytodex 3; HBsAg; 基因重组

以乙肝重组DNA转化的CHO细胞生产乙肝疫苗, 细胞大规模培养是个关键问题。传统的细胞培养多采用玻璃瓶, 在静止或旋转方式下培养细胞, 收获细胞培养液量少, 染菌机会多。当前在诸多的细胞培养方法中以生物反应器微载体培养方法最适于工业化生产, 我们应用Celligen研究了细胞培养条件, 本文报道研究的结果。

材料与方 法

(一) 材料

1. 细胞: CHO(B_{43})株由预防医学科学院病毒研究所提供, 为用乙肝重组DNA转化CHO细胞并筛选高效表达HBsAg的细胞系。

2. 生物反应器Celligen: New Brunswick Scientific, CO, INC, USA生产, 空气提升式搅拌, 容积5L, 工作

容积3.75L, 以压缩空气, O_2 , N_2 , CO_2 。调控DO和pH, 按说明书操作, 用前DO及pH传感器标定准确。

3. 细胞培养液: DMEM GIBCO/BRL USA生产, 补加10%(细胞生长期)或5%(细胞维持期)的小牛血清。

4. 微载体: Cytodex 3 (Pharmacia)加量为6—10g/L。

(二) 方法

1. 培养条件: 除特别指出外为装液量3.75L, pH7.20—7.25(生长期)或7.35—7.45(维持期), DO 15—25%(生长期), 25—35%(维持期), T 36.5 ± 0.5 ℃(生长期), 36 ± 0.5 ℃(维持期)。

2. 细胞计数: 每次取悬液10ml, 将微载体沉淀后, 去掉上清, 用胰蛋白酶脱落微载体上的细胞, 显微镜下计数。

3. RPHA测定: 按常规方法, 血球由本所出品, 采用乙肝 α 单克隆抗体包被。

本文于1991年11月15日收到。

结果与讨论

(一) 接种量对细胞生长的影响

在微载体数量相同, 培养条件恒定的情况下, 细胞接种量和细胞长满微载体表面的时间密切相关, 我们用 8g/L Cytodex 3, 分别接种细胞 1.1×10^5 /ml、 5.0×10^5 /ml 和 2.1×10^6 /ml。细胞生长动态如图 1。

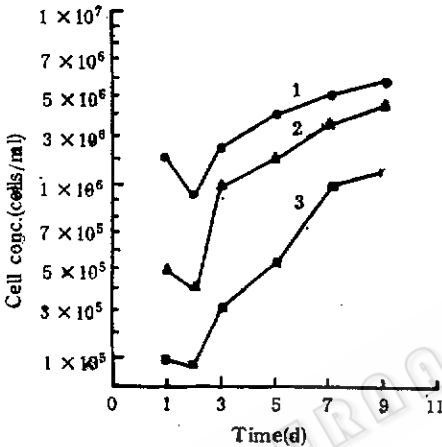


图 1 接种量与细胞密度的关系

Fig.1 The relationship between cell density inoculated and growth of cells

- 1. 1.1×10^5 cell/ml, 2. 5.0×10^5 cell/ml,
- 3. 2.1×10^6 cell/ml

如以细胞密度达到 5×10^6 /ml 作为可以收获细胞上清的标准, 则分别为 14 天, 9 天和 6 天。

(二) 微载体加入方式对细胞生长动态的影响

微载体的加入方式分两种, 一种为一次性全部加入, 另一种分 3 次加入, 首次加入总量的 1/2 微载体, 视细胞生长情况, 补加 2 次, 每次为总量的 1/4, 两组微载体总量和接种细胞量基本相同, 生长动态如图 2。

如以细胞密度达到 5×10^6 /ml 作为

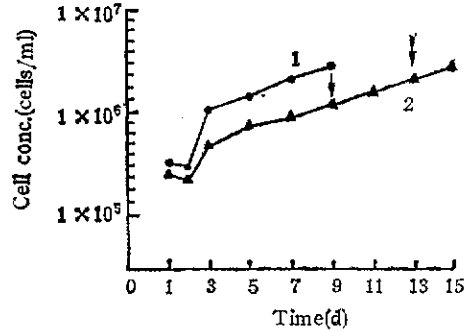


图 2 加入微载体方式与细胞密度的关系

Fig.2 The effects of the mode putting microcarrier on cell density

- 1. 一次加入微载体 10g/L,
- 2. 一次加入微载体 5g/L, ↓ 补加 2g/L

收细胞液的标准, 一次性加入微载体需要 9 天, 而分次加入微载体则需要 15 天。

(三) 培养方式对细胞形态与 HBsAg 产量的影响

Celligen 生物反应器可用于半流加培养和连续同步收获细胞液和补加新的培养液, 换液速度可根据细胞量、细胞形态和 HBsAg 的浓度调节。

在细胞连续培养过程中, 采用半流加培养法, 细胞密度可以维持在 $4-5 \times 10^6$ /ml 左右, 最高可达到 7×10^6 /ml, HBsAg 产量 RPHA 滴度在 1:256—1:1024 之间, 每 48h 收液 3L。如图 3 所示。

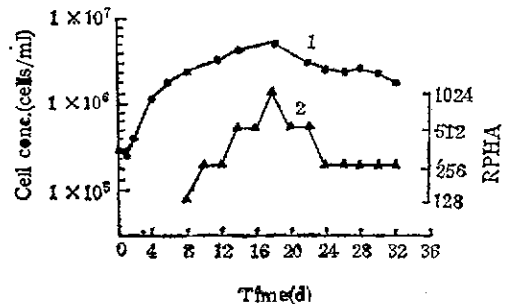


图 3 半流加培养时细胞密度 RPHA 和时间的关系

Fig.3 The relationship the growth of cell, the secretion of HBsAg and cultuing time by batch cultured

- 1. Cell numbers, 2. RPHA

采用连续灌流培养,细胞密度保持在 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 以上,最高可以达到 $1.0 \times 10^7/\text{ml}$, HBsAg产量RPHA滴度在1:512—1:1024之间。如图4,每48h收液7L—15L。

两种培养方法保持细胞高密度的时间亦不相同,半流加可维持30天左右,连续灌流可维持45天以上。

细胞在微载体上生长,载体与细胞的比值将影响细胞密度,但在接种定量细胞并加入相应微载体时,微载体的一次加入较分次加入优越,分次加入不但延长了收液时间,而且造成细胞生长期长,载体上细胞生长不同步而难于调控培养参数。

Celligen生物反应器具有灌流培养装置,灌流培养不断更新细胞培养液,维持细胞处于良好状态,并可根据细胞形态和

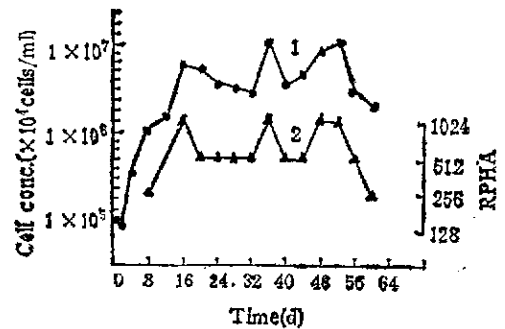


图4 连续灌流培养细胞密度RPHA与时间的关系
Fig.4 The relationship the growth of cell, the secretion of HBsAg and culturing time by the perfusion cultured

1. Numbers cell, 2. RPHA

HBsAg浓度调节灌流速度,故优于48h收获一次的半流加培养方法,在单位时间内灌流培养法收获抗原原液量高半流加培养法2—4倍。两种方法抗原浓度大致相同。

Investigating on Culturing Gene-recombination CHO Cell in Bioreactor

Li Zhiqiang Guan Guifan Wang Yan Zhang Xinyi
Ye Shide Zhang Quanyi

(Changchun Institute of Biological Products, ChangChun 130062)

The techniques and procedure culturing gene-recombination CHO cell (B_{43}) on suspending microcarriers in the bioreactor to produce genetic engineering Hepatitis B vaccine has been studied. The cell density inoculated, the mode putting microcarriers in culre system, both of culture modes, that are batch and perfusion, the effects of stirring speed on the dissolved oxygen and growth of rCHO cell in cultivation period have been investigated and compared. The experiments showed that the optimum results might be gained under following conditions: pH 7.30—7.40; DO 25—35%; T 36.5°C; stirring speed 60—80 r/min; perfusion speed 5.5—7.5 L/24h; culturing time 60 days. The results were: the cell concentration 5.0×10^6 — 10.0×10^6 cell/ml; RPHA of supernatant 1:512—1:1024; concentration of HBsAg protein 3—5 mg/L.

Key words Bioreactor; microcarriers (Cytodex 3); HBsAg; gene-recombination