

## 葡萄糖的添加对昆虫细胞 Sf21 悬浮生长的影响

李文青 肖成祖 黄子才 陈昭烈

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

**摘要** 添加葡萄糖对昆虫细胞 Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) 悬浮生长的影响, 发现补加糖量在 1g/L 时, 能明显提高细胞生长的速度和最高密度, 细胞最高密度由  $2.5 \times 10^6$ /ml 增加到  $4.9 \times 10^6$ /ml; 补加糖量在 2g/L 时, 则有显著的抑制作用, 即使增加接种密度, 细胞生长的最高密度也只有  $2.1 \times 10^6$ /ml。当采取流加葡萄糖方法来培养细胞时, 则其生长的最大密度可提高到  $5.2 \times 10^6$ /ml。

**关键词** 昆虫细胞培养, 葡萄糖, Sf21

由于昆虫细胞-杆状病毒表达系统具有许多其它真核表达系统所不具有的优点, 如高表达、病毒对人无致病力、没有哺乳动物致癌基因的表达等<sup>[1]</sup>。国内外已对其开展了广泛研究, 并用这一系统高水平地表达了许多有医疗价值的蛋白质药品<sup>[1,2]</sup>。因此, 作为联系研究和生产的一个环节, 昆虫细胞的大规模培养成为人们研究的一个领域。现在, 国外昆虫细胞 Sf21 悬浮培养, 密度都可达到  $5 \times 10^6$ /ml<sup>[3-5]</sup>。本文采用搅拌瓶批式培养, 以 Sf21 为研究对象, 观察了补加葡萄糖对昆虫细胞生长的影响, 现将结果报道如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 细胞株

昆虫细胞株 (*Spodoptera frugiperda*) Sf21, 由本所邓继先提供。

#### 1.2 培养基

培养基 TC-100, 添加 Pluronic F68 (10%), Yeastolate ultrafiltrate (YU, 酵母超滤液), 均为 GIBCO 公司产品。葡萄糖 (分析纯), 北京化学试剂二厂生产。胎牛血清, 浙江金华犊牛利用研究所生产。

培养基组成: 静止培养时为 TC-100 + 10%胎牛血清 + 2%YU, 悬浮培养时再加 0.2%Pluronic F68。

#### 1.3 器材

搅拌瓶 (250ml), 搅拌器为 BELLCO 公司产品。培养箱 (LRH-150B), 广东省医疗器械厂产品。

#### 1.4 方法

1.4.1 细胞培养方法: 培养温度为 28℃, 搅拌转速为 95r/min, 分批培养时, 根据所需的葡萄糖浓度, 加入相应量的 10%葡萄糖液; 分批补加培养时, 培养起始即加入 1g/L 的葡萄糖, 在细胞进入对数生长期的第二天, 又加入 1g/L。

1.4.2 分析方法：葡萄糖分析，用北京科卫临床诊断试剂厂生产的葡萄糖测定试剂盒；乳酸分析，用酶比色法<sup>[6]</sup>；细胞计数，用血球计数板。

## 2 结果与讨论

### 2.1 分批加葡萄糖对 Sf21 生长的影响

我们考察了在添加 1g/L、2g/L 葡萄糖时，Sf21 悬浮生长的情况，并不加糖作对照，结果如图 1。只用 TC-100 培养基（含糖 1g/L）时，细胞生长的最高密度为  $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ ，当添加 1g/L 葡萄糖时，最高密度达到  $4.9 \times 10^6/\text{ml}$ ，但在添加 2g/L 葡萄糖（此时糖的初始浓度为 3g/L）时，最高密度反而下降到  $1.7 \times 10^6/\text{ml}$ 。计算这三种情况下最大比生长速率，分别为  $0.575\text{d}^{-1}$ ， $0.671\text{d}^{-1}$ ， $0.482\text{d}^{-1}$ 。细胞生长速度也随着糖的加入而呈现出一致的变化。初步断定，在初始葡萄糖浓度 3g/L 下，糖对细胞生长有抑制作用。

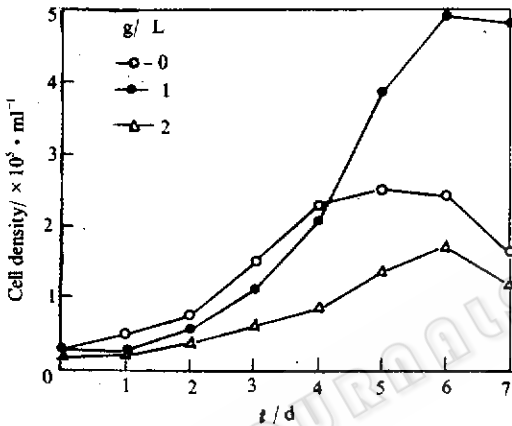


图 1 葡萄糖浓度对 Sf21 生长的影响

Fig. 1 The effect of glucose concentration on Sf21 growth

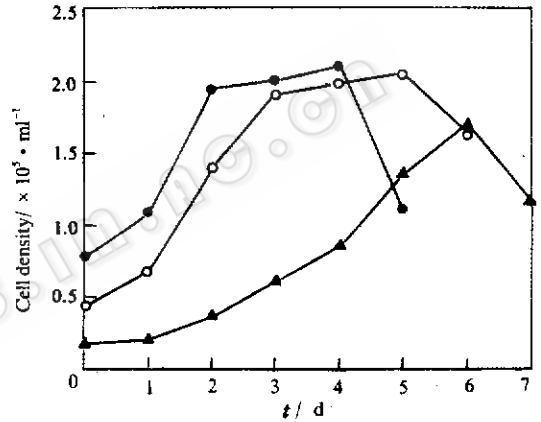


图 2 接种浓度对 Sf21 生长的影响

Fig. 2 The effect of inoculum density on Sf21 growth

Cell density ( $\times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ );  
 ▲ 1.8 ○ 4.4 ● 7.73

考虑到昆虫细胞生长的最低接种密度为  $1 \times 10^5/\text{ml}$ ，且接种浓度高，细胞生长快，最大密度值也高。而图 1 中加糖 2g/L 时接种浓度为  $1.8 \times 10^5/\text{ml}$ ，比较接近最低值，为此，

做了在 3 种不同接种浓度下，Sf21 添加 2g/L 葡萄糖时的生长实验结果见图 2。我们发现，提高接种浓度，最高密度值会增大，但升幅不大，最高值为  $2.1 \times 10^5/\text{ml}$ ，计算这三条曲线的最大比生长速率，按接种浓度从低到高的顺序，各为  $0.482\text{d}^{-1}$ ， $0.521\text{d}^{-1}$  和  $0.585\text{d}^{-1}$ 。这说明，此种情况下，接种密度对细胞的生长和最大密度值有促进提高的影响，但由于葡萄糖起始浓度高，对细胞的抑制作用处于主要地位，因而此种影响有限。这进一步说明了葡萄糖对 Sf21 生长的双重作用即低浓度下促进生长，高浓度下有抑制作用。

为了尝试对葡萄糖的双重作用进行探究，测量了以上实验中每天培养基中的葡萄糖和乳酸浓度，结果见图 3、4。我们发现，在不加葡萄糖时，由于细胞的消耗，在第四天，葡萄糖的浓度就接近为零，而细胞很快进入死亡期；加入 1g/L 葡萄糖后，由于碳源和能源供应较充足，细胞生长迅速，最高密度值提高 94%，残糖量几乎为零。当加入 2g/L 葡

萄糖后,糖的消耗增大,尤其在高接种浓度下,糖的消耗与加1g/L时的情况相近。这说明,从糖的利用上,不能解释其对细胞生长的抑制作用。

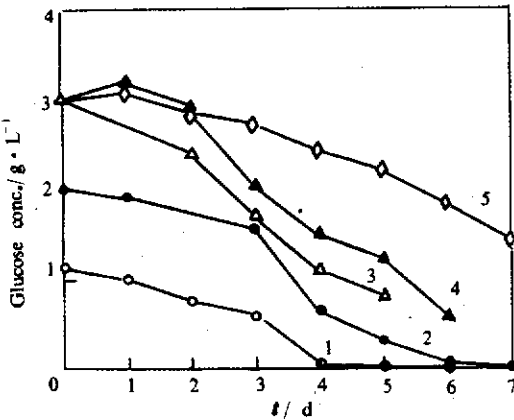


图3 在不同接种和加糖浓度,葡萄糖随时间变化曲线

Fig. 3 The curves of glucose concentration versus time under different inoculum densities and glucose addition concentrations

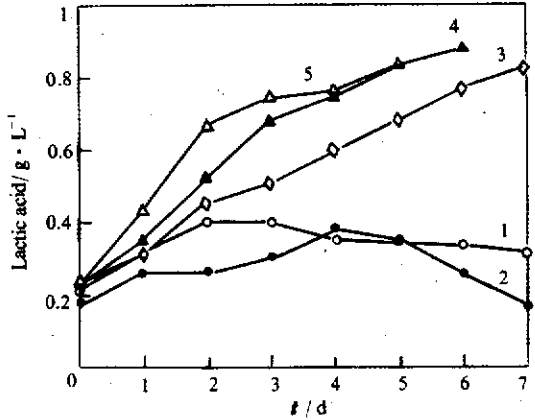


图4 在不同接种和加糖浓度下,乳酸随时间变化曲线

Fig. 4 The curves of lactic acid concentration versus time under different inoculum densities and glucose addition concentrations

Fig. 3-4	○	●	◇	▲	△
Glucose conc. /g · L <sup>-1</sup>	0	1	2	2	2
Inoculum densities/×10 <sup>5</sup> · ml <sup>-1</sup>	2.8	2.7	1.8	4.4	7.73

比较这5种培养条件下的乳酸浓度的变化可看出,在低糖浓度时,乳酸的浓度随着细胞的生长有一个小幅度的起伏,最终值与起始值相近。这说明此时细胞对糖的利用彻底,而细胞也能利用培养液中的乳酸,作为碳源和能源。葡萄糖浓度高时(>3g/L),乳酸浓度随细胞的生长一直呈上升趋势,无论接种浓度的高低,最后都达到0.8g/L以上。这说明此时糖代谢发生了变化,对于糖的利用已较不完全,转化成乳酸排到培液中。另外,利用方瓶实验,在培液中加入1g/L的乳酸,并不影响细胞的生长。这说明从乳酸浓度的影响上,难以解释高浓度的葡萄糖时Sf21生长的影响。

### 2.2 分批流加葡萄糖对Sf21生长的影响

根据以上实验,加1g/L葡萄糖时,细胞能消耗尽,而加2g/L葡萄糖时,细胞生长受抑制,为此,采用分批流加方法来培养Sf21,在培养起始加糖1g/L,在细胞进入对数生长期的第2天加入1g/L,实验结果见图5、6。可以看出,在接种密度为1.1×10<sup>5</sup>/ml时,较加葡萄糖1g/L条件下,最高密度值进一步

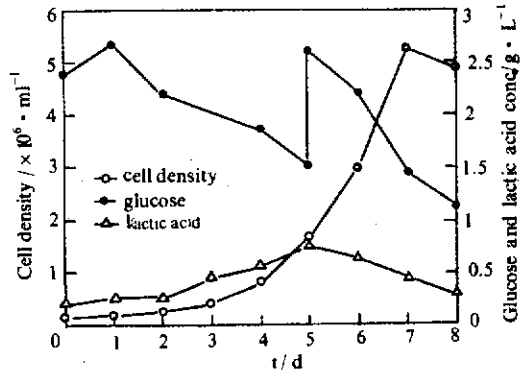


图5 在分批流加培养中,细胞密度、葡萄糖和乳酸浓度随时间变化曲线

Fig. 5 The curves of cell density, glucose and lactic acid concentration versus time in fed-batch culture.

上升, 能达到  $5.25 \times 10^6/\text{ml}$ 。与前述分析比较, 这种加糖方法消除了高浓度糖对细胞生长的抑制, 又避免低糖浓度不能满足细胞生长所需的情况。另外, 乳酸的代谢存在一个幅度略高的起伏, 整个培养过程中乳酸的积累量不多, 说明糖的代谢与低糖浓度的情况一样。计算此时的最大比生长速率 ( $0.586\text{d}^{-1}$ ) 是比较低的, 这是由于接种浓度太低所致, 图 3 的结果就说明这一点。

### 参 考 文 献

- [1] Maramosch K. *Advances in cell culture*, 1982, 2: 13~15.
- [2] Agathos S N, Jeong Y H, Venkat K. *Ann NY Acad Sci SUA*, 1990, 589: 372~398.
- [3] Murhammer D W, Charles F G. *Biotechnology*, 1988, 6: 1411~1418.
- [4] Shuler M L, Chao T, Wickham T. *Ann NY Acad Sci USA*, 1990, 589: 399~422.
- [5] Maiorella B, Inlow D, Shauger A. *Bio/Technolgy*, 1988, 6: 1406~1410.
- [6] 华南工学院等合编, 制糖工业分析, 北京: 轻工业出版社, 1981, pp. 170~173.

## The Effect of Glucose Addition on the Suspension Growth of Insect Cell Sf21

Li Wenqing Xiao Chengzu Huang Zicai Chen Zhaolie

(*Institute of Bioengineering, Academy of Military Medical Sciences, PLA, Beijing 100071*)

**Abstract** It was studied the effect of glucose addition on the suspension growth of insect cell Sf21. Compared with no glucose addition, it was found that at the addition of 1g/L, the growth rate of Sf21 was enhanced, the maximal density was increased from  $2.5 \times 10^6/\text{ml}$  to  $4.9 \times 10^6/\text{ml}$ ; at the addition of 2g/L, the inhibition effect appeared, even the inoculum density was increased, the maximal density of Sf21 cell was only  $2.1 \times 10^6/\text{ml}$ . When the glucose-fed batch culture was used, the maximal density of Sf21 culture could be more increased to  $5.2 \times 10^6/\text{ml}$ . In the compare of glucose and lactate metabolism under these conditions, it was found that at the addition of 2g/L, the metabolism of glucose and lactate was different from other conditions. However, it was difficult to explain the inhibition effect of the glucose at high concentration.

**Key words** Insect cell culture, glucose, Sf21