

简易的杂交瘤细胞载体培养

陈贻锴

(福建医学院基因工程研究室 福州 350004)

Wang Gouzheng* Zhang Wenyong* David Freedman*

New Brunswick Scientific Co. Edison, N. J. 08818-4005, USA

通常杂交瘤细胞是悬浮培养在扁瓶或搅拌瓶中,其培养的细胞浓度和抗体的产量都不高。大量生产单克隆抗体则要依靠各种细胞培养器、中空纤维、微胶囊、固定化细胞和连续灌注等系统,但这些系统设计复杂,技术要求高,价格昂贵,效果不一^(1,2)。最近 Wang G 等人⁽³⁾采用园片状聚脂载体 (Fibra-Cel[®]) 作为固定床,在连续灌注的细胞培养器内,让杂交瘤细胞滞留在载体的间隙中,并在其中生长、繁殖和分泌单克隆抗体。使连续灌注系统大为简化,并获得高细胞密度和大量抗体的效果。我们在搅拌培养瓶中,采用这种聚脂载体培养杂交瘤细胞,结果细胞浓度和抗体的产量提高近一倍,很适合于普通实验室的应用。

1 材料和方法

1.1 搅拌培养瓶载体的装填

在 2 个 1.0L 的磁力搅拌培养瓶内安装不锈钢的篮子,内充填 8.0g 的园片状聚脂载体 (Fibra-Cel[®] Sterilin, England)。其中一个培养瓶内壁上固定篮子,使篮子不随搅拌而运动,载体处于静止状态 (固定床载体培养, a); 另外一个培养瓶中,篮子被固定在搅拌轴上,载体跟随搅拌轴的旋转而运动 (转动床载体培养, b) (图 1); 第 3 个培养瓶中仅安装篮子不充填载体作为对照 (悬浮培养, c)。

1.2 细胞和传代

r-69B 为鼠-鼠杂交瘤细胞,它分泌抗人 r-IFN 单克隆抗体 IgG, 获自 Dr Pestka (University of Medicine & Dentistry, N. J. USA)。培养基和传代参见文献 [4]。

1.3 杂交瘤细胞载体培养

将生长良好的 r-69B 接种上述 3 个培养瓶中,接种物的细胞终浓度为 $0.42 \times 10^6/\text{ml}$,工作体积为 475ml。然后将这些培养瓶移入 CO_2 培养箱中,松开两侧的瓶盖, 5% CO_2 、37℃ 环境中磁力搅拌培养,搅拌速度为 100r/min。同时细胞也在扁瓶中培养,以作参照。根据培养液中葡萄糖的消耗量,每 1~2d 收集 300ml,并用新鲜高糖培养基补充到原工作体积,连续培养 21d,每天取样检测。

1.4 杂交瘤细胞的生长和代谢检测

1.4.1 细胞测定: 用血球计数板计算细胞浓度,细胞的活性则用台盼兰排斥试验判定。

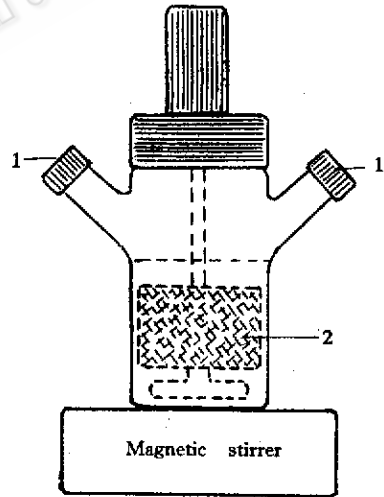


图 1 转动床 (B) 培养系统示意图

1. 瓶盖; 2. 篮子

1.4.2 葡萄糖的测定: 培养液中葡萄糖含量用 Pre-formed Kits 16-UV (Sigma USA) 测定, 按厂家介绍的方法操作。

1.4.3 抗体浓度的测定: 抗体浓度的测定则采用 Velez 等人^[5]改良的琼脂糖免疫扩散试验来测定。

2 结果和讨论

2.1 杂交瘤细胞的生长

r-69B 在不同的搅拌瓶中培养显示 (图 2A 和表 1) 高度的活力, 活细胞比例都在 90% 以上, 但生长密度和细胞的游离率不同。在常规的搅拌瓶 (c) 中培养, 即悬浮培养, 第 4d 细胞浓度达到 1.0×10^6 / ml, 以后根据葡萄糖的消耗情况, 每 2d 收获得更换培养物 300ml, 在培养过程, 细胞浓度维持在 $1 \sim 2 \times 10^6$ / ml, 平均为 $1.18 \pm 0.49 \times 10^6$ / ml, 这与扁瓶培养结果相似。在固定床载体的搅拌瓶中培养, 活细胞浓度第 4 天亦达 1.0×10^6 / ml。以后每 1~2d 收获和更换一次培养液, 细胞浓度在 $1.0 \sim 1.9 \times 10^6$ / ml, 之间徘徊, 培养液中游离细胞占 25.1% 左右, 显示大部分杂交瘤细胞被固滞在园片状聚脂载体内。Fibra-Cel[®] 载体直径为 6mm 厚度 15μ 的多层聚脂物, 内部空隙占载体总体积的 90%, 这为细胞的定居和生长提供了大量的空间。但在搅拌瓶中, 固定床载体培养和常规悬浮培养细胞浓度没有什么区别, 仅仅是细胞分布的部位不同, 说明两种培养提供给细胞生长的条件, 包括营养成分和氧的供给 (溶解氧) 是相同的。在转动床载体搅拌瓶中培养, r-69B 细胞第 4 天同样达到 1.0×10^6 / ml, 随后继续增多, 第 10d 达 2.4×10^6 / ml, 由于葡萄糖消耗较大, 故每天收获和更换培养液 300ml。在培养全过程活细胞浓度平均为 $1.97 \pm 0.75 \times 10^6$ / ml, 其中游离细胞占 46.5%。这样一半左右的杂交瘤细胞被固滞在聚脂载体内, 每天在更换培养液过程中, 损失的细胞数仅为 29.4%, 保持了大量的细胞作为继续生长、繁殖和表达的基础。再者, 装填载体的篮子在培养过程以较高的速度转动, 增加了培养液的气体交换能力, 从而提高了溶解氧的供给。结果转动床载体培养的细胞浓度可达固定床载体培养和悬浮培养的 1.5 倍。但是, 在转动床载体培养过程, 其游离的细胞比例远高于固定床载体培养, 说明杂交瘤细胞固滞于聚脂载体内并不牢固, 一定的转动速度, 就可以把细胞从载体内甩脱出来。载体的转动也促进载体内细胞碎片和代谢产物的及时排出, 保持了良好的局部环境, 有利于细胞的生长。

表 1 杂交瘤细胞在不同搅拌瓶中培养结果

Culture	Statory basket with Fibra-Cel [®]	Rotating basket with Fibra-Cel [®]	Suspension without Fibra-Cal [®]	T-flask
Cell conc. / $\times 10^6$ / ml ⁻¹	1.22 ± 0.44 *	1.97 ± 0.75 **	1.18 ± 0.49	1.38 ± 0.60
Rate of suspension cells / %	25.1	46.5	100.0	100.0
Glucose conc. / mg · ml ⁻¹	1.94 ± 0.77 *	1.26 ± 0.82 **	1.97 ± 0.82	/
IgG conc. / mg · ml · L ⁻¹	29.39 ± 8.77 *	46.74 ± 10.95 **	32.29 ± 14.64	33.47 ± 11.49
Rate of medium replacement / %	46	63	32	32
Harvested IgG / mg	99	217	122	/

Compare with suspension culture * $P > 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 葡萄糖的代谢

在不同的搅拌瓶中, 葡萄糖的消耗和细胞的生长呈一致的关系, 常规悬浮培养和固定床载体培养, 培养液中葡萄糖的浓度维持在较高水平, 平均分别为 1.97 ± 0.82 和 1.94 ± 0.77 mg/ml。而转动床载体培养更换率为 63%, 远较固定床和悬浮培养法为高, 但其葡萄糖的浓度仍较低, 维持在 1.26 ± 0.82 mg/ml, 说明转动床载体培养葡萄糖的消耗大, 与其细胞数量高相符 (见图 2B)。

2.3 单克隆抗体的生成和收获

在转动床载体培养过程, 培养液中抗体的平均浓度为 46.74 ± 10.95 mg/L, 较其他 2 种方法为高。这与其维持较高的细胞浓度有关, 也说明固滞在载体内的杂交瘤细胞能正常地分泌单克隆抗体。这样, 在培养的 21d 中, 转动床载体培养共收获抗体 217mg, 明显地高于固定床载体培养的 99mg 和悬浮培养

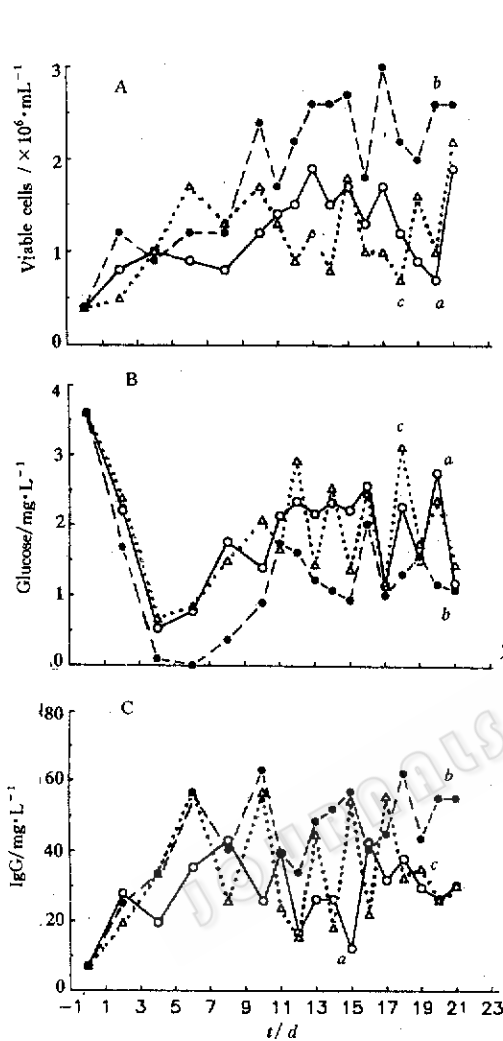


图 2 在不同的搅拌瓶中杂交瘤细胞的生长和代谢

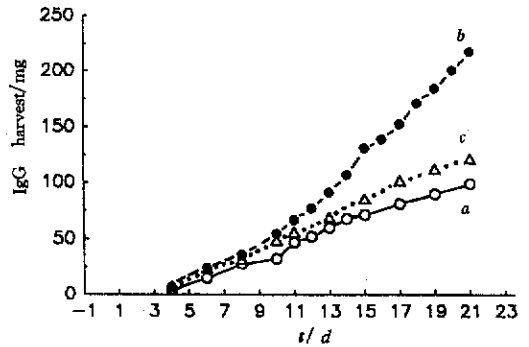


图 3 在不同搅拌瓶中 (a、b、c) 中收获单克隆抗体的比较

的 122mg, 而且由于每日更换新鲜培养基, 杂交瘤细胞在转动床载体搅拌器中处于良好的生长环境, 可以长期培养和连续收获单克隆抗体 (见图 2C 和图 3)。

转动床载体培养杂交瘤细胞设备简单, 仅在普通的搅拌培养瓶中安装一个可转动的不锈钢篮, 内装填 Fibracel[®]载体, 按常规在 CO₂ 孵箱中培养, 就可以使杂交瘤细胞固滞为载体中, 并由于提高了溶氧水平, 增加了细胞浓度, 从而使收获的抗体量较悬浮培养提高一倍左右。而且, Fibracel[®]载体也适合于生长贴壁依赖的动物细胞, 象正常或重组的 CHO 细胞, 人和鼠纤维母细胞以及昆虫细胞等^[6,7]。显然, 转动床载体搅拌培养瓶是一个很适用于普通实验室培养各种细胞的工具。

参 考 文 献

- [1] Hepkinson J. *Bio/Technology*, 1985, 3: 225~230.
- [2] Martin N, Brennan A, Denomme L. *Bio/Technology*, 1987, 5: 838~843.
- [3] Wang G Z, Jacklin C, Freedman D *et al.* *Cytotechnology*, 1992, 9: 41~49.
- [4] 陈贻错. *生物工程学报*, 1992, 8 (3): 243~249.
- [5] Velez D, Reuveny S, Miller L. *Immunol Methods*, 1986, 86: 45~52.
- [6] White M D, Reuveny S, Shaffeman A. In: *Biological from Recombinant Microorganisms and Animal celes Production and Recovery*, VCH, Weinheim/Deerfield Beach and Balban Rehovot/philadelphia, 1990, pp. 69~79.
- [7] Kompier R, Kislev N, Segal I *et al.* *Enzyme Microb Technol*, 1991, 13: 822~827.

Simple Spinner Bottle with Rotating Basket Packed by Carriers for Hybridoma Cell Culture

Chen Yikai

(Laboratory of Genetic Engineering, Fujian Medical College, Fuzhou 350004)

Wang Guozheng Zhang Wenyong David Freedman

(New Brunswick Scientific Co. Edison, N. J. 8818-4005 USA)

Abstract r-69B is a mouse-mouse hybridoma cell, producing monoclonal antibody IgG against human r-IFN. It was cultured in 1.0L spinner bottle which was assembled rotating basket packed by 8.0g Fibra-Cel[®] carriers for 21 days, The agitation was 100r/min. In the bottle the cell concentration and MAb was about one time more than suspension culture. The spinner bottle was assembled simply and used in general laboratory. Also it could be used for different cells, including anchorage dependent and independent cells.

Key words Cell culture, hybridoma cell, carrier