

## 昆虫细胞 (Sf9) 培养中葡萄糖、乳酸的影响

徐殿胜 陈国豪 陆兵 俞俊棠

(华东理工大学生化工程系 上海 200237)

昆虫细胞培养已经在小儿灰髓炎、乙肝表面抗原等研究中得到系统应用,此外,许多高值的治疗性蛋白药物,如 tPA、白细胞介素-2、 $\beta$ -干扰素和促红细胞生成素等的研究过程中昆虫细胞及杆状病毒的培养已成为新的生物工程手段<sup>[1]</sup>。在美国、荷兰等国已成功得到了外源基因大量表达的药物<sup>[2]</sup>。在我国也已成功构建了人- $\alpha$ 干扰素的昆虫细胞/杆状病毒表达系统<sup>[3]</sup>。同时昆虫杆状病毒本身可以制备成各种专一性较强的广谱、无公害、无毒性的农用杀虫剂<sup>[4]</sup>。但是昆虫细胞及其杆状病毒的大规模培养对环境有许多特殊要求,如培养温度低于哺乳动物细胞,需氧量高于动物细胞,pH 偏低培养基价格较贵,对剪切力敏感,杆状病毒又导致细胞发生病变,因此有一个最佳控制时间。草地贪夜蛾细胞 (Sf9) 为目前国际上通用的宿主细胞,本文主要利用 Sf9 细胞研究葡萄糖浓度、乳酸浓度对细胞生长的影响。为 Sf9 细胞的优化控制建立动力学基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 细胞株及材料

1.1.1 细胞株:草地贪夜蛾细胞 (Sf9),由华中师范大学昆虫所提供。

1.1.2 培养基:TC100 (GIBCO) 使用时加入 10% 胎牛血清 (GIBCO),加入双抗 (青霉素/链霉素) 各 100 $\mu$ /ml。

#### 1.2 分析方法

1.2.1 细胞计数:血球计数板活细胞计数重复 3 次,取平均值。

1.2.2 葡萄糖分析:葡萄糖浓度采用葡萄糖测定试剂盒 (上海生物制品研究所生产)。

1.2.3 乳酸分析:乳酸脱氢酶 (Sigma) 法<sup>[5]</sup>。

#### 1.3 实验方法

1.3.1 培养条件:pH 为 6.5~6.8,温度为 27 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C。

1.3.2 培养方法:细胞接种量:2.0 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml,取处于对数生长期的 Sf9 细胞作种子,加入新鲜培养基 10ml 于方瓶中,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每隔 24h 取样观察细胞生长,分析细胞数,葡萄糖及乳酸浓度。向培养基中加入预先灭好菌的葡萄糖,使其最终葡萄糖浓度分别为起始值的 2, 3, 4, 5 倍,取样观察分析。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 细胞生长

取处于对数生长期的细胞作种子进行培养,细胞生长曲线如图 1 所示。Sf9 细胞生长分为三个阶段:(1) 延滞期:镜检发现,细胞为游离状态。细胞形态为圆球形,然后过渡到贴壁状态,细胞成梭状,进入生长期。另外,由于细胞传递过程中吹打损伤及对新环境需要一个适应,可能正是出现延滞期的主要原因之一。(2) 对数生长期:由实验数据得出 Sf9 细胞生长的倍增时间为 28h 左右。但是整个培养过程为一个非恒化过程随着时间的增加,细胞的营养物质浓度不断降低代谢产物不断积累,倍增时间增加,生长速度降低,直至达到最高浓度 23 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml。(3) 衰退期:生存环境已不利于细胞生长及维持,细胞

出现死亡，此时期即必需更换培养基。

从图 1 看出，随着细胞生长，葡萄糖及乳酸浓度不断下降，但总起来，葡萄糖浓度下降较为缓慢，而且当细胞浓度达到最大值时，残留葡萄糖浓度仍较高。通常，乳酸影响细胞生长，但培养基中并无乳酸成分，加入胎牛血清后可以分析出乳酸成分，因此其中必有乳酸类似物或结合物。乳酸(乳酸类似物或结合物)在细胞生长后即下降，当细胞浓度达到最大值时，残留浓度已降到最低值，即使细胞进入死亡期，其浓度基本维持不变。因此可以认为在胎牛血清中含有的乳酸类似物或结合物是 Sf9 细胞生长所必需的，且对细胞生长影响较大。

### 2.2 葡萄糖消耗及葡萄糖浓度对细胞生长影响

结果表明随着初始葡萄糖浓度的增加，葡萄糖的消耗并没有增加，其消耗速率基本相同，且培养结束时，葡萄糖的残留浓度仍较高。当初始葡萄糖浓度超过 100mg/L 时，有 50% 以上葡萄糖没有被利用。而对应于细胞密度最高的培养 96h，葡萄糖的利用率则相对更低。细胞生长结果如图 2 所示，随着葡萄糖浓度的升高，在细胞生长前期，葡萄糖浓度并无明显影响。但当浓度超过 2000mg/L 时，在细胞生长后期，会明显影响细胞生长，初始浓度愈高，细胞可达到的最高密度愈低。可能是由于葡萄糖代谢产生的产物构成的影响，或者在代谢产物较多时，葡萄糖浓度时对细胞生长不利。当浓度超过 2000mg/L 时，不利于细胞生长，同哺乳动物细胞有所不同。

### 2.3 乳酸浓度变化

分析昆虫细胞培养基，发现 TC-100 培养基主要是葡萄糖，胰蛋白，氨基酸、维生素，培养时添加牛血清；Sf9 无血清培养基除了胰蛋白外，补加微量元素，其配方中蛋白质含量较低。通常葡萄糖同时参与 TCA 循环代谢及酵解生成乳酸途径，随着细胞生长，乳酸浓度不段升高，即培养基中有部分葡萄糖转化为乳酸。但是，在实验中却产生了一个特殊结果如图 3 所示。在 TC-100 培养基中添加 10% 胎牛血清，培养 Sf9 细胞，发现没有乳酸生成。起始乳酸浓度 0.27mg/ml 96h 后几乎为零，且细胞密度达到最高值。不论添加葡萄糖浓度为多少，而整个培养过程中乳酸浓度的变化几乎相同，并不随着消耗的葡萄糖量而变化。因此所消耗的葡萄糖没有转化为乳酸，即所消耗的葡萄糖全部进入 TCA 循环或有利于合成细胞成分的代谢途径。

致 谢 本工作得到中国科学院上海生物化学研究所吴祥甫教授的指导及帮助。

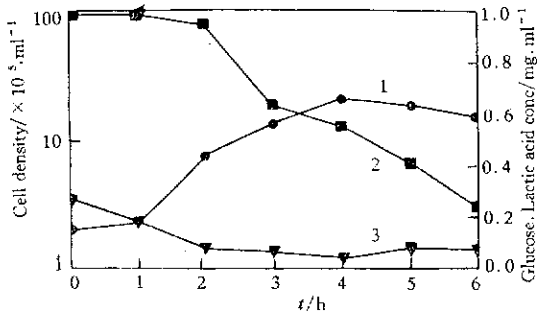


图 1 细胞生长及葡萄糖、乳酸代谢

Fig 1 Cell growth and metabolism of glucose and lactic acid

1. 细胞密度; 2. 葡萄糖浓度; 3. 乳酸浓度

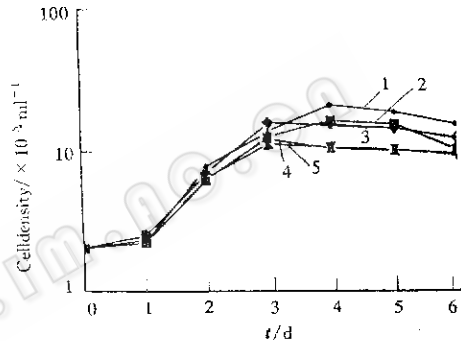


图 2 添加葡萄糖浓度对细胞生长影响

Fig 2 Effects of glucose concentration on cell growth  
葡萄糖浓度 (mg · ml<sup>-1</sup>: 1. 1, 2, 3. 3, 4. 4, 5. 5

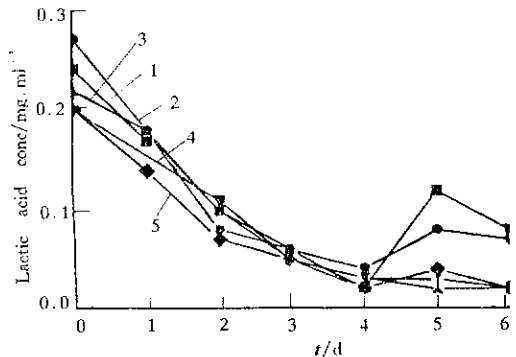


图 3 乳酸浓度变化

Fig 3 Concentration of lactic acid

图例同图 2

## 参 考 文 献

- (1) Wu J. King G. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1989, **32**: 249~25.
- (2) Smith G E, Summers M D. *Mol Cell Biol*, 1983, **3**: 2156~2165.
- (3) 李亦平, 李敏荣, 吴祥甫等. *生物化学与生物物理学报*, 1990, **22** (6): 563~569.
- (4) Iain R. Cameron *Trends in Biotechnology*, 1989, **7**: 66~70.
- (5) 董树坤, 陈因良, 顾小华等. *生物工程学报*, 1992, **8** (4): 389~393.

## Effects of Glucose and Lactic Acid on Insect Cell (Sf9) Culture

Xu Diansheng Chen Guohao Lu Bing Yu Juntang

(*Department of Biochemical Engineering East China University of Science & Technology, Shanghai 200237*)

**Abstract** Studied on the effects of the concentration of glucose and lactic acid on the cells growth in an insect cell (Sf9) culture. Adding different concentration of glucose to the medium TC-100, it has been determined that high glucose concentration (over than 2200mg/L) restrains cell growth. Analysing the concentration of lactic acid, it is shown that following culture time the concentration of lactic acid is decreased in the medium with FCS and increased in the serum-free medium. When the cell density is reached the maximum value, the concentration of lactic acid is to be decreased the minimum value. During the process of cell growth, the glucose is not transformed to lactic acid, it enters TCA cycle or other metabolism paths. Cell culture conditions are temperature 27C, pH6.2~6.8 and cell inoculation density  $2.0 \times 10^5$ /ml. While culture time is 96 hours, the maximum cell density,  $2.3 \times 10^6$ /ml, can be obtained.

**Key words** Insect cell (Sf9) culture, glucose, lactic acid, metabolism