

产 HBsAg CHO 细胞无血清培养研究

刘文献 贾 茜 谭丽霞

(华北制药集团新药研究开发中心 石家庄 050015)

摘要 在分析 CHO-C₂₈ 细胞对培养基中氨基酸利用的基础上,对 DMEM 培养基进行初步优化。再采用统计学正交分析方法,在初步优化的 DMEM 培养基中添加胰岛素、转铁蛋白等促细胞生长因子,建立了一种适于 CHO-C₂₈ 细胞持续用无血清培养基——CHO-C₂₈-SFM。经转瓶维持实验,在 CHO-C₂₈-SFM 中维持培养的细胞,其乙型肝炎表面抗原(HBsAg)表达水平达到用含 5% FBS 培养液维持的 70%~80%,但纯化收率提高 10%以上,可用于大规模生产。

关键词 无血清培养基 中华仓鼠卵巢细胞(CHO) 乙型肝炎表面抗原

动物细胞的体外培养多采用含血清的培养基,但存在成本高、成分不明确、不易纯化、对细胞具有潜在毒性等缺点。无血清培养基则可以是完全采用已知分子结构和构型组分的低蛋白或无蛋白培养基,成分明确、质量一致,有利于提高细胞产品生产的稳定性并使细胞产品易于纯化,因而成为当今生物科学领域研究中的重要课题之一。本文介绍一种适于产乙型肝炎表面抗原的 CHO-C₂₈ 细胞用无血清培养基。

1 材料和方法

1.1 细胞

C₂₈ 细胞,基因工程重组 CHO 细胞,可高效表达乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg),由中国预防医学科学院病毒学研究所提供。

1.2 细胞培养

常规培养液为基础培养液添加 10% 胎牛血清,pH7.0~7.2,细胞培养瓶或 24、96 孔塑料板均置于 5% CO₂ 孵箱,(37 ± 0.5) °C 培养。每次接种活细胞率 95% 以上。

1.3 培养基及其添加物

DMEM、Ham's F12、FBS 为 Hyclone 产品胰岛素、氢化可的松、转铁蛋白、乙醇胺、丁酸钠、V_E 等均购自 Sigma 公司,BSA、谷氨酰胺、碳酸氢钠、氨基酸等为国产,微量元素混合液为自制。

1.4 培养基的初步优化

用磺基水杨酸法处理细胞培养前后的 DMEM 样品,然后用日立 835 型氨基酸自动分析仪分析 C₂₈ 细胞对氨基酸的利用情况,根据分析结果调整培养基配方。

1.5 适于 C₂₈ 细胞维持的 SFM 添加成分初步确定

采用 L₃₂(4⁹) 正交模式,以经初步优化不含 FBS 的 DMEM 为基础培养基,以细胞的生长状态、增殖效果和表达水平为评价指标,分析胰岛素、氢化可的松、转铁蛋白、乙醇胺、BSA 等 9 种成分对 C₂₈ 细胞生长和维持的影响,初步确定有关成分的最佳浓度水平。

主要添加成分浓度为:

添加成分	浓度	添加成分	浓度
胰岛素	1~10μg/ml	维生素 C	5~15μg/ml
BSA	0.5~5mg/ml	氢化可的松	10 ⁻⁴ ~10 ⁻⁸ M
转铁蛋白	1~10μg/ml	乙醇胺	10 ⁻³ ~10 ⁻⁸ M

1.6 延长细胞维持时间的实验设计

通过添加营养及抗氧化成分,抑制细胞的凋亡或死亡,延长维持时间。

1.7 转瓶维持实验

分别用自制 CHO-C₂₈-SFM 无血清培养基和含 5% NBS 的 DMEM 培养基在转瓶中进行平行对照维持实验。

1.8 细胞记数

在方瓶、24孔板中维持的细胞用台盼蓝染色法细胞计数板直接计数,96孔板中维持的细胞用MTT法计算。

1.9 HBsAg的测定

反向血凝法^[1]:上海实业科华生物技术有限公司产改良型冻干HBsAg诊断血球及稀释液。

2 结果

2.1 C₂₈细胞对DMEM中氨基酸的利用及初步优化

从细胞培养前后培养基添加氨基酸的分析结果(图1)看,C₂₈细胞对ASP、SER、GLU和TYR需求量较大,培养基中上述四种氨基酸的含量相对不足,予以适量补充。细胞生长过程中可能会产生大量ALA、GLY及少量THR、HIS,目前无法确定是否细胞代谢产生。而对CYS利用较少,予

以适量减少。

2.2 适于C₂₈细胞维持的SFM添加成分初步确定

从L₃₂(4⁹)正交模式结果分析,在不含FBS的初步优化的DMEM中,加入胰岛素1~10μg/ml、白蛋白0.2~2mg/ml、转铁蛋白2~10μg/ml对细胞生长有明显影响,氢化可的松等对其影响不明显,微量元素混合液、聚乙二醇对细胞的生长呈抑制作用而不加入,从而初步确定适于C₂₈细胞维持的无血清培养基(SFM)各添加成分及其浓度配比。用其与3%FBS的培养液进行维持对照实验,用SFM维持时间明显比用含3%FBS的培养液维持的短,仅一周时间,前者维持的细胞状态也明显比后者差,且细胞脱落严重(见图2)。由图中可看出,用SFM维持的细胞大量缩圆、破碎。

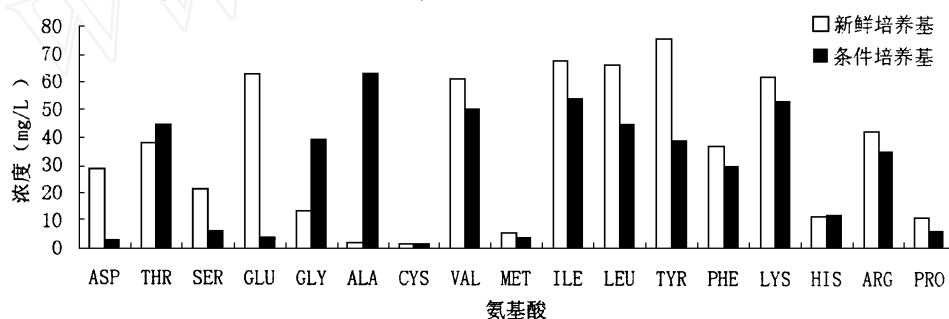


图1 C₂₈细胞对DMEM中氨基酸的利用

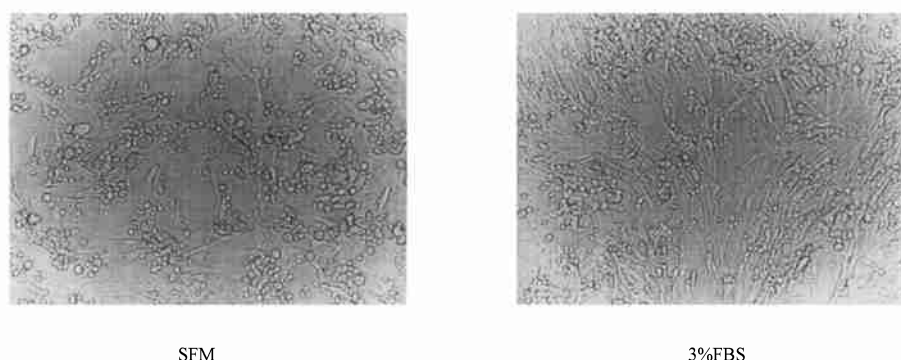


图2 C₂₈细胞在SFM和含3%FBS的培养液中维持第6天时的照片

2.3 有利于延长C₂₈细胞维持时间和提高表达的实验设计

针对细胞维持时间短的问题,在初步配方的

基础上,适量补充V_C、V_E等营养成分,并调整培养液适宜的PH和渗透压,细胞生长状态得到了很大改善,甚至优于含5%FBS的培养液维持的

细胞(见图3),细胞脱落状况也得到明显抑制,维持时间延长到25天左右,HBsAg表达水平也有较大提高(见图4),由图4中可看出,维持培养

时间延长近两周,抗原表达水平平均提高一倍左右。这样便得到了实用的无血清培养基——CHO-C₂₈-SFM。

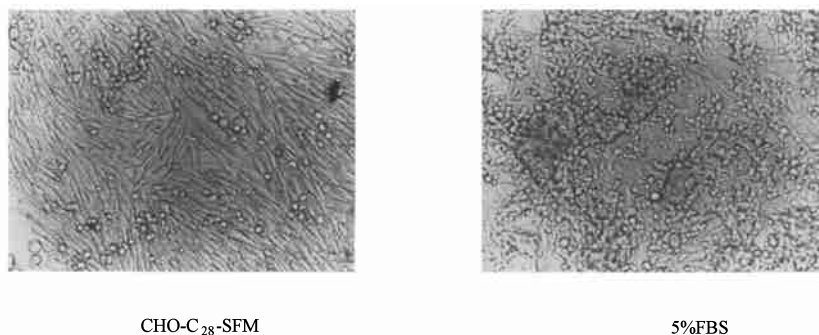


图3 C₂₈细胞在 CHO-C₂₈-SFM 和含 5 %FBS 的培养液中维持第 18 天时的照片

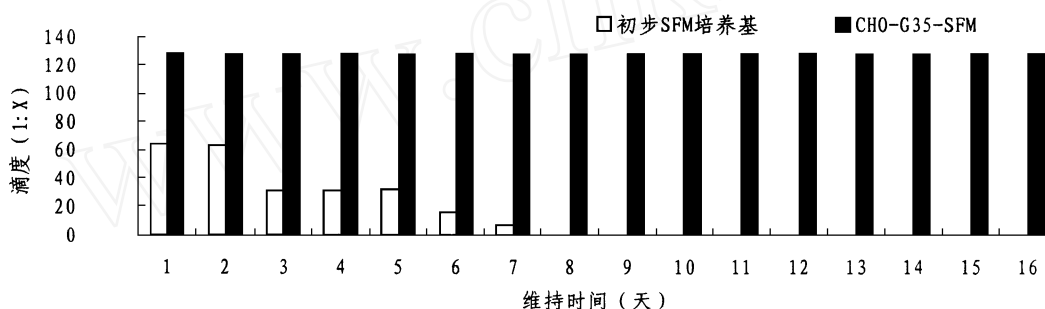


图4 几种培养基平行实验结果

2.4 转瓶维持实验

在2L的转瓶内,细胞接种密度 1.3×10^5 个细胞/ml,先用含10 %FBS的培养液培养,等长满单层后,分别换用CHO-C₂₈-SFM和含5 %FBS的培养液进行平行对照维持培养,加液量为每瓶150ml/d,隔天收换液,培养液残糖均控制在1.0g/L以上。共维持18天,CHO-C₂₈-SFM中HBsAg表达水平达到1.9mg/L,纯化收率较含5 %FBS的培养液提高10 %~15 %。

3 讨论

设计和应用无血清培养基,需要按一定的路线反复探索。本实验采用Sato和Barnes创立的合成路线^[2],通过采用统计学正交模式进行实验设计在基础培养基中添加不同组合的各种激素和生长因子、载体蛋白和生长基质成分,从而替代培养液中的血清,证明是一种高效而又省钱、省力的方法。

经统计学分析,证明胰岛素、转铁蛋白、白蛋白等在无血清培养基中起重要作用。胰岛素可促进RNA、蛋白和脂类合成^[3],抑制细胞凋亡,是重要的细胞存活因子^[4],JAN等认为在批式培养中胰岛素很快耗尽是细胞比生长速率下降的主要原因^[5],另外,据笔者观察,细胞形态趋于变圆,生长方式由贴壁生长亦趋于悬浮生长。转铁蛋白在SFM中也起重要的作用,大多数动物细胞上存在特定的转铁蛋白受体,受体与转铁蛋白/Fe³⁺复合物的结合是细胞获得必须的微量元素铁的主要来源,此外,转铁蛋白还具有生长因子的性质并能与其他微量元素如钒等结合的作用^[6],据Chang等人报告,在无血清培养液中必须有转铁蛋白至少5μg/ml,胰岛素才能起作用^[7]。微量元素硒参与谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化物歧化酶的作用过程,消除氧化物酶和氧自由基对细胞的伤害,它的最适浓度是30~60nmol/L,在高浓度时刺激效应逐渐降低。白蛋

白是重要的脂肪酸载体(如提供油酸、亚油酸和花生四烯酸)和微量元素来源。大多数贴壁型细胞换用无血清培养液后,贴壁能力减弱,造成大量脱落,作者试图加入胶原蛋白、多聚赖氨酸等促贴壁成分,但作用不明显,如何避免或利用这种情况,需进一步研究。

在无血清培养基中维持培养的细胞,其抗原表达水平达到用含5%血清维持的70%左右,如何维持细胞较高的表达活力,尤其细胞培养后期,是个很有挑战性的课题。就培养液自身而言,有报道说在培养液高渗透压条件下,不仅可影响批次培养中抗体/抗原产量,而且影响细胞形态、细胞生长速度、对数生长期的长短和细胞死亡的速度。在大约400mOsm/kg的范围内,细胞虽然生长减慢,但特定抗体/抗原产生增多,细胞浓度增大导致最终高产品浓度^[8],看来调控培养液适宜的渗透压,具有重要的意义。另外加入丁酸钠可延长细胞的G₁期或迫使细胞处于G₀期而使较长时间地维持细胞高密度培养,高效地生产目的产物,但加入的量需要进一步探索,如加入过量,可能会抑制细胞生长甚至产生损害。

培养过程中,由于营养缺乏、代谢产物积累、

机械搅拌剪切力等原因,极易诱发细胞凋亡,从而大大缩短了细胞培养时间,降低反应器的生产能力和利用效率,故预防并控制细胞凋亡对延长细胞维持时间及提高表达水平具有重要意义。

参考文献

- [1] 刘玉斌,魏继同. 医用生物制品手册. 长春吉林科学技术出版社,1994,28~29
- [2] 薛庆善主编. 体外培养的原理与技术. 北京科学技术出版社,2001,162
- [3] Gassy MC, Tharakan JP, Chau PC. Serum-free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production. *Biotech & Bioeng*,1998,32:1015~1028
- [4] Chung JD, Sinskey AJ, Stephanopoulos G. Growth factor and bcl-2 mediated survival during abortive proliferation of hybridoma cell line. *Biotech & Bioeng*,1997,57(2):164~171
- [5] Jan L, Haggstrom L. Specific growth rate as a parameter for tracing growth-limiting substances in animal cell cultures. *J of Biotechnology*,1995,42:163~175
- [6] Jenkins N. In: Bulter M ed. *Mammalian Cell Biotechnology A practical approach*. Oxford, LRL Press,1991,27
- [7] Chang T H, et al. *PNAS*,1980,79:1158~1162
- [8] 林福玉,陈昭烈等. 大规模动物细胞培养的问题及对策. *生物技术通报*,1999,1:33

Study on the Serum-free Media for CHO-C₂₈ Cell

Liu Wenxian Jia Qian Tan Lixia

(R&D Center of North China Pharmaceutical Cooperation Shijiazhang 050015)

Abstract Based on the result of analysing the utility ratio of amino acid in DMEM for CHO-C₂₈ cell, DMEM was improved by adding the relevant amino acids. The optimized DMEM, by means of a statistical optimization approach, was supplemented with some cell growth factors, such as insulin, transferrin etc. Then we found a serum-free media for C₂₈ cell—CHO-C₂₈-SFM. The result of roll bottle experiments proved that the expression level of HBsAg in it was only about 70%~80% of that in DMEM supplemented with 5% FBS, but the downstream purification efficiency was increased by over 10 percent. So it can be used in large-scale cell culture.

Key words Serum-free media (SFM) Chinese hamster ovary cells (CHO) HBsAg