

昆虫细胞无血清培养基的研究进展

余泽华 刘冬连 陈曲侯

(华中师范大学昆虫学研究所)

自 Grace(1962)首次建立天蚕蛾(*Antheraea eucalypti*)的四个细胞系以来^[1],昆虫组织培养技术获得了极大的发展。离体培养的细胞为研究昆虫病原物,病原物的增殖,以及利用这些病原物作为杀虫剂提供了理想的体系。特别是近年来,人们已意识到化学农药作为杀虫剂对人类产生的有害影响;昆虫对农药的抗性渐增,使农药的发展与更新难以与之抗衡。因此,人们试图用生物杀虫剂取而代之。其中利用昆虫病毒防治害虫是生防中的重要方面之一^[2]。此外,自八十年代初以来,人们发现昆虫病毒,特别是杆状病毒,可作为携带外源基因的良好载体,利用其宿主细胞——昆虫细胞可大量表达具有医学、农业等重要价值的重组蛋白^[3]。由于这两方面的发展,人们试图通过大规模离体培养昆虫细胞来工业化生产病毒杀虫剂和表达外源基因。但是,由于目前昆虫细胞一般是在含有昂贵的哺乳动物血清的培养基中培养,成本高,限制了昆虫细胞大规模培养技术的发展。而且,以血清作为补加物,还存在许多难以克服的困难:如血清来源困难,质量不稳定,批量之间的差异大,重复性差;血清是支原体和其它异源病毒污染的重要来源;血清成分十分复杂,给基因工程表达产物的后处理带来困难,这是目前杆状病毒基因工程表达产物不能大规模开发和利用的重要原因之一。因此,发展更为精确和经济的培养体系是解决这些困难的关键。自七十年代以来,发展昆虫细胞无血清培养基一直是国内外许多细胞培养工作者研究的热点之一。

一、昆虫细胞无血清培养基的发展

昆虫细胞无血清培养基的研究始于六十年代末和七十年代初。要发展无血清培养基,必须寻找适当的具有类似于血清功能的因子,由于血清成分复杂,具有多种促细胞生长和增殖的因子,因此,可以想象,要找到血清替代物是相当困难的。一些蛋白质水解物(如:水解乳蛋白,酵母提取物等),微量元素,维生素;脂类物质等业已证明对支持昆虫细胞的生长,增殖是有用的^[4-9]。目前,商品化的昆虫细胞无血清培养基不断问世,如 SF-90, EX-CELL-400, ISFM 等,这大大促进了昆虫细胞培养技术的发展,丰富了组织培养的内容,对积极开发昆虫细胞这一资源奠定了基础。根据无血清培养基的组成,可将其分两大类。

1. 化学成分十分明确的无血清培养基。

Iandureau 等(1976)最早报道了这类培养基^[10],而较为重要的是 Wilkie 等(1980)设计的一种化学成分十分明确的无血清培养基^[6],它不仅可支持多种昆虫细胞的生长,也能支持病毒在无血清培养物中复制。该培养基以 BML/10 为基础,适当增加维生素和部分氨基酸的量,补加了微量元素和脂类复合物等。由于这种培养基不含蛋白质,化学成分完全明确,因此,可能对研究细胞的代谢,细胞间的通讯,以及对重组蛋白的分离纯化等十分有用。

2. 化学成分半明确的无血清培养基。发展无血清培养基的根本目的是降低成本,在化学成分明确的培养基中,由于补加成分较多,成本相对要高许多,因此,寻找来源广泛,成本低的替代物是降低培养基成本的关键。近年来,许多成分半明确的培养基不断出现。

(1) 以蛋白胨为主要补加物的无血清培养基^[4,7]。可用作补加物的蛋白胨很多,但水解乳蛋白,酵母提取物是最常用的补加物。这两种物质来源广,价格便宜,且含丰富的细胞代谢和生长所需要的氨基酸,维生素,DNA 前体物等。

(2) 以蛋黄提取物为主要补加物的无血清培养基。^[5,7,11]以鸡蛋卵黄提取物替代血清较上述两种培养基更为经济和实用。蛋黄中含有大量的胆固醇和白蛋白,而这两种成分也是血清的主要成分之一。此外,蛋黄中还可能含有激素,生长因子。维生素,微量元素等^[4],这也可能是单独加入胆固醇和/或白蛋白的效果不及加入蛋黄提取物好的原因。

二、无血清培养基中主要补加物的功能

迄今为止,人们已发现许多因子单独或一起使用可替代血清。许多研究表明,不同来源的细胞其营养需求有差别^[12]。即使,为某种细胞设计的培养基其补加成分也不尽相同,但对于大多数细胞系(株)而言,主要补加物有以下几种。

1. 微量元素(Trace element, TE)。TE 是细胞代谢必需的,是无血清培养基中的主要补加物之一。对于昆虫细胞,微量元素主要包括 Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} 等。TE 能促进细胞贴附和增加细胞的终产量^[13]。此外,有些微量元素,如 Al^{3+} , 还可促进病毒在无血清培养物中增殖。在有血清培养基中,这些微量元素主要由血清提供。

2. 水解乳蛋白(Lactalbumin hydrolysate, LH)和酵母提取物(Yeast extract, YE), LH 是不定成分氨基酸的主要来源,主要含有 β -乳球蛋白, α -乳白蛋白,血清蛋白等。在这些蛋白质中,含有 11 种必需氨基酸和 7 种非必需氨基酸^[14]。Nagasawa 等(1987)对 LH 中的促生长因子作了详细的研究,认为 LH 中含有两种促细胞生长因子, Fraction I 和 Fraction II, Fraction I 的分子量约 4000~40000,而 Fraction II 的分子量较小^[15]。LH 在 0.3~0.5% 内对细胞生长有明显的刺激作用,而当其浓度低于

0.05% 时几乎不能促进细胞增殖^[15]。YE 则是维生素和嘌呤碱基的主要来源。据 Wyss (1977)报道, YE 中还含有一种对热稳定,对果蝇细胞增殖是必需的高分子量因子^[16]。一般认为, YE 的极限浓度是 0.5%, 当其浓度大于 0.5% 时,会明显地抑制细胞生长^[6]。

3. 维生素(Vitamin)尽管在基础培养基中一般已含有维生素,但许多研究者在研究无血清培养基时仍常常增加维生素的量^[4-8]。维生素对促进细胞生长,增加细胞密度,促进细胞贴附都有作用。不同来源的细胞系(株)对维生素的需求有异,但一般认为,泛酸,异己醇,叶酸,核黄素等对细胞的存活是有利的,而胆碱,吡哆醇,硫胺素,尼克酰胺等可促进细胞增殖^[12,17]。

4. 甘油(Glycerol)和 α -磷酸甘油(α -glycerophosphate, α -GP)在昆虫细胞无血清培养基中,有关应用甘油和 α -GP 作为补加物的报道较少,但我们的结果表明,甘油对无血清培养基中的细胞的膜有保护作用,且可弥补因缺失血清而降低的渗透压^[7]。据 Goodwin 等的研究,无血清培养基中的缺失甘油,细胞很快死亡,加入甘油还能明显增加细胞的产量。甘油的最适浓度为 2g/L, 当为 3g/L 或 1g/L 时,细胞量显著降低。 α -GP 则对病毒在无血清培养物中的增殖是有用的,在加有 α -GP 的培养基中,多角体形成的时间明显缩短,并且多角体内的病毒粒子数要多一些^[4]。

5. 脂类(Lipid), 一般情况下,培养基中不直接加入脂类,而由血清提供。无血清培养基中因无脂类物质供应,许多研究者加入脂类复合物代替游离的脂肪酸^[4,6,7,22]。脂类是细胞膜的主要成分,加入脂类物质可促进细胞增殖。

与哺乳动物细胞无血清培养基相比,昆虫细胞无血清培养基发展较晚。除上述主要补加物外,尚有许多因子是否对昆虫细胞生长,增殖有作用还有待于进一步的研究。如:许多对哺乳动物细胞生长有促进作用的因子(包括转铁蛋白,激素,一些生长因子,如表皮生长因子等)是否也对昆虫细胞的生长有促进作用? 目前有

关报道甚少。

三、结束语

补加血清的培养基可支持许多细胞的生长。但迄今为止,无血清培养基只能支持某一种或少数几种细胞的生长,并且,细胞对无血清培养基有一个较长的适应期,较有血清培养基中的细胞,无血清培养基中的细胞其膜易碎。这些结果揭示,所加因子并不能完全替代血清中有用因子,这给无血清培养基的研究和应用带来局限性。因此,更加广泛寻找能促进细胞生长,增殖,消除或缩短细胞对无血清培养基的适应期,以及保护膜的因素是发展无血清培养基的关键。

发展无血清培养基重要目的之一是降低成本,使得大规模培养细胞成为可能。因此,充分利用取材广泛,价格低廉的材料作为补加物会更加引起人们的关注。令人注目的是,Mitsushashi(1987)曾用海水替代培养基中的无机盐,用食糖代替葡萄糖,补加水解乳蛋白和酵母提取物等研制了一种无血清培养基,大大降低了成本^[18]。

前已述及,昆虫细胞无血清培养基的发展还不十分完善,但其发展前景毋庸置疑。无血清培养基大大降低成本,减少了异源物污染的可能性,对研究细胞的生理,代谢,细胞间的通讯等将是有益的体系。更为重要的是,目前已有许多研究表明,无血清培养物可用来大量生产病毒和表达重组蛋白^[19-22]。这些成果表明无血清培养基具有十分广阔的应用前景。

参考文献

1. Grace, T. D. C. Nature 195:788-789, 1962

2. 梁东瑞:杀虫微生物(第三卷),华中师范大学出版社,武汉,40-45,1989
3. Luckow, V. A. et al. Bio/Technol. 6:47-55, 1988
4. Goodwin, R. H. et al. Invertebrate systems in vitro (Kurstak, E. et al. eds.) Elsevier and North-Holland Biomedical Press, 1980
5. Lery, X. et al. J. Invertebrate Pathology, 55: 342-349, 1990
6. Wilkie, G. E. I. et al. Develop. Biol. Standard 46: 29-37, 1980
7. 余泽华等,待发表资料
8. 陈曲侯等,中国细胞生物学学会第五次会议论文摘要,杭州,243-244,1992
9. Goodwin, R. H. In Vitro 12: 303-304 (Abstract 63), 1976
10. Landureau, J. C. Invertebrate tissue culture (Kurstak, E. et al. eds.) Academic Press, 101-130, 1976
11. Roder, A. Naturwissenschaften 69:93-98, 1982
12. Hink, W. F. et al. Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology (Kerkut, G. A. et al. eds.) Pergamon Press. 574-570, 1981
13. Weiss, S. A. et al. In Vitro 16:222-223, 1980a
14. 杜平著:医用实验病毒学,人民军医出版社,北京,97-98,1985
15. Nogasawa, H. et al. Invertebrate and fish tissue culture (Kuroda, Y. et al. eds.) Japan Scientific Societies Press. 29-32, 1987
16. Wyss, C. J. Insect Physiol. 23:739-747, 1977
17. Becker, J. et al. In Vitro 17:471-479, 1981
18. Mitsushashi, J. Invertebrate and fish tissue culture (Kuroda, Y. et al. eds.) Japan Scientific Societies Press. 15-18, 1987
19. Chen, Q. et al. J. Invertebr. Pathol. 62:216-219, 1993
20. Zhang, J. et al. Biotechnology and Bioengineering 40: 1165-1172, 1992
21. Wang, P. et al. J. Invertebr. Pathol. 59:46-53, 1992
22. Maiorella, B. et al. Bio/Technol. 6:1406-1410, 1988

ADVANCES IN SERUM-FREE MEDIA FOR INSECT CELL CULTURE

Yu Zehua Liu Donglian Chen Quhou

Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430070

Generally, media for culturing insect cells contain 10% bovine serum. However, the (转 44 页)

生物培养中的普遍问题,因此对其它微生物培养过程或代谢过程同样具有十分有益的借鉴意义。

参考文献

1. 邬显章:生物工程进展,9(4):10—18('89)
2. 章克昌:应用微生物, No. 5:12-15('87)
3. 焦瑞身:工业微生物, No. 2:18-33('88)
4. A. Ramalingham et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 583-589 ('77)
5. G. R. Cysewski et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 1125('77)
6. T. K. Ghose et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 377-381('84)
7. M. Minier et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 24: 1565('82)
8. M. Matsumura et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 371-377('84)
9. M. Matsumura et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 28: 534-541 ('86)
10. R. P. de Filippi: *Chem. Ind.*, 12: 385('82)
11. G. J. Arcay-Ledezma: *J. Inst. Brew.*, 9: 81('84)
12. I. S. Chung and Y. Y. Lee: *Enzyme Microbiol. Technol.*, 7: 217—219('85)
13. P. J. Slininger: *Biotechnol. Bioeng.*, 24: 371('82)
14. R. W. Lencki et al. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 13: 617-628('83)
15. P. K. Walsh et al. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 13: 629-647('83)
16. 岑沛霖等:化学反应工程与工艺, 4(1): 30—35('88)
17. C. B. Pham et al. *J. Ferment. Bioeng.*, 68(1): 25-31('89)
18. Y. Shabtai et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 38: 869-876('91)
19. H. Gregor et al. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 326: 273('79)
20. K. H. Kyung et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 252-256('84)

(接 47 页)

high cost, non-reproductivity due to lot-to-lot variation, undefined composition and increased contamination risk from mycoplasmas and other adventitious viruses limited to the development of insect cell culture in large-scale. Since 1970's, many cell culture researchers from all over the world have showed much interest in design of serum-free media for insect cells. This paper gave a brief introduction to the advances in serum-free media for insect cell culture and the functions of the supplements it used. The trend of making serum-free media for insect cells was also discussed.