

昆虫细胞 Sf9 在四种生物反应器中的培养

谢秋玲¹, 郑云程¹, 廖美德²

(1. 暨南大学生物工程研究所, 广东 广州 510632;

2. 华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东 广州 510642)

[摘要] 昆虫细胞表达系统已广泛的应用于表达各种重组蛋白,研究昆虫细胞 Sf9 分别在4种生物反应器:转瓶、摇瓶、Bellocell反应器、发酵罐中进行悬浮培养.转瓶、摇瓶、Bellocell和发酵罐的细胞接种密度都是 $5 \times 10^5/\text{mL}$.对细胞数量、葡萄糖浓度以及主要代谢产物乳酸、氨的浓度进行检测.昆虫细胞经转瓶和摇瓶培养,细胞密度达到最高分别为: 5.5×10^6 、 $7.3 \times 10^6/\text{mL}$,是起始密度的11倍和14.6倍.昆虫细胞经Bellocell和发酵罐培养,细胞密度达到最高分别为: 8.01×10^6 、 $1.52 \times 10^7/\text{mL}$,是起始密度的16.02倍和30.4倍.昆虫细胞经四种生物反应器中的悬浮培养之后,都达到了很高的密度,尤其是经发酵罐培养达到如此高密度,为高效大规模表达药物蛋白,奠定重要的基础.

[关键词] 昆虫细胞 Sf9; 转瓶; 摇瓶; Bellocell反应器; 发酵罐

[中图分类号] Q813.1+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)01-0096-05

Culture of insect cell Sf9 in four different kinds of bioreactor

XIE Qiu-ling¹, ZHENG Yun-cheng¹, LIAO Mei-de²

(1. Institute of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Key Laboratory of Pesticide & Chemical Biology Ministry of Education South China
Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

[Abstract] The insect cell baculovirus system has been increasingly used for the expression of a wide range of recombinant proteins. In this study, insect cell Sf9 were cultured in four kinds of bioreactor: spinner-flask, shake-flask, Bellocell and fermentation. Spinner-flask, shake-flask, Bellocell and fermentation were inoculated with $5 \times 10^5/\text{mL}$. Glucose, ammonia and lactate in the culture supernatant were measured. Cell density reached a maximum number of $5.5 \times 10^6/\text{mL}$ and $7.3 \times 10^6/\text{mL}$ when Sf9 were cultured in spinner-flask and shake-flask, which were 11 times and 14.6 times than the initial cell density. Cell density reached a maximum number of $8.01 \times 10^6/\text{mL}$ and $1.52 \times 10^7/\text{mL}$ when Sf9 were cultured in Bellocell and fermentor, which were 16.02 times and 30.4 times than the initial cell density. Insect cell Sf9 can be cultured in four different bioreactors for adherent culture and suspension culture with high cell density, especially in fermentor, and it makes Sf9 cells the suitable cells for generating recombinant protein in large scale.

[Key words] insect cell Sf9; spinner-flask; shake-flask; Bellocell; fermentation

[收稿日期] 2008-11-03

[基金项目] 粤港关键领域重点突出项目(200749841104);广东省科技计划项目(20088030301349).

[作者简介] 谢秋玲(1968-),女,副研究员,博士,研究方向:基因工程制药. E-mail: txql@jnu.edu.cn

杆状病毒/昆虫细胞表达系统越来越多地应用于表达生产抗体、受体、疫苗以及重组药物蛋白等药用蛋白方面。与原核表达系统相比,杆状病毒/昆虫细胞表达系统具有翻译后修饰的能力,而与哺乳动物细胞表达系统相比,杆状病毒/昆虫细胞表达系统表达效率高;昆虫细胞更易于培养,能适应于贴壁培养及悬浮培养;在细胞大规模培养上,表现为良好的耐剪切力和对 PH 变化的适应^[1-4]。由于杆状病毒感染昆虫细胞会引起昆虫细胞的裂解,因此昆虫细胞的培养是十分重要的,是重组蛋白获得高产量的重要条件^[5]。

昆虫细胞(草地夜蛾卵巢细胞) *Spodoptera frugiperda* (Sf9) 是常用来表达重组蛋白的细胞系,它既可以贴壁培养也可以悬浮培养,并可以在无血清培养基中生长良好,因此是大规模培养生产,重组蛋白的常用细胞系。Sf9 细胞可以在用于贴壁培养的培养瓶、滚瓶(Roller)等贴壁培养反应器中生长,也可以在摇瓶、转瓶(转瓶)等细胞悬浮培养反应器中生长,还可以在搅拌式、气升式以及潮汐式生物反应器中进行大规模生产^[6]。

本研究采用4种细胞悬浮培养生物反应器:摇瓶、转瓶(Spinner)、一种小型潮汐式反应器 Bellocell 以及搅拌式发酵罐。因为昆虫细胞比哺乳动物细胞耐剪切力,并且培养过程中不需要 CO₂,因此可以使用细菌培养所用的摇床,但旋转速度远远低于细菌培养;转瓶是一种带有磁力搅拌的培养装置,广泛应用于哺乳动物细胞的悬浮培养;Bellocell 是一种新型的潮汐式的生物反应器,Bellocell 包括上室和下室,上室顶盖是可以通气的空气过滤膜,上室的底部是细胞载体可以吸附各种动物细胞,下室是伸缩室包含培养基,当下室压缩时,载体和细胞被浸没在培养基中而吸取营养,下室伸展时细胞暴露于空气获得氧气^[7-8];用于细胞培养的搅拌式发酵罐配有4气混合器和无泡通气装置,现已应用于 CHO 细胞等动物细胞的培养。研究在以上4种反应器细胞悬浮培养状况及细胞所达到培养密度,为昆虫细胞的大规模培养以及昆虫细胞表达重组药物蛋白的研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

(1)细胞株 瑞典 Karolinska Institutet 曹义海

教授赠送昆虫细胞 Sf9 细胞。

(2)培养基及试剂 无血清培养基 SF900II、新生牛血清均为 Gibco 公司产品,硫酸庆大霉素注射液,肝素购自 BBI 公司,HCl 和 NaOH 均为分析纯,Bis-Tris 为 Amersco 公司产品,葡萄糖、氨和乳酸检测试剂盒购自南京建成生物研究所。

(3)实验仪器 3L 玻璃发酵罐购自 BIO-TOP 公司,Bellocell 为 CESCO Bioengineering 公司产品,转瓶购自 Wheaton 公司,酶标仪购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

(1)工作原理 转瓶和潮汐式反应器 Bellocell 工作原理图见图1。



图1 转瓶和潮汐式反应器 Bellocell 工作原理图

(2)昆虫细胞 Sf9 的悬浮培养 昆虫细胞 Sf9 在转瓶和摇瓶进行悬浮培养,在 T-75 的培养瓶中贴壁培养的 Sf9 细胞,将其悬浮并计数;转瓶培养时,转瓶培养体积为 50 mL,加入细胞悬浮液最终转瓶的细胞密度是 5×10^5 /mL,连续培养 7 d。摇瓶培养时,摇瓶培养体积为 25 mL,加入细胞悬浮液使最终摇瓶的细胞浓度是 5×10^5 /mL,把摇瓶放入 27 °C 的摇床中,连续培养 7 d。

Bellocell 反应器的工作体积是 500 mL, Sf9 细胞经转瓶培养后离心,用 SF900II 培养基重悬浮,计数后再加入培养基使细胞密度为 5×10^6 /mL,然后加入 450 mL 培养基到室,再加入配好的 50 mL 细胞液(2.5×10^8 个细胞),细胞密度相当于 5×10^5 /mL。每 24 h 检测 pH 变化,并用 1 mol/L 的 Bis-Tris 调 pH 到 6.5^[9]。

在 3 L 的搅拌式发酵罐上进行 Sf9 细胞放大培养,培养体积为 1.5 L, Sf9 细胞经转瓶培养后离心,用培养基重悬浮,加入配好的细胞液最终细胞密度为 5×10^5 /mL。用 HCl 和 NaOH 来调节 pH 值,直接用空气来供氧。初始各种参数的设置:溶氧为 50%、温度 27.5 °C、pH 值 6.5、转速 100 r/min、气流速 2 L/min,连续培养 10 d。

(3)细胞培养过程参数检测分析方法 细胞用

细胞计数板来计数,细胞经台盼兰染色来测定细胞活率.葡萄糖、氨和乳酸浓度的测定使用葡萄糖、氨及乳酸检测试剂盒,按照试剂盒操作手册在酶标仪(Bio-Rad)上进行检测.

2 结果

2.1 转瓶中 Sf9 细胞的悬浮培养

转瓶起始接种细胞密度是 $5 \times 10^5/\text{mL}$,经过 9 d 时间的培养,在第 7 天细胞密度达到最高为 $5.5 \times 10^6/\text{mL}$ (如图 2 所示),是起始密度的 11 倍,前 7 d 细胞活率一直维持在 85% 以上,从第 7 d 之后细胞密度开始下降,细胞活率也逐渐降低.

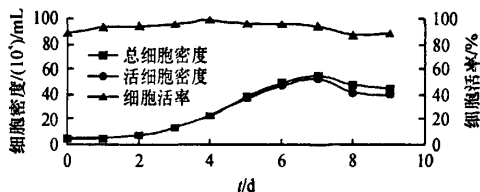


图2 转瓶培养 Sf9 细胞生长曲线

葡萄糖被认为是昆虫细胞最主要的能源和碳源,Sf9 培养基 SF900II 中葡萄糖浓度较高,约为 70 mmol/L,随着培养时间而呈逐渐下降的趋势,在培养第 8 天时下降至 21.6 mmol/L.同时代谢产物乳酸及氨不断积累(如图 3 所示),但乳酸积累明显,在昆虫细胞生长第 8 天时,乳酸浓度为 4.05 mmol/L,而氨浓度只有 0.015 mmol/L,乳酸浓度远高于氨浓度,说明乳酸是昆虫细胞生长过程中更为主要的代谢产物.

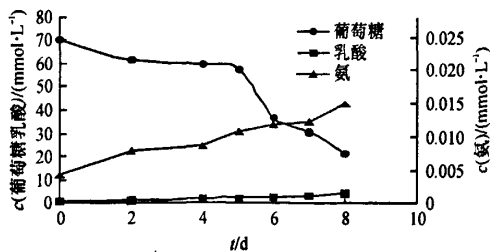


图3 转瓶培养过程葡萄糖、乳酸及氨的变化曲线

2.2 摇瓶 Sf9 细胞悬浮培养

摇瓶起始接种细胞密度也是 $5 \times 10^5/\text{mL}$,在第 7 天达到最高细胞密度为 $7.3 \times 10^6/\text{mL}$,是起始密度的 14 倍,比转瓶培养高出 23.6%,前 7 d 细胞活率维持在 91.4% 以上(如图 4 所示),从第 7 天之后细胞密度开始下降,细胞活率也逐渐降低.

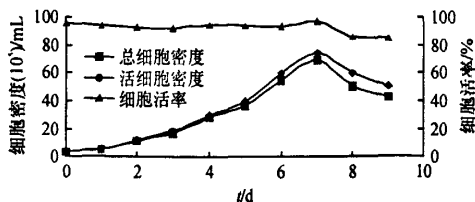


图4 摇瓶培养 Sf9 细胞生长曲线

摇瓶培养代谢曲线类似于转瓶培养,在培养第 8 天时葡萄糖浓度下降至 37.6 mmol/L.昆虫细胞生长第 8 天时,乳酸浓度为 3.8 mmol/L,而氨浓度只有 0.011 mmol/L,乳酸浓度远高于氨浓度,同样说明乳酸可能是抑制细胞生长的主要代谢物.

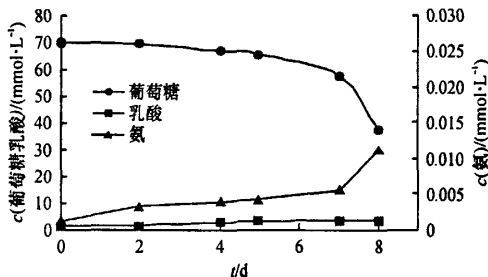


图5 摇瓶培养过程葡萄糖、乳酸及氨的变化曲线

2.3 Bellocell Sf9 细胞悬浮培养

Bellocell 起始细胞量为 2.5×10^8 ,经过 8 d 培养,Bellocell 细胞载体的细胞量达到最高为 3.6×10^9 .由于 Bellocell 经过 7 d 培养之后,细胞载体所吸附的细胞逐渐趋于饱和,细胞开始脱落到培养基中,培养基中的细胞量逐渐增多,一直到第 10 天,培养基中的细胞量增加到 6.6×10^8 .Bellocell 细胞量在第 8 天达到最高细胞密度为 4.01×10^9 ,是起始密度的 16.02 倍(如图 6 所示).

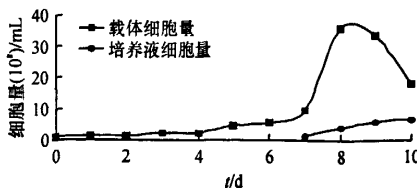


图6 Bellocell 培养 Sf9 细胞生长曲线

葡萄糖浓度在培养第 8 天时下降至 24 mmol/L,而在培养终止时则只有 2 mmol/L,基本消耗完全.主要代谢产物乳酸最高达到了 18.3 mmol/L;氨浓度从最初的 0.013 mmol/L 增长到 0.087 mmol/L

(如图7所示),与摇瓶和转瓶相比没有明显差别,都是处于比较低的水平,第9天时乳酸浓度高过葡萄糖浓度,抑制了细胞的生长,细胞量开始下降(如图6所示)。

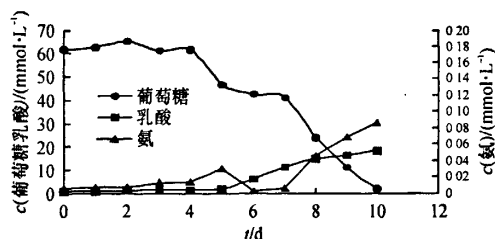


图7 Bellocell 培养过程葡萄糖、乳酸及氨的变化曲线

2.4 搅拌式发酵罐 Sf9 细胞悬浮培养

用发酵罐培养进行细胞培养,在第8天细胞密度达到最高值为 $1.52 \times 10^7/\text{mL}$,细胞活率几乎维持在100%。从第4天开始,有大量的细胞黏附于无泡通气装置管壁之上,影响了氧气的供应(数据未显示)。当管壁和罐壁上黏附的细胞达到一定密度后,在培养的第8天培养基中的细胞数量有了一个激增。

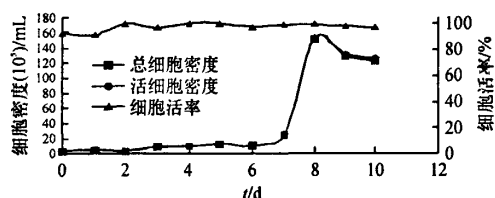


图8 发酵罐培养 Sf9 细胞生长曲线

相较于以上3种培养体系,在搅拌式发酵罐中葡萄糖在前8d一直维持在一个较高的含量,第8天才开始下降。比较4种反应器所得到的最高细胞密度,可见发酵罐中葡萄糖的利用率大大提高。相反乳酸及氨浓度一直维持在比较低的水平。第8天的代谢结果是:葡萄糖浓度为59.3 mmol/L,乳酸浓度为4.4 mmol/L,氨浓度仅为0.05 mmol/L。

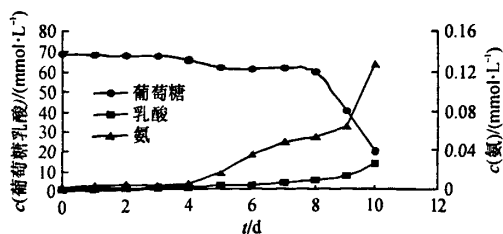


图9 培养过程葡萄糖、乳酸及氨的变化曲线

3 讨论

从以上实验结果可以得出,使用不同生物反应器培养昆虫细胞 Sf9 可以达到不同的细胞密度,从大到小依次为:发酵罐 > Bellocell > 摇瓶 > 转瓶。其原因可能为:

(1)不同反应器的供氧能力不同。同细菌和其他动物细胞一样,培养基中的溶解氧 DO 是影响昆虫细胞生长以及外源蛋白表达的关键性因素^[10-11]。搅拌式发酵罐具有无泡通气系统和自动控制的搅拌系统,可以在一定时期内将 DO 控制在一个较高的恒定的水平,其供氧能力是4种反应系统中最强的,因而其细胞密度远高于其他3种培养方式;Bellocell 是一种新型的潮汐式细胞培养系统,细胞可以在一段时间内暴露在空气中从而获得较好的氧气,其细胞培养密度次之;而摇瓶的瓶口覆有透气膜,使之透气性好于全封闭的转瓶,加之两者的搅拌方式的不同,也造成了二者之间的差异。以上实验也证明了 DO 是影响昆虫细胞生长的关键性因素。设计一个供氧能力强的反应器是获得高密度昆虫细胞生长的保证。

(2)恒定的 pH 有利于细胞的生长。昆虫细胞在摇瓶和转瓶的培养没有进行 pH 的调整,而使用 Bellocell 进行 Sf9 的培养是每隔 24 h 加入 Bis-Tris 将 pH 调整到 6.5。而搅拌式发酵罐是将 pH 保持在恒定的 6.5。而这两种进行了 pH 调整的反应器中细胞密度远高于未加调整的细胞培养方式。由此可见 pH 的实时调节使细胞一直处于最适的酸碱条件之下,很好的中和了代谢物乳酸和氨对细胞的抑制作用,有利于细胞的生长。

(3)葡萄糖的利用效率。葡萄糖被认为是昆虫细胞生长中最为重要的碳源,因此,某些培养基中葡萄糖作为唯一的碳源存在,即使有其他的糖存在,细胞也是主要依赖于葡萄糖^[12]。SF900 中就含有较高的葡萄糖。从我们的实验可以看出,虽然使用的培养基相同,不同的反应器中葡萄糖的利用率却不同。相较于其他3种培养体系,在搅拌式发酵罐中葡萄糖在前8d一直维持在一个较高的含量,第8天才开始下降,并且所获得的细胞密度远远高于其他3种反应器,说明葡萄糖的利用率要高于其他3种反应器,这可能是因为发酵罐中可以得到较为充足的氧气,葡萄糖代谢更多的是有氧呼吸,其提供的能量

远远高于氧气缺乏时的无氧呼吸。

(4)代谢产物的影响. 乳酸和氨是昆虫细胞中产生的主要代谢产物,但从实验中可以看出,氨的浓度在几种反应器中都很低,而且有报道认为,昆虫细胞对氨不敏感,即一定浓度范围的氨盐对昆虫细胞的生长不产生影响^[13]. 乳酸的浓度要高于氨盐,乳酸的积累对昆虫细胞生长有一定的抑制作用。

虽然搅拌式发酵罐可以得到较好的细胞密度,但在发酵罐培养中也发现一些问题,在培养过程中有大量的细胞贴附于无泡通气管的管壁上,在培养后期 DO 降至很低,在第 8 天仅为 2%,仍然是细胞生长的限制因素. 此外在发酵罐中,即使在细胞培养的第 10 天,发酵罐的葡萄糖浓度仍然还有 20 mmol/L,但乳酸浓度则达到了 13 mmol/L,说明培养液中虽然还有一定浓度的碳源,但代谢产物的生成抑制了细胞生长抑制作用. 为了进一步提高昆虫细胞的生长情况,可进行发酵罐的改造,提高其供氧能力,同时改进细胞培养方式,如采用灌注式培养或者透析式培养,除去代谢产物,同时补充养分,可以获得更高的昆虫细胞培养密度。

[参考文献]

- [1] MILLER L K. Baculoviruses as gene expression vectors [J]. *Ann Rev Microbiol*, 1998; 42.
- [2] LUCKLOW V A. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors [C] // PROKOP C Ho A, BAJPAI R. *Recombinant DNA technology and applications*, NY: McGraw Hill, 1990; 1 - 24.
- [3] DREWS J, RYSER S. Classic drug targets [J]. *Nat Biotechnol*, 1997; 13: 18 - 19.
- [4] REDAELLI L, ZOLEZZI F, NARDASE V, et al. A platform for high-throughput expression of recombinant human enzyme secreted by insect cells [J]. *J Biotech*, 2005, 120: 59 - 71.
- [5] YAMAJI H, MANABE T, KITaura A, et al. Efficient production of recombinant protein in immobilized insect cell culture using serum-free basal media after baculovirus infection [J]. *Biochem Engineering J*, 2006, 28: 67 - 72.
- [6] AGATHOS S N. Insect cell bioreactors [J]. *Cytotechnology*, 1996, 20: 173 - 189.
- [7] TORINIWA H, KOMIYA T. Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor [J]. *Biologicals*, 2007, 35: 221 - 226.
- [8] LU Jen-te, CHUNG Yao-chi, CHAN Zun-ren, et al. A novel oscillating bioreactor BelloCell: implications for insect cell culture and recombinant protein production [J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27: 1059 - 1065.
- [9] LEE H P, HU Y C. BelloCell on Text Book [DB/CD]. <http://www.cescobio.com.tw>, 2007.
- [10] SCOTT R I, BLANCHARD J H, FERGUSON C H R. Effects of oxygen on recombinant protein production by suspension cultures of Sf-9 insect cells [J]. *Enzyme Microbiol Technol*, 1992, 14: 798 - 804.
- [11] GOTOH T, CHIBA K, KIKUCHI K-I. Oxygen consumption profiles of Sf-9 insect cells and their culture at low temperature to circumvent oxygen starvation [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 17: 71 - 78.
- [12] B-DARD C, TOM R, KAMEN A. Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism [J]. *Biotechnol Prog*, 1993, 9: 615 - 624.
- [13] IKONOMOU L, SCHNEIDER Y J, AGATHOS S N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62: 1 - 20.

[责任编辑:黄建军]