

昆虫细胞无血清培养

曹翠平¹ 吴小锋^{1*} 鲁兴萌²

(浙江大学动物科学学院, ¹生物资源与基因工程研究室, ²无脊椎动物病理学研究室, 杭州 310029)

摘要 血清是细胞培养基常用的添加剂。目前应用最广泛的动物血清是胎牛血清。随着现代细胞生物学在细胞和组织培养方面的进步以及细胞培养方法的标准化, 人们更多的注意到了胎牛血清收集中的伦理道德问题。按照 3Rs 的原则, 科学家希望通过减少血清用量和开发使用血清替代物的方法来减少每年对血清的需求; 另外由于血清成分并不明确, 考虑到改进细胞和组织培养方法的要求, 很多无血清细胞培养基陆续开发成功, 成为替代胎牛血清的一个比较科学的方法。

关键词 昆虫细胞培养; 胎牛血清; 无血清细胞培养; 蛋白水解产物

细胞培养是将细胞在体外进行繁殖和培养, 该工作始于 20 世纪初, 现在已经成为生物学和医学研究领域不可缺少的工具, 并发展成为重要的基础科学之一。细胞培养在基础研究和应用生物学领域如细胞生物学、生理学、药理学和毒理学上的应用日益广泛, 减少了试验动物的使用数目, 正符合 3Rs 理论[即对待动物要有人性(refinement), 减少实验动物的使用量(reduction)和尽量找到使用动物的替代方法(replacement)]的要求^[1]。另外, 在最近 10 年里无脊椎动物细胞和组织培养在细胞和分子生物学基础研究中发挥了越来越重要的作用, 应用杆状病毒表达载体, 昆虫培养细胞作为宿主的真核表达系统已被广泛应用于生产外源蛋白质, 特别是成功表达了大量的具有很高医药价值的活性蛋白质之后, 备受人们青睐。

虽然 Sf21、Sf9 和 Tn-5 等昆虫培养细胞可以用于无血清培养, 但多数情况下, 常规的细胞和组织培养仍然需要添加动物血清, 主要是胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)。世界上 FBS 的年生产量约为 500 000 L, 这就意味着每年要屠宰 1 000 000 头以上的胎牛, 况且这个数目正呈逐年上升趋势^[2]。供血胎牛来自于屠宰的怀孕母牛。在巨大的肉用牲畜群中, 母牛和公牛散养在一起, 因此, 很多母牛在屠宰时已经怀孕。屠宰流水线上若发现有怀孕的母牛, 就将胎牛取出, 在无菌条件下收集胎牛血液。期间通常要使用专门的仪器强行促进心跳以收集血液^[2]。近几年来, 人们越来越关注 FBS 的收集方法和加工处理过程中对供血胎牛引起的伤害^[3]。

2003 年 4 月 5 日到 7 日, Vera Baumans 和 Jan van der Valk 组织召开了题为“改进体外培养方法, 替换胎牛血清”的会议, 讨论了关于 FBS 的使用问题, 在全球范围内发起减少 FBS 使用量的号召^[3]。因此, 无血清细胞培养技术的研究日益得到人们的重视。本文主要就近年来昆虫细胞无血清培养技术和相关研究作一概述, 并对昆虫细胞培养的基础研究方面的进展也作了说明。

1 昆虫细胞的基础代谢

要让细胞很好地生长和繁殖, 必须努力创造合适的条件, 最好模拟细胞原来生长的体内环境, 包括温度、pH 值、渗透压和氧气供应情况。细胞体外培养需要合适的培养瓶或者特定的培养界面, 但是细胞培养中最关键的因素是培养基。昆虫细胞新陈代谢方面的基础研究为培养基的设计提供最基本的理论依据, 对于配制新的培养基, 设计合理的培养方案以及实现高产量的杆状病毒感染表达都是非常重要的。关于目前常用的 Sf9、High-Five 细胞系的新陈代谢方面的研究直到最近十几年才有文章发表^[4-6]。

大部分昆虫细胞都利用葡萄糖、果糖或麦芽糖作为主要碳源和能源, 在多数培养基中, 葡萄糖作为碳源能被迅速利用, 虽然在杆状病毒感染后昆虫

收稿日期: 2004-09-16 接受日期: 2004-11-23

农业部(No. 2003-Z50)和浙江省科技厅国际合作项目(No. 2002C24003)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-86971658, Fax: 0571-86971670, E-mail: wuxiaofeng@zju.edu.cn;

细胞的生长也会消耗部分蔗糖，但它在培养基中所起主要作用是调节渗透压^[7]。

不同种类的昆虫细胞对氨基酸有不同的要求，其中有14种是必需氨基酸，细胞本身不能合成，必须由培养基提供。Sf9细胞被认为是甘氨酸和半胱氨酸营养缺陷型的^[8]。不过最近的文章表明，如果细胞是在上一代的早期(47~53 h)继代，Sf9细胞可以在无胱氨酸培养基中生长，在这种情况下，细胞会消耗更多的蛋氨酸来合成半胱氨酸^[9]。另有研究表明，在铵离子存在的条件下，Sf9细胞和Sf21细胞也可以在没有谷氨酰胺、谷氨酸和天冬氨酸的培养基中生长^[10]。然而，Mendonça等^[4]指出缺少谷氨酰胺会影响到细胞的生长速度，细胞需要谷氨酰胺合成核酸和蛋白质，几乎所有的昆虫细胞对谷氨酰胺都有较高的要求。因此，昆虫细胞自身合成谷氨酰胺不如直接在培养基中摄取有效，所以各类培养基中都含有较高浓度的谷氨酰胺。

昆虫细胞对有机酸的要求，其功能尚未明了。单独测试时只有苹果酸有生长促进作用。联合使用时，则对细胞生长有显著的促进作用。维生素对促进昆虫细胞生长、促进细胞贴附有积极作用。一般认为，泛酸、异己酸、乙酸及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。在昆虫细胞培养基中无机盐浓度略高，这是因为昆虫细胞要在高于哺乳动物细胞生长的渗透压中生长，并且各无机盐离子之间需要平衡，其中Na⁺/K⁺比例在某些细胞系中有严格的要求。某些微量元素如Fe²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Al³⁺等能促进细胞贴附和增加产量，其中Al³⁺和Zn²⁺还可以促进病毒的感染和复制^[7]。

水解乳蛋白(lactalbumin hydrolysate, LH)和酵母提取物(yeastolate, YL)是昆虫细胞培养基的基本成分，YL是维生素和嘌呤的主要来源，而LH是许多氨基酸的主要来源。在昆虫细胞悬浮培养中还需添加一些多聚物如甲基纤维素、PVP-40(聚乙烯吡咯烷酮)和Pluronic多聚醇(聚丙二醇与环氧乙烷的加聚物)等，以保护细胞免受机械剪切力的损伤和降低细胞聚集程度。大部分鳞翅目昆虫细胞在25~30℃之间生长最佳。培养基pH保持在6.2左右，不需要CO₂。多数昆虫细胞倍增时间为16~24 h，摇瓶培养时细胞密度最高达2×10⁶~5×10⁶个/ml^[7]。

2 血清在细胞培养中的作用

基础培养基中添加动物血清对细胞生长和促进

细胞分裂有非常重要的作用。血清是非常复杂的混合物，成分多样，含有各种生理平衡的分子量差别很大的生物分子，有的对细胞生长有促进作用，有些抑制细胞生长。培养基中添加血清的主要作用在于：(1)提供促进细胞生长、分裂和分化的激素物质；(2)血清中含有携带激素、矿物质、微量元素和脂类物质的转运蛋白；(3)血清能够提供细胞贴壁因子和扩散因子；(4)血清中含有起稳定作用和解毒的因子，能够维持培养基的pH值并抑制蛋白酶直接或间接的酶解^[11]。

现代细胞生物学和生物化学能够鉴定出参与体内化学反应，像细胞增殖、组织修复和细胞的成熟与分化等过程的生长因子。现在已经鉴定出很多控制特定基因表达、起始和控制细胞循环、分裂和涉及细胞分化的各种生长因子、激素、转运蛋白、辅助因子、重要的矿物质和微量元素等^[3]。由于FBS中含有丰富的生长因子，而且γ-球蛋白含量很低，FBS成为细胞培养基的标准添加物。使用FBS还具有以下优点：(1)FBS含有细胞增殖和细胞维持所需要的绝大部分的物质；(2)含有对多数人和动物包括昆虫细胞生长有促进作用的物质；(3)使用添加血清的培养基节省了开发适合各种细胞的特定培养基时间和精力^[11]。

然而，血清培养基也有缺点^[3]：(1)血清的成分并不明确，是培养基中的不确定因子；(2)不同批次生产的血清不仅数量不同，质量差别也很大，重复性差；(3)血清中也含有数量不等的内毒素、血红蛋白和其他对细胞有害的物质；(4)血清是细胞培养中潜在的微生物污染源，如真菌、细菌、病毒或其他感染性蛋白质。另外，血清培养基虽然能够满足多数细胞生长的要求，却不能维持一些特定细胞系的生长。在高度分化的上皮细胞原代培养中，血清也不能抑制纤维原细胞的过度生长，加上血清成分十分复杂，给基因工程表达产物的分离、纯化等后处理带来困难，所以开发无血清昆虫细胞培养基是今后昆虫细胞产业化的必然趋势。

3 昆虫细胞无血清培养基的研究进展

从上面所述FBS培养基的缺点很容易总结出无血清培养基的优点：(1)化学成分明确，培养条件容易控制；(2)减少了不同批次培养基之间在数量和质量上的差异；(3)除去了微生物污染的潜在来源；(4)利于细胞培养产物的分离等下游的操作；(5)在全世界范围内减少了FBS的用量，从而减少了牺牲胎牛

表1 常见无血清培养基的特点

培养基	不同特点
Sf-900 II SFM	由 Sf-900 SFM 发展而来, 但在氨基酸、碳水化合物、维生素和脂类成分上有很大变化。 适用于 Sf9、Sf21、Tn-368 等细胞系, 能够维持细胞生长 20 代以上。 不含有甲硫氨酸和胱氨酸, 使用时无需添加谷氨酰胺和 Pluronic F-68。 含有促进细胞生长的生物活性物质。
Express Five SFM	适用于 High Five 细胞系, 能够维持细胞长期生长。 不含有谷氨酰胺, 需要时可随时添加, 从而避免了谷氨酰胺降解和氨盐的积累, 延长了培养基的保存期。 使用时无需添加 Pluronic F-68。 含有促进细胞生长的生物活性物质。
EX-Cell 405	适用于 High Five 细胞系。 含有酵母抽提物和甲硫氨酸。
EX-Cell 420	4.717 g/L 谷氨酰胺, 1% Pluronic F-68, 9.434 g/L 葡萄糖, 0.33 g/L NaHCO ₃ 。不含 HEPES。 适用于 High Five 细胞系。 含有酵母抽提物和甲硫氨酸。
HyQ SFX-Insect	1.000 g/L 谷氨酰胺, 1% Pluronic F-68, 6.00 g/L 葡萄糖, 0.35 g/L NaHCO ₃ 。不含 HEPES。 适用于包括 Sf9、Sf21、D.mel、High Five 的多种昆虫细胞系。 含有酵母和乳白蛋白的水解产物。 10 mmol/L 谷氨酰胺, 0.35 g/L NaHCO ₃ 。 含有 Pluronic F-68, 不含 HEPES。
共同特点	都是不含蛋白质的昆虫细胞培养基, 能够使相应的昆虫细胞在多种生物反应器中达到最好的的生长和蛋白表达水平。

的数目。

无血清培养基通常有很高的细胞特异性, 因此, 需要对细胞生理学进行深入的研究, 每种特定的细胞都有它基础的无血清培养基配方。现在已经有提议建立一个方便查询的无血清培养基的配方数据库, 促进无血清培养基的发展^[12]。

昆虫细胞无血清培养基的研究始于 Wilkie 等^[13] 开发人工合成培养液(CDM), 它能够维持 Sf 细胞的生长和生产野生型杆状病毒。然而, 除了一篇涉及到代谢研究的文章^[14], 没有人报道过使用 CDM 做细胞的常规培养。即使是在上面这个特殊的例子中, CDM 中也添加了 0.4% 酵母提取物以维持细胞生长^[13]。

1981 年配制的 IPL-41 培养基非常适合细胞的无血清培养^[15]。在 1988 年证明了它具有大规模培养细胞的潜力^[16]。添加 4 g/L 的酵母提取物和多聚醇 F-68 乳化的脂质混合物后, 它能够维持 6~36 L 规模生产巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)。

每种合成培养基都是为了培养特定的细胞而设计的。昆虫细胞培养相关的生物化学公司开发了越来越多的商品化无血清培养基。有些培养基现在能在市场上买到并已经被用于常规的细胞培养, 如 Life Technologies 公司的 Sf-900 II SFM 和 Express Five SFM、Biowhittaker 公司的 Insect-EXPRESS、JRH Biosciences 公司的 EX-Cell 400、405 和 420 以及

Hyclone 公司的 HyQ SFX-Insect 等。表 1 中列举了几个无血清培养基的主要特点, 每种培养基的具体特点和详细的使用说明可以在各公司的网上查到。

3.1 蛋白水解产物有望代替血清

发展无血清培养基, 除了开发化学合成培养基外, 也可以寻找适当的具有类似于血清功能的物质来代替血清。由于血清成分复杂, 具有多种促细胞生长和增殖的因子, 因此要找到血清的替代物相当困难。有人曾试着用昆虫血淋巴来代替血清, 虽然昆虫血淋巴能够维持细胞生长和进行重组蛋白质的生产, 却出现和血清使用同样的问题^[17,18]。目前研究最多的血清替代物是蛋白水解产物(也称为蛋白胨)。

动物细胞大规模、无血清培养最有希望的方法是使用蛋白水解产物。蛋白水解产物(或称蛋白胨)是寡肽、多肽和氨基酸的复合混合物, 它们是通过酶解或化学方法降解酪蛋白、清蛋白、植物或动物组织或酵母细胞得到的。酵母抽提物是通过细胞自动降解产生的, 所得混合物中还含有多糖和维生素^[19]。以前, 人们就曾发现在培养基中加入蛋白水解产物可以作为血清培养基和开发合成培养基的折衷方法^[20,21]。

多年以来, 应用最多的蛋白胨是通过消化动物组织得到的, 比如细菌用蛋白胨、胰蛋白胨(protease peptone)和 Primatone RL(一种动物组织的酶消化物)^[21]。就动物细胞的大规模培养来说, Primatone RL 是在血清或无血清培养条件下最节省成本的补充物^[5,21-23]。

通过推迟细胞凋亡, Primatone RL 延长了小鼠杂交瘤细胞培养的平台期^[22]。在 Sf9 和 High-Five 细胞系培养中也观察到类似的结果^[5]。无论是摇瓶培养还是搅拌式生物反应器培养的细胞, 细胞密度为 $3 \times 10^6 \sim 7 \times 10^6$ 个/ml 平台期都延长了 3~4 天^[5]。仅就昆虫细胞培养而言, Primatone 是 1993 年开发的 Sf9 细胞培养基 SF-1 的主要成分之一^[23]。其他细胞系, 如果蝇 SL-2 和 SL-3 以及 *Trichoplusia ni* High-Five 细胞都已经成功地适应了这种培养基^[24]。

但若是在培养基中添加动物蛋白质, 仍然存在病毒污染的危险。因此, 只有完全采用非动物来源的材料, 才是相对安全的^[25], 而植物水解产物将是理想的选择。

最近, 植物水解产物正在无血清培养基中发挥越来越重要的作用^[6,26,27]。Heidemann 等^[27]研究了各种各样的植物蛋白胨对于细胞生长和 BHK-21 细胞系生产一种治疗用糖蛋白的生产效率的影响。NZ-Soy (一种大豆蛋白胨) 并不影响产物质量, 然而添加该蛋白胨的培养基和无蛋白胨培养基情况下产物的糖基化形式一样^[27]。另一种大豆水解产物 (Hy-Soy) 是 ISYL 昆虫细胞培养基的重要成分 (浓度是 4 g/L), ISYL 是以 IPL-41 基础培养基为主, 添加 Hy-Soy、酵母超滤液和多聚醇 F-68 等物质发展而来^[4]。在 BTI-Tn-5B1-4 细胞生长 (最大细胞密度为 6×10^6 个/ml) 和 SEAP 定容产量 (约 60~76 mg/L) 方面, ISYL 培养基与 EX-Cell 405 效果一样好。研究还发现 High-Five 细胞从 YPR 培养基转移到一种含有大豆水解产物 SE50MAF 的培养基后, 能很快适应并且经过几次继代都生长很好^[5]。因此, 如果基于表达产物的安全考虑不提倡使用肉类水解产物, 大豆水解产物可以用于配制昆虫无血清培养基。

3.2 蛋白水解产物的特殊作用

3.2.1 蛋白胨的营养功能 有证据表明, 蛋白胨对哺乳动物细胞有一定的营养作用^[27,28]。在昆虫细胞培养中蛋白胨氨基酸不太可能有类似的作用, 因为在昆虫细胞基础培养基中已含有丰富的氨基酸, 含量通常要比哺乳动物细胞培养基中的高出 10 倍, 这正是昆虫血淋巴中氨基酸含量很高的反应^[24]。不过也有例外, 若用不含胱氨酸和蛋氨酸的蛋白胨混合物 (1% yeastolate、0.5% tryptose 和 0.5% Primatone) 培养昆虫细胞, 需要另外添加胱氨酸和蛋氨酸^[29]。因此, 关于昆虫细胞释放和吸收肽形式存在的氨基酸的能力, 昆虫细胞在生长和感染时期对于氨基酸

的利用情况以及筛选氨基酸补充的必要性等方面的深入研究将有助于昆虫细胞培养基的合理设计。

3.2.2 蛋白胨的生长和增产因子 最近, 蛋白胨中检测到了肉类消化物所没有的生物活性, 蛋白胨提供的肽类物质对于细胞的生长和蛋白质表达量有特效的观点又被重提^[26,30]。用低压液相层析分离肽组分的新方法表明大豆和小麦蛋白胨中的一些特殊组分对于增加活细胞密度和无血清培养的小鼠杂交瘤细胞中免疫球蛋白的浓度有很好的效果^[26], 因此, 这种作用不是纯粹的营养作用。向同一种细胞的培养基中添加合成寡肽的试验进一步证实了这种假设^[30]。浓度大于 1 mmol/L 的三、四、五-甘氨酸肽和三、四-丙氨酸肽对于细胞生长具有明显的促进作用。Gly-Lys-Gly 和 Gly-His-Gly 等三肽虽然抑制细胞生长却能够提高蛋白质产量^[30]。

蛋白胨能否应用于常规的细胞培养还要看市售的蛋白胨中是否有细胞生长因子、增产因子和抗细胞凋亡因子。这一点特别重要, 因为脊椎动物生长因子, 像胰岛素、表皮生长因子 (EGF) 和成纤维细胞生长因子 (FGF) 不能维持昆虫细胞系在无血清条件下生长^[31], 而且无脊椎动物生长因子通常很难分离纯化。

4 有关昆虫生长因子的利用

最近, 鉴定出两个昆虫细胞生长因子, 它们都是 N 末端具有共同序列 (Glu-Asn-Phe-) 的 ENF 家族成员。一个叫做生长阻抑肽 (growth blocking peptide, GBP), 当它的添加浓度为 nmol/L 级水平时, 能够刺激人角质形成细胞和 Sf9 细胞的 DNA 合成^[32]。另一个是家蚕麻痹肽 (*Bombyx mori* paralytic peptide, BmPP), 把它注射入昆虫幼虫中能够引起虫体麻痹。用来自家蚕胚胎或卵巢的 7 个细胞系测试 BmPP 的功能, 其促进细胞生长的效果与 $10^{-9} \sim 10^{-5}$ mol/L FBS 基本相同^[33]。另一方面, 有研究表明, 向杆状病毒感染的 Sf-9 细胞中加入血淋巴能够推迟宿主细胞的死亡, 这一发现推动了从昆虫 (家蚕) 血淋巴中分离抗细胞凋亡因子的研究^[34,35]。在 0%~10% 范围内增加培养基中血淋巴的浓度能够将细胞死亡速度从 $13.8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ 降低到 $6.0 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, 且并不妨碍病毒的附着和内吞。后来又分离到一种未糖基化的单亚基蛋白质, 分子量约 28 kDa, 其抑制细胞凋亡的活性和全部热处理的血淋巴相同^[36]。这些因子在昆虫细胞大规模无血清培养中的综合应用还依赖

于其是否能大量、简易地进行分离纯化及其在其他常用细胞系, 如 High-Five 和 Bm5 的培养中是否能发挥同样的作用。

5 昆虫细胞培养基设计的发展方向

参照蛋白胨在动物细胞培养中所起的作用, 我们可以概括地叙述昆虫细胞培养基设计的发展方向。如果基础培养基中很少或者没有氨基酸, 蛋白胨能够起到营养的作用。蛋白胨也具有类似血清的许多功能。在培养基制备过程中使用超滤技术能够消除蛋白胨批次之间的不稳定性并能保证昆虫细胞生长良好^[19]。利用层析方法分离具有特殊活性的低分子量组分可以作为一个确定培养基成分和纯化重组蛋白质的好方法^[26]。举例来说, 这些技术可以用来制备酵母提取物的超滤液, 这是一个典型的多功能蛋白胨, 在很多昆虫细胞系的培养中具有重要作用价值。

利用因析试验能同时将多种培养基成分作为参数研究, 设计新培养基或者筛选培养基补充物。因析设计是发现试验参数之间交互作用的唯一方法, 并且能够大大减少试验所需重复的次数^[19]。因此, 应用因析设计和因析试验可以大大地节省实验时间和损耗。在昆虫细胞培养中, 一个因析试验可以同时筛选几个蛋白胨, 随后的一个全因析试验可以优化筛选出来的蛋白胨的使用浓度^[5]。

另一方面, 因析试验通常只设计两个试验水平。前不久, 利用遗传算法(genetic algorithms)通过多种成分在很大浓度范围内的筛选实现了补料分批培养基的优化^[37]。生产生物杀虫剂的培养细胞 HzAm1 在利用含有酵母提取物、乳白蛋白和面筋蛋白胨的优化培养基进行生物反应器培养时最高细胞密度能达到 19.5×10^6 个 /ml^[37]。

培养基的发展是和新的细胞系的发展以及对细胞新陈代谢的深入研究联系在一起。在过去几年中报道过用于杆状病毒感染的新细胞系, 但是几乎没有一个细胞系能够适应大规模生产^[19]。有研究发现转化的鳞翅目昆虫细胞系中有一些似乎适合大规模培养^[38,39]。另外, 细胞在被感染前后氨基酸的利用率不同^[19], 这一点对于开发新的无血清培养基甚至基础培养基都是很重要的。因析设计也可以用

来同时优化几个氨基酸水平。细胞代谢研究资料的系统探索、统计方法的应用以及更多蛋白水解物的出现能够推进通用无血清培养基的开发, 并能使之适用于细胞生长和病毒感染两个时期以及蛋白质后加工过程。

参考文献 (References)

- [1] Balls M *et al.* *Altern Lab Anim*, 1995, **23**: 838
- [2] Jochems CE *et al.* *Altern Lab Anim*, 2002, **30**: 219
- [3] van der Valk J *et al.* *Toxicol In Vitro*, 2004, **18**: 1
- [4] Mendonça RZ *et al.* *J Biotechnol*, 1999, **72**: 61-75
- [5] Ikononou L *et al.* *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2001, **37**: 549
- [6] Donaldson MS *et al.* *Biotechnol Prog*, 1998, **14**: 573
- [7] 吕鸿声。昆虫病毒的组织培养。见: 吕鸿声编。《昆虫病毒与昆虫病毒病》, 北京: 科学出版社, 1982, 303
- [8] Tremblay GB *et al.* *J Biol Chem*, 1992, **267**: 8281
- [9] Doverskog M *et al.* *Cytotechnology*, 1998, **26**: 91
- [10] Öhman L *et al.* *Biotechnol Lett*, 1996, **18**: 765
- [11] Gstraunthaler G. *ALTEX*, 2003, **20**: 275
- [12] Strebel C *et al.* *ALTEX*, 2003, **20**: 202
- [13] Wilkie GE *et al.* *Dev Biol Stand*, 1980, **46**: 29
- [14] Ferrance JP *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1993, **42**: 697
- [15] Weiss SA *et al.* *In Vitro*, 1981, **17**: 495
- [16] Maiorella B *et al.* *Bio Technology*, 1988, **6**: 1406
- [17] Ha SH *et al.* *Biotechnol Tech*, 1996, **10**: 401
- [18] Ha SH *et al.* *Biotechnol Lett*, 1997, **19**: 1087
- [19] Ikononou L *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **62**: 1
- [20] Keay L. *Biotechnol Bioeng*, 1976, **18**: 363
- [21] Mirahi A. *Biotechnol Bioeng*, 1977, **19**: 1557
- [22] Schlaegar EJ. *J Immunol Methods*, 1996, **194**: 191
- [23] Schlaegar EJ *et al.* *Biotechnol Tech*, 1993, **7**: 183
- [24] Schlaegar EJ. *Cytotechnology*, 1996, **20**: 57
- [25] Merten OW. *Dev Biol Stand*, 1999, **99**: 167
- [26] Franek F *et al.* *Biotechnol Prog*, 2000, **16**: 688
- [27] Heidemann R *et al.* *Cytotechnology*, 2000, **32**: 157
- [28] Nyberg GB *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1999, **62**: 324
- [29] Vaughn JL *et al.* *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997, **33**: 479
- [30] Franek F *et al.* *Biotechnol Prog*, 2002, **18**: 155
- [31] Nishino H *et al.* *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1995, **31**: 822
- [32] Hayakawa Y *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **250**: 194
- [33] Sasagawa H *et al.* *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2001, **37**: 638
- [34] Rhee WJ *et al.* *Biotechnol Prog*, 1999, **15**: 1028
- [35] Rhee WJ *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **271**: 186
- [36] Kim EJ *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **285**: 224
- [37] Marteiijn RC *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 2003, **81**: 269
- [38] Granados RR *et al.* *J Invertebr Pathol*, 1994, **64**: 260
- [39] Pfeifer TA *et al.* *Protein Expr Purif*, 2001, **23**: 233

Serum-free Culture of Insect Cells

Cui-Ping Cao¹, Xiao-Feng Wu^{1*}, Xing-Meng Lu²

(¹Laboratory of Biological Resources and Gene Engineering, ²Laboratory of Invertebrate Pathology, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Serum is commonly used as a supplement to cell culture medium. The most widely used animal serum is fetal bovine serum, FBS. With the improvement of modern cell biology in cell and tissue culture and the standardization of cell culture protocols, considerable ethical concerns were fixed recently on the harvest and collection of FBS. Thus, in order to decrease the annual need of animal serum in terms of the 3Rs, any reduction in the use or partial replacement of serum is expected. In addition, because of serum being an ill-defined component and in terms of an improvement of cell and tissue culture methodology, many serum-free cell culture medium were developed successfully and were well accepted as an alternative to the use of FBS in cell and tissue culture.

Key words insect cell culture; fetal bovine serum; serum-free cell culture; protein hydrolysate

Received: September 16, 2004 Accepted: November 23, 2004

This work was supported by Ministry of Agriculture of China (No.2003-Z50) and Key International Cooperation Program of Zhejiang Province (No.2002C24003)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86971658, Fax: 86-571-86971670, E-mail: wuxiaofeng@zju.edu.cn