

- [5] 程丽萍等, 1992, 生殖与避孕, 12: 50—53.
 [6] 朱炳法等, 1988, 中国免疫学杂志, 4: 194.
 [7] 朱云凤等, 1991, 中国免疫学杂志, 7: 114.
 [8] James K, et al., 1984, Immunology Today, 5: 357.

- [9] Blackstock R, et al., 1988, Cellular Immunol., 114: 174.
 [10] Fisher DG, et al., 1981, Manual of methodology, pp. 259—269.

人生长素基因工程细胞 C-4 系的无血清培养液培养*

李云宝 孙燮均 姚曾序

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

C-4 工程细胞是整合有人生长素(hGH)和小鼠金属硫蛋白(mMT)启动子融合基因的二氢叶酸还原酶缺陷型 CHO 细胞(CHO dhfr⁻), 在重金属镉离子或锌离子的作用下, 能够表达并分泌 hGH。虽然 hGH 的大肠杆菌表达系统的研究进展很快, 且已用于规模生产, 但此工程细胞仍是一个用以探讨哺乳动物细胞表达系统一些基本问题的较理想模型, 而在无血清培养条件下, 则可以排除细胞周围环境中一些未知因素的干扰, 有利于实验结果的分析。

材料和方 法

一、工程细胞 C-4 系的培养

该细胞系是由中国科学院动物研究所沈孝宙教授实验室筛选和建立的。按照该实验室方法用氯化镉(0.25 μmol)作为基因表达的诱导剂。最初使用的培养液为 RPMI 1640 加 10% 新生小牛血清(NCS)。在降低培养液血清含量过程中, 基础培养基换用 IMDM(GIBCO 产品)。细胞在 5% CO₂ 培养箱中培养, 温度 37° ± 0.5°C, 一般每周传代一次。

二、无血清培养液 CBSF-II 的成分

基础培养为 IMDM(GIBCO 产品), 添加运铁蛋白 15 μg/ml, 胰岛素 5 μg/ml, 乙醇胺 5 μmol/ml(以上均 Sigma 产品), 硒酸 0.1 nmol/ml(分析纯, 本所细胞工程组赠予)。另外增添脯氨酸 20 μg/ml(第二军医大学药系产品), 谷氨酰胺 0.3 mg/ml(GIBCO 产品), Hepes 3.6 mg/ml(GIBCO 产品)。培养液的配制使用超纯水(17 megohm-cm), 配制好的无血清培养液为 pH 7.2。

三、hGH 的检测

采用 ABC(Avidin-Biotin-peroxidase)方法, 在 96 孔培养板上进行。hGH 抗体(本所基因工程组制备)的包被浓度为 20 μg/ml, 100 μl/孔, 生物素(Sigma 产品)化 hGH 抗体(本所基因工程组制备)浓度为 15 μl/ml, 100 μl/孔, streptavidin peroxidase(Sigma 产品)的工作稀释度为 1:1000, 反应底物用四甲基联苯胺(上海医科大学生化教研室产制), 以 2 mol H₂SO₄ 终止反应。检测用酶联免疫检测仪(华东电子管厂产品), 其他如常规。每次测定 C-4 细胞培养液中 hGH 含量时, 均同时用纯化的不同浓度的 hGH(本所基因工程组制备)作为阳性对照, 绘制定量反应曲线, 用于测定条件培养液中 hGH 含量的标准。

结 果

一、细胞从含血清培养液至无血清培养液的适应过程

采用逐渐降低血清含量的方法, 整个适应过程见图 1。在培养液血清含量由 20% 降至 1% 和由 0.5% 降到 0.2% 时, C-4 细胞生长均见停滞。此时在培养液中添加一定量添加成份, 嗣后又将培养基 RPMI 1640 换为 IMDM, 两次克服了细胞生长停滞现象。在这种无血清培养液(CBSF-II)中能够长期传代。呈悬浮生长的 C-4 细胞(图 1), 经液氮冻存后复苏, 可以直接在 CBSF-II 中培养传代, 不再需要适应过

* 本文系中国科学院上海细胞生物学研究所郭礼和教授负责的“七五”国家重点科技项目中的部分工作, 得到该项目基金的资助。

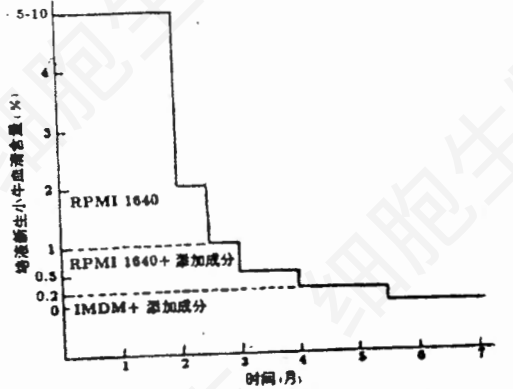


图 1 C-4 工程细胞从含血清培养液到无血清培养液培养的适应过程

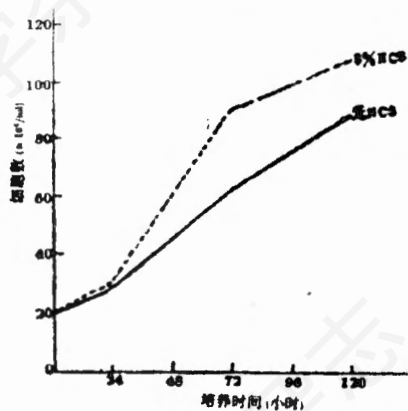


图 2 C-4 工程细胞在含血清培养液 (RPMI 1640, 6% NCS) 与无血清培养液中生长动态的比较

程。

二、细胞在两种培养液中的生长动态

C-4 细胞在含血清培养液与无血清培养液 CBSF-II 中生长动态的比较见图 2。培养 3 天时, 细胞数在含血清组增加 4.5 倍, 在无血清组增加 3.1 倍, 两者相差 44%。5 天时, 前者增加 5.4 倍, 细胞浓度为 $1.1 \times 10^6/\text{ml}$, 后者增加 4.3 倍, 细胞浓度为 $0.9 \times 10^6/\text{ml}$, 两者相差约 20%。从生长曲线的走势可以看出, 在培养 1—3 天时含血清组细胞增殖率高于 CBSF-II 组细胞, 而培养 3—5 天时则呈相反情况。

三、上清液中 hGH 的测定

C-4 工程细胞在添加诱导剂 $0.25 \mu\text{mol}$ cd^{++} 的含血清或无血清 CBSF-II 培养液中连续培养 7 天, 其间不更换培养液, 然后取条件培养液测定 hGH 含量, 结果见表 1。

从上表可见, C-4 工程细胞经过一年多从低血清培养液到无血清培养液的反反复复逐渐适应过程, 仍保持着原导入的 hGH-mMT 启动子融合基因, 仍接受 Cd^{++} 对整合状态的 MT 启动子

表 1 在含血清培养液和无血清培养液 (CBSF-II) 中 C-4 工程细胞产物 hGH 的测定

细胞培养	hGH 量 (ng/ml)
1. RPMI 1640, 5% CS	2.0
2. RPMI 1640, 1% CS	1.6
3. CBSF-II	2.2
4. CBSF-II 无 cd^{++}	0.08

的诱导作用。虽然 C-4 工程细胞在 CBSF-II 培养液中的细胞浓度要低于在含血清培养液中的浓度 (图 2), 但两者条件培养液中 hGH 含量却没有差别。

讨 论

一般来讲, 用无血清培养液在静置瓶培养杂交瘤细胞也很少能超过 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 浓度^[1]。Hengst 和 Sokoloff 用 Nutridomasp 无血清培养液在 1 升搅拌式培养罐中培养杂交瘤细胞, 其浓度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ ^[2]。Gray 等人^[3]用含 5% 胎牛血清培养和 cytodex 2 悬浮培养重组 CHO 细胞系 (CB 515 系, 整合有 hGH 和 hMT 启动子的融合基因), 最高细胞浓度也只达到 $2-4 \times 10^6/\text{ml}$ 。与以上报道相比较, 用 CBSF-II 无血清培养液培养转基因 CHO 细胞所获得的最高生长浓度, 还是较为满意的。适用于 CHO 细胞培养的 CBSF-II 培养液中蛋白类促细胞生长因子的含量很低 ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$), 接近 GC_3 无血清培养液中的蛋白质含量^[4], 但远低于 HB-CHOtm 培养液 ($350 \mu\text{g}$ 蛋白/ml)^[5] 和 Sigma 公司生产的用于 Vero、HFL、3 T 3 等细胞系的 SPSR-5 培养液 ($30 \text{mg}/\text{ml}$)。虽然从经济效益看, 应用 CBSF-

II 无蛋白培养液培养转基因的 CHO dhfr⁻ 细胞生产 hGH 是毫无意义的, 但是用于必须以哺乳动物细胞作为转基因靶细胞生产的生物制品, 例如人红细胞生成素等则是值得尝试的, 这不仅可以在进一步降低生产成本, 也更易获得高纯度产品。

摘要

C-4 工程细胞系是整合有 hGH 和 mMT 启动子融合基因的 CHO dhfr⁻ 细胞, 在 cd⁺⁺ 作用下能够表达并分泌 hGH。该细胞系经过驯化, 可适应在 CBSF-II 无血清培养液中长期生长、传代, 同时仍接受 cd⁺⁺ 的诱导作用, 分

泌 hGH。CBSF-II 培养液中蛋白含量很低(20 μg/ml), 为了易于获得高纯度产品和降低费用, 用于必须以哺乳动物细胞作为转基因靶细胞生产的生物制品, 是值得尝试的。

参考文献

- [1] Shacter, E., 1989, TIBTECH, 7: 248.
- [2] Hengst, J. C. D. and Sokolobb, R. L. 1987 In Vitro., 23 (3, part II): 36A.
- [3] Gray, P. P. et al., 1989, Bio/Tech., 7: 359.
- [4] Gasser, F, et al., 1985, In Vitro., 21: 588.
- [5] Deaver, G, et al., 1987, In Vitro., 23 (3, part II): 37A.

《细胞生物学杂志》入选最新“中国自然科学核心期刊”

中国自然科学核心期刊研究课题组不久前公布了最新的“1992—1993 年中国自然科学核心期刊”300 种。这是根据国家标准“GB/T 13745-92”规定的学科分类标准, 优选 30 种中国出版的各学科代表性期刊, 对它们在 92、93 年所发表的论文, 使用“引文法”进行客观统计后得到的结果。在仅占目前期刊总数 4% 比例的 300 种核心期刊中, 综合性期刊及数理科学等学科期刊占 28%, 医药卫生期刊占 28%, 地学天文期刊占 20%, 生物农林类占 24%。全部核心期刊名单及详尽评述将在国际核心期刊研究会的综合性学术期刊《科学技术学报》磁盘周刊上发表。与本刊学科专业相关的核心期刊名单, 按被引用频次从高到低的顺序列于下表, 该表中空缺名次为其他学科核心期刊, 被引用频次相同者名次相同。《细胞生物学杂志》名列核心期刊第 71 名。

1992—1993 年中国自然科学核心期刊

1 中国科学	53 动物学研究	71 江苏农学院学报
2 科学通报	54 中国兽医科技	71 水利学报
4 植物学报	61 微生物学报	71 西北植物学报
14 林业科学	62 北京林业大学学报	71 细胞生物学杂志
15 植物生理学报	62 昆虫学报	72 古脊椎动物学报
17 动物学报	62 南京农业大学学报	72 两栖爬行动物学报
19 水产学报	62 遗传	72 南京林业大学学报
23 植物生理学通讯	63 病毒学报	72 武汉植物学研究
25 中国农业科学	63 东北林业大学学报	72 中国棉花
26 遗传学报	63 植物保护学报	73 福建林学院学报
28 作物学报	64 生物工程学报	73 江苏农业科学
29 生物化学与生物物理学报	66 北京农业大学学报	73 林业科技通讯
33 水生生物学报	67 园艺学报	73 人类学学报
33 实验生物学报	68 水利渔业	73 四川动物
33 植物生态学与地植物学报	68 兽类学报	73 水土保持学报
37 生物化学与生物物理进展	68 生物化学杂志	73 应用生态学报
40 中国兽医杂志	68 土壤通报	73 中国果树
41 古生物学报	69 昆虫知识	73 中国林业科学
41 畜牧兽医学报	69 植物学通报	73 中国畜牧杂志
42 水生生物学集刊	70 福建农学院学报	73 中国畜禽传染病
45 淡水渔业	70 中国麻作	73 中国油料
45 生物物理学报	70 植物保护	73 浙江农业大学学报
47 云南植物研究	70 植物病理学报	73 真菌学报
50 林业科学研究	70 植物生态学与地质学丛刊	73 西北农业大学学报
52 植物分类学报	71 东北农学院学报	