

微载体培养次代猴肾细胞

姜述德 管政德 陶永莲 唐桂珍 马力 董德祥

(中国医学科学院医学生物学研究所)

自从1967年Van Wezel⁽¹⁾首先采用微载体培养技术以来,目前在微载体上培养的细胞已经超过60种,培养规模从几毫升到几百升。由于该法增大了培养面积,改善了培养条件,可获得大量的细胞,从而生产出大量病毒和细胞产物,目前已用于生产灭活的脊髓灰质炎和狂犬疫苗^(2,3)。

本文报道搅拌速度,静置时间,接种细胞浓度,培养液成分以及载体浓度对微载体培养次代猴肾细胞的影响。使用1毫克/毫升的载体浓度,找出了较好的试验条件:接种细胞浓度20万/毫升,静置时间15小时,搅拌速度45转/分,通入5%CO₂空气的速度50—100个泡/分,气泡直径约3毫米,培养液的成分补充加谷氨酰胺和半胱氨酸的0.25%乳蛋白水解物Earle氏液。

材料和方法

细胞 次代猴肾细胞。

载体 Cytodex 1使用前在PBS中洗涤3次,并经高压蒸气灭菌。

培养容器 500毫升广口试剂瓶,装置电动搅拌器,搅拌轴下端安装6片大小为13×20毫米,角度为45°的搅拌叶片。

5% CO₂ 用自制的气体混合器(云南省医疗器械厂协助制作)制备。空气由小型空气压缩机压出,CO₂由压力瓶中压出,两者在相同压力下(1.5公斤/平方厘米)按体积计以20:1(空气/CO₂)的气体流量压入医用氧气袋,使用时,把氧气袋中的5% CO₂通过橡皮管,除菌过滤棒,0.05% CuSO₄溶液和玻璃管直接通到培养液中。

培养液 通常采用0.25% Difco乳蛋白水解物EaHe氏液加谷氨酰胺100毫克/升,半胱氨酸20毫克/升,碳酸氢钠660毫克/升,青霉素100单位/毫

升和链霉素100微克/毫升。

培养过程 6—7天生长良好的原代恒河猴(*M. Rhesus*)肾单层细胞,用0.1%胰蛋白酶加0.08% EDTA消化成单个分散细胞,在培养液中稀释成一定浓度,接种于500毫升广口试剂瓶,每瓶150—250毫升,加入Cytodex 1,置37℃培养,首先静置约15小时(静置期间每隔2小时搅拌一次培养物,使载体小球悬浮数分钟),此后用电动搅拌器连续搅拌。培养过程中连续通以含5% CO₂的空气,通入速度约50—100个泡/分(1.5—2毫升/分),溶液中喷出的气泡大小,直径约3毫米,一般经过4天,细胞即可长成单层。

细胞观察和计数 在显微镜下直接观察细胞在微载体上的附着和生长情况,每次至少取三个视野,并计数50个以上的载体小球,细胞在小球上的生长情况划分为5个等级,以4,3,2,1,0表示,各自代表细胞在小球上的生长面积是80—100%,50—80%,25—50%,<20%和0%。实验中以48小时的细胞生长情况作为指标。

细胞计数 采用计数细胞核的方法,取2毫升混合均匀的培养物,低速离心弃去上清后,加入0.1%枸橼酸结晶紫液重新悬浮小球,37℃孵育1小时,在血球计数板上计数细胞核。或者用0.01%胰蛋白酶加0.06% EDTA室温消化10分钟后,用结晶紫染液染色计数细胞。

结 果

一、细胞在微载体上的生长情况

细胞接种到微载体悬液中后,10分钟内即吸附到载体小球上,6—8小时细胞开始分裂,此后分裂细胞数逐渐增加,20小时有部分细胞即长成片。24小时约有20%的小球基本

* 由Robert Bywater Ph D (Pharmacia Fine Chemicals AB, Box 175, S-75104 Uppsala 1, Sweden) 赠给。

上长满了细胞，48小时长满细胞的小球数达50%左右，通常4天时有95%以上的小球，可长成致密的单层细胞，细胞生长情况见图2和图3。

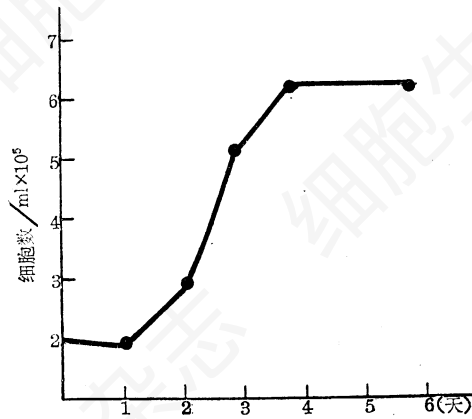


图1 次代猴肾细胞在Cytodex 1(1毫克/毫升)上的生长曲线

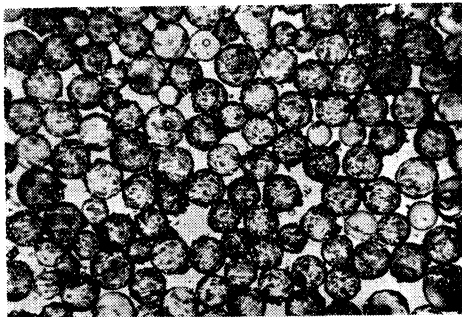


图2a 在Cytodex 1上生长4天的次代猴肾细胞，接种细胞数20万/毫升，Cytodex 1 1毫克/毫升(×60)

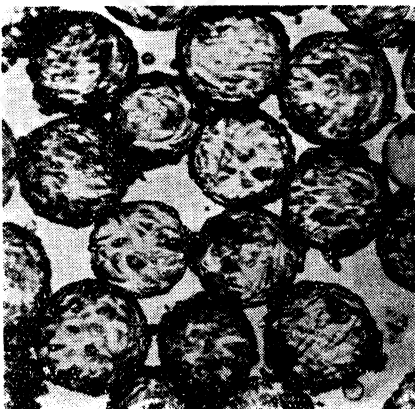


图2b 为图2a一角放大(×120)

二、影响细胞生长的因素

1. 搅拌速度 采用三种搅拌速度培养细胞，从表1的结果可以看出，以45转/分的搅拌速度最好。

2. 静置时间 实验分3组进行，一组不静置，接种细胞后立即搅拌，另外二组分别静置15小时和24小时后开始连续搅拌，静置期间每隔2小时搅拌培养物数分钟，结果见表2。

表2所见，随着静置时间延长，细胞生长情况也渐好。

3. 接种细胞数 载体浓度为1毫克/毫升时，不同接种细胞数对细胞生长的影响列于表3，由表3可见接种细胞数低时(10万/毫升)，细胞生长较差。

表1 搅拌速度对细胞生长的影响

速度	细胞生长* (48小时)				
	4	3	2	1	0
30 rpm	36.4 ⁺	22.7	14.8	20.5	5.7
45 rpm	57.3	25.3	16.0	1.3	
60 rpm	48.8	28.1	17.5	11.3	1.3

* 4, 3, 2, 1, 0 分别代表细胞在小球上的生长面积是80—100%，50—80%，20—50%，<20%和0%。

+ 细胞生长面积达80—100%的小球所占的百分数。

表2 不同静置时间对细胞生长的影响

静置时间 (小时)	细胞生长 (48小时)				
	4	3	2	1	0
0	30.3	29.0	20.0	10.5	10.2
15	53.3	18.2	11.7	8.1	8.7
24	62.2	31.6	4.1	1.0	1.0

表3 接种细胞数对细胞生长的影响*

接种细胞数 万/毫升	细胞生长 (48小时)				
	4	3	2	1	0
10	33.3	20.5	13.8	10.4	21.9
20	57.9	20.8	5.6	11.1	4.7

* 三次实验的平均值。

4. 培养液种类 实验采用了四种培养液, Eagle, 199; 0.25%乳蛋白水解物 Earle 氏液加谷氨酰胺 100 毫克/升, 半胱氨酸 20 毫克/升(简称“乳”); 0.1%酪蛋白水解物 Earle 氏液加胱氨酸 20 毫克/升, 亮氨酸 60 毫克/升, 异亮氨酸 2 毫克/升, 半胱氨酸 20 毫克/升和谷氨酰胺 100 毫克/升(简称“七一”)。各种培养液均加入 10% 小牛血清。表 4 的结果表明, 上述四种培养液中以“乳”组较好。

表 4 不同培养液对细胞生长的影响*

培养液	细胞生长(48小时)				
	4	3	2	1	0
“七一”	61.9	10.6	15.6	10.8	1.1
“乳”	70.1	13.1	8.9	6.2	1.8
Eagle	46.1	16.0	16.4	14.9	6.6
199	53.9	17.0	14.0	11.2	3.9

* 两次实验的平均值。

5. 载体浓度 用(1)1毫克/毫升, (2)2毫克/毫升, (3)3毫克/毫升和(4)4毫克/毫升的载体浓度作实验, 结果见表 5, 6。

表 5 20 万/毫升的细胞在不同载体浓度上的生长情况*

载体浓度	细胞生长(48小时)				
	4	3	2	1	0
(1)	41.3	18.1	11.7	12.8	16.1
(2)	18.7	17.2	14.4	10.7	39.2
(3)	13.0	14.6	10.0	25.4	37.0
(4)	11.2	3.5	5.5	21.7	58.2

* 两次实验的平均值。

表 5 和表 6 指出: 随着载体浓度增加, 所需的接种细胞数也应相应增加。对于 1, 2, 3, 4 毫克/毫升的载体浓度, 分别需接种 20, 30, 45, 60 万/毫升的细胞, 才能生长得最好。

三、微载体培养与静置单层培养的比较

500 毫升广口试剂瓶中, 接种 20 万/毫升的次代猴肾细胞悬液 250 毫升, 加入 Cytodex 1

表 6 不同细胞浓度在不同载体浓度上的生长情况*

载体浓度	细胞浓度 万/毫升	细胞生长(72小时)				
		4	3	2	1	0
(1)	20	70.5	9.1	11.7	8.7	
(2)	30	67.6	12.3	9.9	9.9	0.3
(3)	45	58.3	20.2	14.1	7.0	0.3
(4)	60	60.7	12.6	14.0	11.1	1.7

* 三次实验的平均值。

250 毫克, 进行微载体培养。与此同时, 采用容量 100 毫升的小方瓶和容量 1000 毫升的大扁瓶, 分别接种 7.5 万/毫升的细胞悬液 20 毫升和 150 毫升进行静置单层培养。经 4 天后各组培养物均可长成单层。结果见表 7。

表 7 微载体培养与静置单层培养的比较

培养方法 (毫升/瓶)	培养面积 (平方米/厘米)	培养面积/容量	接种细胞数 万/瓶	细胞产量 万/瓶	微载体 细胞产量 静置单层 细胞产量
微 500	1500	3	5000	15500	
静 100	36	0.36	150	420	37.0
静 1000	200	0.20	1125	3400	4.6

表 7 表明, 采用 500 毫升广口试剂瓶和 1 毫克/毫升的载体浓度进行微载体培养, 其培养面积/容量的比值远较静置单层培养大得多。所获细胞产量分别相当于 37 个容量 100 毫升的小方瓶和 4.6 个容量 1000 毫升的大扁瓶的细胞产量。

讨 论

本试验采用次代猴肾细胞进行微载体培养, 比较了一些因素对细胞培养的影响, 结果表明, 用于微载体培养的细胞, 以单个分散细胞较好, 如果单独用胰蛋白酶消化细胞, 所获细胞团块较多, 不利于微载体培养。试验中采用了 0.1% 胰蛋白酶加 0.08% EDTA 消化液, 所获细胞基本上都是单个分散的, 有利于微载体培养。开始培养时, 静置一段时间, 有利于细胞附着。接种细胞数需达到一定浓度, 浓度太低则空白小球率增加。搅拌速度对培养

细胞有较大的影响,速度太低载体小球悬浮得差,速度太高又不利于细胞贴球和生长,因而搅拌速度宜适中。培养液成分对细胞生长也有一定影响。关于影响微载体培养的因素近来已有较详细的报道^[4,5]。

十分明显,微载体培养增大了培养面积(每1克Cytodex 1的表面积是0.6平方米),随着培养面积的增大细胞产量也相应增加,而且培养液的消耗也相应减少。本试验采用500毫升广口试剂瓶和1毫克/毫升的载体浓度,当接种250毫升细胞悬液时,获得的细胞产量分别相当于37个容量100毫升小方瓶和4.6个容量1000毫升大扁瓶的细胞产量。如果把载

体浓度增加2,3和4倍则培养面积亦相应增加,精密地控制各参数可获得更高产量的细胞,从而生产出大量病毒和细胞产物。因而微载体培养法是一种发展中的有实用价值的方法。

参 考 文 献

- [1] Van Wezel, A. L., 1967, *Nature*, 216: 64.
- [2] Van Wezel, A. L., et al., 1978, *Develop. Biol. Standard*, 41:159.
- [3] Van Wezel, A. L., et al., 1980, *ibid.*, 46: 151.
- [4] Clark, et al., 1980, *ibid.*, 46:117.
- [5] Hirtenstein, M. et al., 1980, *ibid.*, 46: 109.

β -丙内酯用于病毒介导的细胞融合的研究*

郑瑞珍 王素敏 赵淑慧

(中国科学院动物研究所)

制备高效和安全的仙苔病毒细胞融合剂,事先必须灭活。当前灭活病毒一般都采用紫外线^[1,2]或 β -丙内酯(β -PL)^[3],但前者灭活病毒往往不完全,有细胞毒作用,对有些敏感细胞不适用,利用 β -PL灭活病毒较完全,但它是一种强诱变剂和有毒药物,故必须谨慎从事。但目前各国有关实验室所用 β -PL的剂量较高,对残留 β -PL**的细胞毒性和诱变性未见有报道。本文就不同浓度的 β -PL对仙苔病毒几种活性的影响及残留 β -PL的细胞毒性及诱变性进行分析,以期获得一更合理和更安全的灭活浓度。

材 料 和 方 法

- 一、仙苔病毒的制备和灭活 同以前所述^[4]
- 二、血凝效价(HAU),融合效力和感染力的测定 HAU的测定按Salk(1944)的方法,用1%鸡

红血球滴定;融合效力的测定方法同1980所述^[4],感染力的测定,用含病毒的尿囊液原液0.2毫升,接种于鸡胚尿囊腔。每组各接种四个鸡胚,在35℃孵育72小时,然后分别收获,分别细菌检查和HAU滴定,然后把无菌的尿囊液按组混合在一起,进行第二次感力测定。

三、残留 β -PL诱变性分析 用人外周淋巴细胞染色单体交换(SCE)技术来检测 β -PL的诱变性。 β -PL的制备模拟病毒的过程,但不加病毒。实验用0.01%和0.05% β -PL两种浓度进行分析,各分四组:(1)新鲜制备不经热处理;(2),(3)一周前制备各经37℃热处理30分和60分;(4)空白对照,不加 β -PL。每组2瓶,每瓶含MEM培液3.8—3.9毫升。

* 复旦大学遗传所邱信芳和李昌本同志,暨南大学沈锦南同志及中山医学院肿瘤所邓承宗同志参加了部分工作,特此谨致谢意。

** 指加到病毒悬液中的 β -PL经热处理没有完全降解部分。