

用微载体悬浮培养大量生产 高活性鼠干扰素

肖成祖 张吟庵 孔惟惟 王宏霞

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

提 要

用自制的 MC-1 型微载体进行悬浮培养, 当其浓度为 5mg/ml 时, 可较好地用以培养和增殖鼠 L929 细胞。当接种细胞量为 30×10^4 /ml 左右时, 一般在 3 天即可增殖至 1×10^6 细胞/ml。用 25IU/ml 鼠 IFN 启动 12—24 小时, 用 NDV 作诱生剂, 并采用环己亚胺 (20 μ g/ml) 和放线菌素 D (2 μ g/ml) 进行超诱导, IFN 产量可高达 1×10^5 IU/ml 左右, 比活接近 1.3×10^5 IU/ml 蛋白。尽量去除培养基, 加胰酶—柠檬酸盐消化和高速搅拌, 使细胞从载体上分离, 再加新鲜培养基和微载体的方法进行扩大生产看来是可行的。这些实验表明采用微载体悬浮培养细胞的技术将更适于 IFN 的工业化生产。

1983 年我们曾报告用我院自制的 MC-1 型微载体结合转瓶系统生产高比活鼠干扰素 (IFN) 获得了成功^[1], 该法的优点是操作简便, 勿需特殊设备, 对于一般实验室规模的生产是比较适宜的。但该系统还不能满足工厂性生产的需要, 为此我们对微载体的悬浮培养作了进一步的观察。试验仍用鼠 L929 细胞作为生产细胞, 用新城疫苗病毒 (NDV) 作为诱生剂, 以此观察用该法大量生产 IFN 的可能性, 实验的结果是令人满意的。

材 料 和 方 法

细胞、病毒及代谢抑制剂 L929 细胞由病毒研究所惠赠, 诱生病毒为 NDV B₁ 株, 用 9 日龄鸡胚尿囊腔增殖, 血凝滴度为 640—1280 HAU/ml。环己亚胺为瑞士 Fluka 公司产品, 批号 210839, 放线菌素 D 是美国 Sigma 公司的产品。

微载体 MC-1 型, 由我院二所马立人教授等协助, 用国产的 DEAE 和 Sephadex G50 制成, 粒径为 75—120 μ , 阴离子交换量为 1.4 meq/g。先用 PBS (pH 7.2—7.3) 膨胀过夜, 经 15 磅 20 分灭菌, 置 4 $^{\circ}$ C 保存待用。

细胞培养 培养基用 Eagle MEM, 加 5% 小牛血清, 2500u/ml 卡那霉素, 200u/ml 庆大霉素, 10mM HEPES 液。pH 用 NaHCO₃ 调至 7.2 左右。培养搅拌器采用美国 Whel-

注: 本工作中得到马立人、陈邦本、辛颜彬、武生明、张松和曹军田等同志的帮助, 特此致谢
本稿 1987 年 2 月 16 日收到

ton Biostir 产品, 为了保持低速稳定, 并减少电机产热, 我们采用了 110V 稳压电源, 并在搅拌器和培养瓶之间加塑料衬垫, 使之隔热。为了使微载体在尽可能低速下不沉降, 我们在 Whelton 培养瓶的搅拌轴上加一带有球形头部的侧棒, 这样搅拌速度可保持在 50r/m 左右, 而无微载体沉积在周边的现象。培养前先用甲基硅树脂酒精溶液将培养容器硅化。微载体浓度一般采用 5mg/ml, 用培养基洗去 PBS, 然后加入细胞和所需量的培养基, 立即搅拌或前两小时作间隙搅拌, 即静止 30 分钟, 搅拌 1-2 分钟, 两小时后再作连续搅拌。培养过程中每天换液 1/2—3/4 量, 同时取样计数。

细胞计数 基本上仍按前文^[1]介绍的计数细胞核的方法进行。为了使取样有代表性, 均在搅拌条件下取样, 每次取样 2-3ml。待微载体沉下后吸去培养基, 加入等量 0.1% 结晶紫柠檬酸液, 37℃ 保温 1 小时, 然后强烈振摇, 并用吸管吹打, 取样在血球计数板上计数。

IFN 诱生 根据我们用 SM 细胞生产人 IFN- β 的经验^[2], 此次我们进一步试验用病毒超诱导的方法提高了鼠 IFN 的产量。具体方案是诱生前一天用 25 iU/ml 鼠 IFN 启动, 诱生时用 NDV 250HAU/ml, 同时加环己亚胺 20 μ g/ml, 4 小时后加放线菌素 D 2 μ g/ml, 继续作用 1—1.5 小时, 最后用 Hanks 液洗三次, 加 2% 血清的生产液, 24 小时左右取上清, 调 pH 至 2, 即为粗制 IFN。

IFN 测定 仍采用微量板染色测定法^[3], 测定细胞为 L929 细胞, 攻击病毒为 VSV, 测定结果均用国际 IFN 参考品标定为 IU/ml。

蛋白测定 用 WFZ800-D2 型紫外分光光度计测定 OD 值, 并用 Kalcker 计算法^[1]计算蛋白浓度。

扫描电镜样品的制备 取细胞培养样品后, 尽量去除培养基, 加 3.1% 戊二醛固定, 然后用磷酸缓冲液 (0.15mol/L, pH7.2—7.4) 漂洗 3—4 次, 接着再用 1% 锇酸固定, 接着用 50%, 70%, 80%, 90% 和 100% 的酒精脱水, 各 10 分钟, 再用醋酸异戊酯置换 2 小时以上或过夜, 用日本 HCP-2 临界干燥器进行 CO₂ 临界点干燥, 最后用日本 IB-5 离子镀膜机进行铂金离子溅射, 用日本的 S450 扫描电镜观察并摄影。

结 果

细胞在微载体上的附着和增殖 用我院自制的 MC-1 型微载体进行细胞培养, 无论在培养开始阶段采用间隙搅拌或连续搅拌, 都可见细胞很快地附着于载体, 并伸展和增殖, 从电镜可见细胞体紧密地贴附于载体, 一个载体上可生长有上百个细胞, 并可明显地看出细胞分裂的现象 (图 1, A.B.)。一般第一天增殖较慢, 接着加快, 到第三天就可达到 1×10^6 细胞/ml。但进一步培养就可见细胞脱落增多, 这可能与培养基的 pH 与氧的供应不易控制有关 (图 2)。

IFN 诱生方法的比较 以前我们曾报告用少量 IFN 启动可增加 L929 细胞的 IFN 产量^[4], 此次我们进一步比较了单启动以及启动加上代谢抑制剂的超诱导方案对 IFN 产量的影响, 结果 (表 1) 可见启动加上超诱导可进一步增加 L929 细胞的 IFN 产量, 平均增加 6.88 倍。

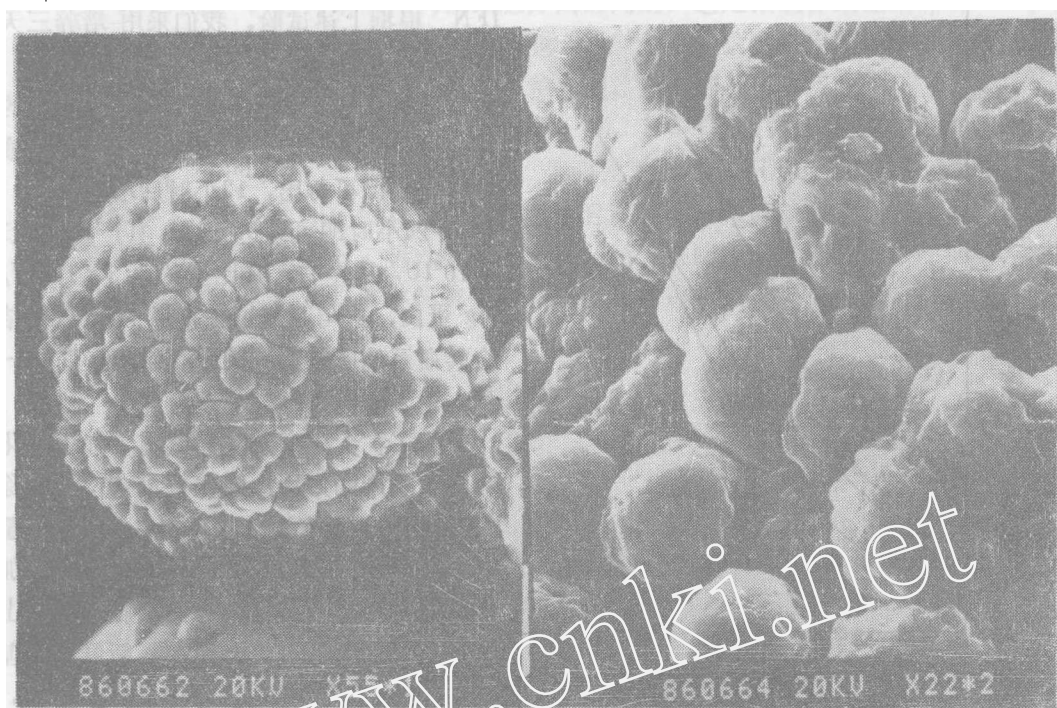


图1 生长在MC-1型微载体上的L929细胞的扫描电镜显微摄像 A.放大550倍 B.放大2200倍
Fig.1 Scanning electron micrographs of L929 cells growing on MC-1 microcarriers. A. magnification 550x, B. magnification 2200x.

表 1 L929 细胞在两种不同诱生条件下的 IFN 产量

Table 1 The IEN yield of L929 lines at two different inducing conditions

实 验	单纯起动 (LogIU/ml)	起动+超诱导 (LogIU/ml)	起+超/起
1	3.76	4.42	4.58
2	3.21	4.29	11.91
3	3.26	4.37	12.80
4	4.70	5.24	3.38
5	4.71	4.95	1.73

表 2 微载体悬浮培养的 L929 细胞超诱导后不同时期的 IFN 产量

Table 2 The IEN yield of L929 cells cultured by microcarrier suspension after superinduced for various time

时间(h)	1/6	1/3	4	7	12	15	18	19	21	22	24	26
IEN产量* (IU/ml)	<558	11335	14018				62089		103214 [△]		62089	
		1876			13000	26000	41014		58591		91732 ⁺	

*上下为两次试验结果 [△]比活为 1.05×10^5 IU/mg 蛋白 ⁺比活为 1.56×10^5 IU/mg 蛋白

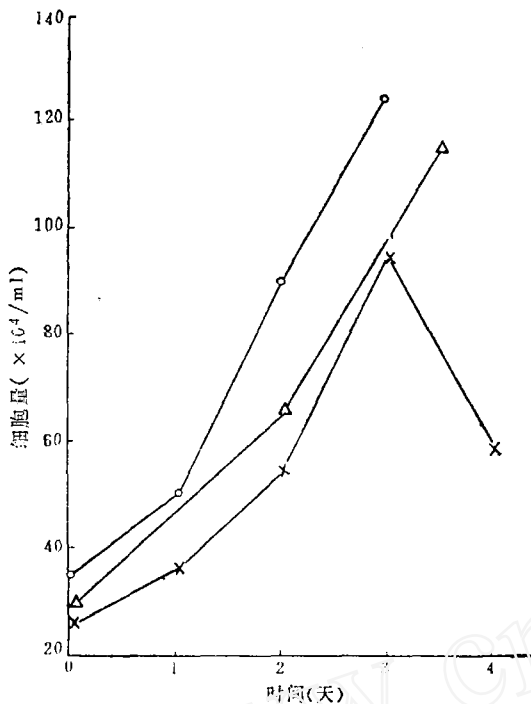


图2 L929 细胞在微载体上增长曲线
细胞接种量: o-o 35×10^4 /ml, Δ - Δ 30×10^4 /ml,
x-x 26×10^4 /ml, HEPES(-)

Fig 2 The proliferated curve of L929
cell line on microcarriers

Inoculated cell density: o-o 35×10^4 /ml, Δ - Δ
 30×10^4 /ml, x-x 26×10^4 /ml, HEPES(-).

用微载体悬浮培养 L929 细胞并诱生 IFN 根据上述试验, 我们采用培养三天的细胞, 并用启动加超诱导的诱生方案, 试验了生长在微载体上的细胞生产 IFN 的能力。实验证明 IFN 的诱生在置换生产液后 10 分钟即可测出, 12 小时后增加迅速, 到 20-24 小时即可到达高峰, 其产量可达 1×10^5 IU/ml 左右, 其比活约 1.3×10^5 IU/mg 蛋白, 这与我们过去报道的微载体结合转瓶系统所能达到的最高结果基本一致。

为了扩大生产, 我们试用了如下消化和扩大生产的方法: 即先将培养基尽量除去, 用 Hanks 液洗一次后加入 1/4 剩余量的 1% 胰酶-柠檬酸盐消化液, 消化完毕, 加入适量培养基, 用高速搅拌使细胞从载体上分离, 然后按所需扩大量加入新鲜培养基和微载体, 我们一般是按 3 倍量扩大生产, 从 25ml 到 80ml 至 200ml, 结果均取得了成功, 上述 IFN 诱生试验都是在扩大生产后进行的。

讨 论

微载体细胞培养用于 IFN 生产已有不少报告, 多数是用于人 IFN- β 的生产^[5-7]。1983 年我们曾报告用转瓶结合微载体培养系统生产了高比活的鼠 IFN。以后长春兽医学大学将该法用于病毒的生产^[8], 也证明了它确实是一种简便有效的增产手段。但是从工业化生产的角度考虑, 它的生产面积仍然有限, 仍不如文献上报导的用发酵罐生产理想, 如 Edy 等^[6] 已用 50 升的罐子进行人 IFN- β 的生产。从我们这次实验看, 采用微载体悬浮培养, 只要掌握好条件, 细胞及其 IFN 产量都可以达到转瓶结合微载体同样的甚至更高的程度。要使培养成功, 关键在于转速, 要使转速保持在使微载体悬浮的最低转速, 而且要稳定, 这里搅拌轴叶片的形式看来很值得研究, 此次我们参照 Hirtenstein 的介绍^[9], 在轴上加上一球形侧棒取得了成功。其次是 pH 的控制和氧的供应, 这在较大的具有自动化仪表的设备上也许不会成问题, 目前在试验设备上的解决办法是靠勤换液和加入 HEPES 缓冲剂。在培养开始阶段, 是采用间隙搅拌好呢, 还是连续搅拌好, 各家说法不一。我们从实践中注意到, 连续搅拌细胞的附着较均一, 而间隙搅拌可减少细胞的游离率, 各有优缺点, 可能要根据不同细胞的特性来决定采用那种方法。

为了扩大生产, 还得解决如何使细胞分离的问题, 这是微载体细胞培养中一个难点, 有的采用低钙培养基^[10], 有的采用胰酶消化^[11], 我们这次采用胰酶—柠檬酸盐消化加高速搅拌看来是可行的, 但是否适于各种细胞, 还有待进一步实践。

实验表明我院制备的 DEAE-Sephadex A-50, MC-1型微载体适于 L929细胞的增殖和生产 IFN, 在5mg/ml 时未见明显毒性。但也发现有某些不足, 如粒度不均一, 常常可见直径较大的载体上很少附着细胞, 而且也容易脱落, 相信粒径控制在70-100 μ 之间或更窄的范围, 效果会更好。另外见破碎较多, 而这些碎片常常附着较多的细胞, 在换液过程中这些碎片, 连同细胞容易被丢弃, 所以如何进一步改进微载体的结构也值得好好研究。

参 考 文 献

- [1] 肖成组等, 1983, 军事医学科学院院刊(2): 195.
- [2] 李广善等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志, 5(4): 254.
- [3] 肖成组等, 1983, 军事医学科学院院刊(3): 353.
- [4] 熊绍银等, 1983, 军事医学科学院院刊(3): 339.
- [5] Giard, D.J. et al., 1980, *Antimicrob. Agents Chemother.* 18(1): 130.
- [6] Edy, V.G. et al., 1982, *Tex. Rep. Biol. Med.* 41: 169.
- [7] Clark, J. M. et al., 1981, *J. Interferon Res.* 1(3): 391.
- [8] 陶全富等, 1986, 首届全国病毒学学术会议论文集 P. 231.
- [9] Hirtenstein, M.D. et al., 1982, *Develop. Biol. Standard* 50: 73.
- [10] Crespi, C.L. et al., 1981, *Biotechnol. Bioeng.* 23(5): 983.
- [11] Hu, W.S. et al., 1985, *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1466.

PILOT PRODUCTION OF HIGH-TITRE MOUSE INTERFERON WITH MICROCARRIER SUSPENSION CULTURE SYSTEM

Xiao Chen-zu Zhang Yi-nan Kong Wei-wei Wang Hong-xia

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of
Military Medical Sciences, Beijing)

With MC-1 type microcarrier at concentration of 5mg/ml, the mouse L929 cell line could attach and proliferate on them very well if the stirring speed was lower than 50 r/m. When the cell density was inoculated about 30×10^4 /ml, it could proliferate to 1×10^6 /ml after 3 days generally. At this time, priming with 25 IU/ml mouse IFN about 12-24 h and then induced with NDV

and superinduced with cycloheximide (20 μ g/ml) and actinomycin D(2 μ g/ml), the titer of IFN in the media would be 10⁵IU/ml approximately, or 10⁵IU/mg of protein, expressed in specific activity. With trypsin-citrate solution and more rapid stirring speed, the cells could be released from microcarriers satisfactorily. These experiments showed that the microcarrier suspension culture system was more suitable one to produce high-titre low-cost interferon for industrial scale.

国际生物化学会议在北京召开

INTERNATIONAL MEETING ON BIOCHEMISTRY

17—22 AUG 1987 BEIJING CHINA

由中国生物化学学会组织的国际生物化学会议(IMB), 于1987年8月17日到22日在北京富丽堂皇的长城饭店召开。

在8月17日下午的开幕式上, 国际生化会议组委会主席、中国生化学会主席王应睐教授首先发言。我国著名生物化学家曹天钦、邹承鲁、张龙翔教授都是大会组委会副主席。中国科学技术协会负责同志也到会祝贺。参加这次会议的正式代表来自世界各地30多个国家与地区, 共计400多人, 其中美国代表107人, 苏联代表也有29人, 如包括我国参加旁听的人数在内, 总共超过千人。这是在中国首次举行规模如此空前盛大的国际生化学术讨论会。

开幕式后, 美国Purdue大学著名病毒生化学家Rossmann教授首先作了题为“小RNA病毒的结构、功能与进化”的报告, 这是大会发言中有关病毒的唯一论文。诺贝尔奖金获得者、美国Stanford大学Kornberg教授和中国科学院生物物理所邹承鲁教授也在大会上作了学术报告。

大会收到汇编成册的400多篇论文共分: (1) 胰岛素: 结构、功能与机制; (2) 生物学活性多肽与蛋白质; (3) 糖结合物; (4) 病毒; (5) 生物能与生物膜; (6) 酶; (7) 核酸与基因表达; (8) 生殖生物化学; (9) 遗传工程; (10) 免疫生物化学。其中以酶学的论文最多, 达100多篇, 有关病毒生化的论文不到20篇。

在病毒专题讨论会上, 中国科学院上海生物工程中心孙玉昆教授首先作了题为“家蚕*Bombyx mori* 胞浆多角体病毒(CPV)复制机制”的报告。会上还有美国加州Berkeley大学Botchan教授的报告“基因转录与DNA复制间的偶联: 牛乳头状瘤病毒的研究”, 丹麦Aarhus大学Dai, H.Y教授(华人)的报告“MuLV LTR细胞型特异性转录性质”, 苏联科学院发育生物学研究所Mikhailov教授的报告“家蚕核型多角体病毒DNA聚合酶的研究”和美国Case Western Reserve大学Kung H.J.教授(华人)的报告“逆转录病毒(Retrovirus)对致癌基因的活化作用”。

从病毒专题讨论会已不难看出中外华人科学家在这次国际生化会议上占有相当的比例与地位, 特别可喜的是其中有不少青年科学家在各专题会上发言, 无疑对国际生物化学科学的发展起着骨干与栋梁作用。

(陈明彬)