

胎牛血清和新生牛血清体外培养 动物细胞的效果比较

马桂兰^{1,2}, 暴艳敏², 徐水林², 孔来信³, 王家敏¹, 马忠仁¹, 乔自林¹

(1. 甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 甘肃 兰州 730030; 2. 兰州民海生物工程有限公司, 甘肃 兰州 730030; 3. 甘肃中医学院 公共课部, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 为了比较进口胎牛血清、国产胎牛血清和国产新生牛血清的细胞培养效果, 以 2 批进口胎牛血清、3 批国产胎牛血清和 2 批国产新生牛血清为试验材料, 采用细胞贴壁传代培养、最大增殖浓度和倍增时间以及集落形成率 3 种方法, 比较了 7 批供试血清对 VERO、CHO-K1、MDCK 和 HeLa 4 种细胞的培养效果。结果表明: 连续传代培养时所有牛血清均有较好的促细胞生长的效果; 进口胎牛血清、国产胎牛血清和国产新生牛血清对 4 种细胞的平均最大增殖密度为 67.8×10^4 、 62.1×10^4 和 64.8×10^4 $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均倍增时间为 22.2、22.5 和 22.7 h; 对 VERO、CHO-K1 和 HeLa 细胞的平均集落形成率为 59.2%、57.6% 和 50.9%。3 种牛血清对群性细胞培养时效果差别不明显, 对单细胞克隆培养时胎牛血清优于新生牛血清。

关键词: 胎牛血清; 新生牛血清; 贴壁培养; 生长曲线; 集落形成率

中图分类号: S852.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2014)02-0065-04

牛血清在生物医药领域中是公认的重要原材料。在我国使用最多的牛血清是胎牛血清和新生牛血清, 但胎牛血清的价格是新生牛血清的 10~20 倍, 进口胎牛血清价格则更高。从细胞培养的成本和效果综合考虑, 在开展具体工作前通过预试验选择符合要求且价格便宜的牛血清是很有必要的。该试验用 2 批进口胎牛血清、3 批国产胎牛血清和 2 批国产新生牛血清分别比较了 MDCK、VERO、CHO-K1 和 HeLa 4 种细胞的贴壁传代培养、最大增殖浓度和倍增时间以及集落形成率, 为细胞培养的相关研究和生产工作提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 牛血清 胎牛血清 (ThermoFisher, 批号 NWG0445, 实验编号: A)、胎牛血清 (BIOCHROM, 批号 1241W, 实验编号: B)、胎牛血清 (兰州民海, 批号 20091116、20101129、20120815, 实验编号:

C、D、E) 及新生牛血清 (兰州民海, 批号 20110721、20120620, 实验编号: F、G), 使用时按 10% (V/V) 添加到培养基中。

1.1.2 细胞 VERO、CHO-K1、MDCK 和 HeLa 细胞, 由甘肃省动物细胞工程技术研究中心提供。

1.1.3 设备与器材 二氧化碳培养箱 (ThermoFisher, 3111 型)、细胞分析仪 (Roche Applied science, CASY TT)、生物倒置显微镜 (Olympus, CKX-41) 等。

1.1.4 培养基和消化液 DMEM 高糖培养基用于 VERO、MDCK 和 HeLa 细胞培养 Ham's/F-12 培养基用于 CHO-K1 细胞培养, 还有胰蛋白酶 (1:250, 使用浓度为 0.25%), 均购自 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 贴壁传代培养 复苏 VERO、CHO-K1、MDCK 和 HeLa 细胞, 每株细胞扩增培养至 7 瓶 (T25), 待生长致密, 再将每株细胞用 7 批血清分别培养 6 代, 观察每代细胞在 24 和 48 h 的形态、长势和致密情况, 并在 48 h 传代。分种比例为 1:3 培养条件为 37°C 5% CO_2 。根据形态、长势和致密程度 3 项进行综合评估, 其中, 形态正常、长势优良且 100% 致密的标记为“++++”, 形态不良、生长较慢没有形成致密单层的标记为“+”, 两者之间的标记为“+++”和“++”, 最后统计每个血清培养细胞所得的“+”数。

收稿日期: 2013-09-26

基金项目: 西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (31920130066); 甘肃省科技重大专项资助项目 (1203FKDA030); 国家科技基础平台资助项目 (2005DKA21101-29)

第一作者简介: 马桂兰 (1983-), 女, 回族, 甘肃金昌县人, 在读硕士, 从事动物血清研发和质量管理工作。E-mail: 441407984@qq.com。

通讯作者: 乔自林 (1976-), 男, 学士, 高级实验师。E-mail: 670267497@qq.com。

1.2.2 低细胞浓度生长曲线 取第3代培养48 h的细胞消化后计数,按有限稀释法用添加了血清的培养液稀释至 $5\,000\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$,接种于24孔细胞培养板,每孔1 mL,置 37°C 5% CO_2 培养,从接种培养的72 h开始计数,以后每隔24 h计数,每次计数3孔,计算平均值。同法用第4代培养48 h的细胞重复一次,计算2次的平均值,根据细胞生长曲线,求最大增殖密度和倍增时间^[1-2]。对4种细胞的最大增殖密度和倍增时间按进口胎牛血清、国产胎牛血清和国产新生牛血清计算平均值。

1.2.3 集落形成率测定 按1.2.2所述方法将细胞稀释至 $10\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$,接种至96孔细胞培养板,每孔0.1 mL(每孔1个细胞),培养7~14 d,计算克隆形成率,同法用第4代培养48 h的细胞重复一次,按进口胎牛血清、国产胎牛血清和国产新生牛血清计算平均值。

2 结果与分析

2.1 细胞贴壁培养

7批血清连续传代培养VERO、CHO-K1、

MDCK和Hela细胞至第6代,所有血清均可较好地促进细胞生长,每代在48 h内均能形成致密单层,形态和长势都较好,对VERO、CHO-K1、MDCK和Hela细胞培养效果尤其出色的血清分别是AFB、DBA、BCD和ACD。根据培养过程中每代细胞的形态、长势和致密程度进行综合评价(见表1),7批血清培养细胞效果见图1。

表1 细胞贴壁培养效果评价

Table 1 Evaluation of cell adherent culture effectiveness

细胞名称 Cell line	评估结果 Evaluation results	
	4+	3+或2+
VERO	A、F、B	C、D、E、G
CHO-K1	D、B、A	E、G、C、F
MDCK	B、C、D	F、A、G、E
Hela	A、C、D	B、F、E、G

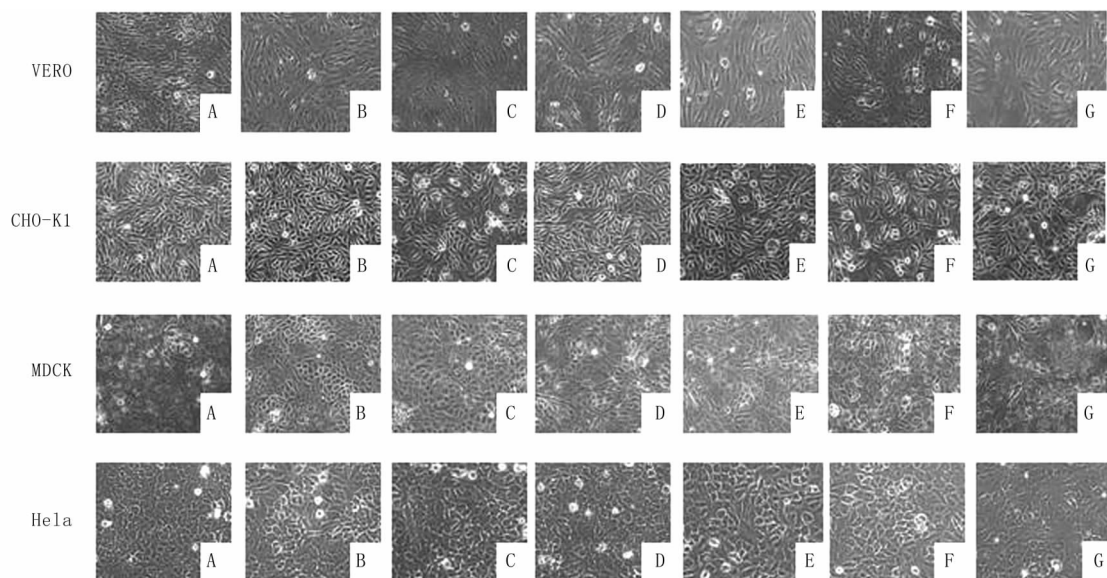


图1 7批血清贴壁培养VERO、CHO-K1、MDCK和Hela细胞第6代48 h的生长状态

Fig.1 Morphology of VERO, CHO-K1 and Hela cells culture by 7 bovine serum, sixth subculture 48 h

2.2 最大增殖浓度和倍增时间

2批进口胎牛血清、3批国产胎牛血清和2批国产新生牛血清对VERO、CHO-K1、MDCK和Hela 4种细胞的平均最大增殖密度为 67.8×10^4 、 62.1×10^4 和 $64.8 \times 10^4\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,平均倍增

时间为22.2、22.5和22.7 h,各类血清之间差别较小。根据7批血清低密度培养VERO、CHO-K1、MDCK和Hela细胞的生长曲线,计算出最大增殖密度和倍增时间见表2。

表 2 细胞最大增殖密度和倍增时间比较

Table 2 Comparison on Max proliferation concentration and population doubling time of cells

细胞名称 Cell line	项目 Items	A	B	C	D	E	F	G
VERO	最大增殖密度/ $10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$	39.4	41.0	36.0	36.9	37.0	39.5	39.6
	倍增时间/h	29.5	29.0	28.1	30.1	28.3	29.6	29.1
CHO-K1	最大增殖密度/ $10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$	86.7	94.1	85.7	77.0	95.0	80.1	91.8
	倍增时间/h	18.6	20.0	18.7	19.3	19.0	20.3	18.4
MDCK	最大增殖密度/ $10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$	72.5	73.0	67.8	70.5	50.8	67.2	66.5
	倍增时间/h	21.1	20.0	20.7	19.1	23.7	22.0	21.9
Hela	最大增殖密度/ $10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$	71.0	64.7	62.4	66.0	60.3	68.8	64.8
	倍增时间/h	19.7	19.9	21.0	21.7	20.6	20.6	19.5
x	最大增殖密度/ $10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$	67.8		62.1		64.8		
	倍增时间/h	22.2		22.5		22.7		

2.3 有效集落的形成

7 批血清培养 Vero、CHO-K1 和 Hela 细胞均形成了有效集落,平均集落形成率为 59.2%、57.6%和 50.9%,各组之间差别较大。其中 CHO-K1 集落的

细胞形态好、数量多(见图 2),而 MDCK 细胞从 96 h 起形成的小集落细胞开始崩解,细胞集落不完整。Vero、CHO-K1 和 Hela 细胞的集落形成结果见表 3。

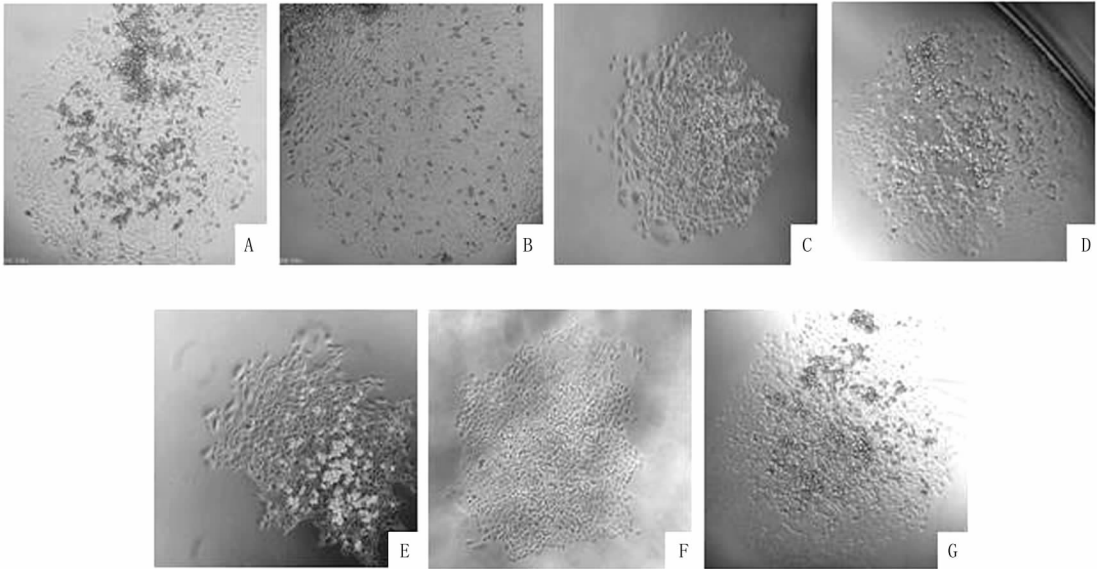


图 2 7 批血清培养 CHO-K1 细胞 192 h 形成的集落

Fig. 2 CHO-K1 cells colony formation cultured by 7 batches bovine serum for 192 h

表 3 细胞集落形成率比较

Table 3 Comparison on cloning efficiency

血清编号 No.	集落形成率/% Cloning efficiency			
	x	VERO	CHO-K1	Hela
A	46.9	157.1	72.9	59.2
B	43.8	67.8	66.7	
C	43.8	64.6	68.0	57.6
D	47.9	74.0	57.3	
E	42.7	69.8	50.1	
F	50.0	52.1	44.8	50.9
G	43.7	68.8	46.0	

3 结论与讨论

通过贴壁培养、低密度生长曲线和集落形成情况验证了细胞在群体培养情况下有群体性效应存在^[3-4],细胞容易生长,这样可以通过预试验筛选出物美价廉的牛血清;但在单细胞克隆培养时,细胞失去了群体效应支持,生长变得艰难,对培养所需牛血清的要求高,胎牛血清的效果比新生牛血清要好。

牛血清是组织培养中最常用的血清,其质量直接关系到研究进度和生产效益。低细胞密度生

长曲线和单细胞克隆率试验是针对细胞筛选血清的最佳方案^[1,5],从生长曲线上反映出血清对细胞的促生长效果,而克隆形成率则反映血清对细胞的增殖能力。该试验使用不同来源不同类别的牛血清培养 VERO、CHO-K1、MDCK 和 HeLa 细胞,采用贴壁传代培养、最大增殖密度和倍增时间以及集落形成率试验,分别筛选出了适合细胞的最佳血清,其中 VERO 细胞为 A 和 F、CHO-K1 细胞为 D 和 G、MDCK 细胞为 B 和 F、HeLa 细胞为 A 和 F,培养 VERO 和 CHO-K1 细胞时任何一种血清都可满足要求,而培养 MDCK 和 HeLa 细胞时胎牛血清更好一些。

牛血清中含有丰富的细胞生长必需的营养成分,在动物细胞培养中起着十分重要的作用^[6-7]。血清中的主要成分为蛋白质、多肽和激素等,有作用的蛋白质主要为白蛋白和球蛋白。纤维粘连素能促进细胞附着,A2 巨球蛋白有抑制胰蛋白酶的作用,转铁蛋白能结合铁离子,减少其毒性并被细胞所利用;多肽可能是血清中主要的促细胞增殖因子,它有促成纤维细胞和胶质细胞增殖的作用;激素对细胞的作用是多方面的,胰岛素有促细胞摄取葡萄糖和氨基酸的作用,它的这些作用可能与其能促进细胞分裂相关,血清中也含有不定量的氢化考的松,它可能兼有促细胞贴附和增殖作用^[8-9]。胎牛血清绝大部分的物质来自于母体,含有胚胎发育过程中必须的生长因子和激素等,而新生牛血清中这种生长因子和激素含量则减少,

含有一些离开母体后自身产生的代谢物质。对于一些培养难度大以及对培养环境要求苛刻的细胞,胎牛血清的培养效果更好。

参考文献:

- [1] The United States Pharmacopeial Convention. USP35-NF30[M]. Baltimore: The United States Pharmacopeial Convention, 2012. 1, 102-104.
- [2] 乔自林,冯玉萍,李明生,等. 兰州大尾羊耳缘组织成纤维细胞系的建立[J]. 黑龙江农业科学, 2012(10): 64-68.
- [3] Michel Godin, Francisco Feijó Delgado, Sungmin Son, et al. Using buoyant mass to measure the growth of single cells[J]. Nature Methods, 2010, 7: 387-390.
- [4] HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion [J]. Oncogene, 2008, 207: 6120-6130.
- [5] Richard Umansky. The effect of cell population density on the developmental fate of reaggregating mouse limb bud mesenchyme [J]. Developmental Biology, 1966, 13 (1): 31-56.
- [6] Freshney R Ian. -Culture of animal cell : A manual of basic technique [M]. 6th ed. New York: Wiley-Sons, 2010: 149-175.
- [7] Lanza R P, Cibelli J B, Blackwell C, et al. Extension of cell lifespan and telomere length in animal cloned from senescent somatic cell [J]. Science, 2000, 288: 665-669.
- [8] Remi, Fumit O, Yos hihis a, et al. Cell type-selective expression of green fluorescent protein and the calcium indicating protein, yellowameleon, in rat cortical primary cultures [J]. Brain Research, 2002, 956(2): 221-229.
- [9] 吴宏梅,刘帅,包阿东,等. 不同胎牛血清对动物细胞体外培养的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 34(4): 96-99.

Effect Comparison of Fetal Bovine Serum and Newborn Bovine Serum for Animal Cell Culture *in vitro*

MA Gui-lan^{1,2}, BAO Yan-min², XU Shui-lin², KONG Lai-xin³, WANG Jia-min¹, MA Zhong-ren¹, QIAO Zi-lin¹

(1. Gansu Engineering Research Center for Animal Cell, Lanzhou, Gansu 730030; 2. Lanzhou National Hyclone Bioengineering Company Limited, Lanzhou, Gansu 730030; 3. Department of Public Course, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730030)

Abstract: In order to compare the culture effectiveness of imported, domestic and domestic newborn bovine serum for animal cells *in vitro*, taking 2 batches of imported fetal bovine serum, 3 batches of domestic fetal bovine serum and 2 batches of domestic newborn bovine serum as materials, adherent cell subculture, low cell density growth curve and colony efficiency three methods were used to compare the cells culture effect of four cells of VERO, CHO-K1, MDCK and HeLa. The results showed that all bovine serum had better cell growth promoting effect by continuous subculture; average maximum density of the imported fetal bovine serum, fetal bovine serum and domestic new domestic bovine serum were 67.8×10^4 , 62.1×10^4 and 64.8×10^4 cfu·mL⁻¹ respectively, average doubling time were 22.2, 22.5 and 22.7 h; the average colony formation rate of VERO, CHO-K1 and HeLa cells were 59.2%, 57.6% and 50.9%. The effect of three types of bovine serum on different groups of cells *in vitro* were not obvious, the individual cells clone culture fetal bovine serum were better than newborn calf serum.

Key words: fetal bovine serum; newborn bovine serum; adherent cell culture; growth curve; colony formation rate