DOI:10.6660/TESFE.1996018 台灣昆蟲Formosan Entomol. 16: 177-185 (1996) 研究報告 Research report

Formosan Entomologist
Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Effects of Fetal Bovine Serum Replacements and Serum-free Medium to Culture a Spodoptera litura cell line 【Research report】

血清替代物及無血清培養液對斜紋夜蛾細胞培養之影響【研究報告】

Cheng-Jen Shih* and Jui-Chu Chang
石正人*、 張瑞珠

*通訊作者E-mail :

Received: Accepted: 1996/10/24 Available online: 1996/09/01

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the potential application of some fetal bovine serum replacements and serum-free medium for culturing Spodoptera litura cell line SL7B, whereas lipid concentrate and egg yolk emulsion failed. Both commercial serum-free media Sf900-II and newly developed serum-free medium ISC-06 were suitable for culturing SL7B cells. The maximum density of SL7B cells produced from SIC-06 and Sf900II serum-free media were 1.2×107 cells/ml and 1.7×107 cells/ml , respectively. The cell growth rate in ISC-06 serum-free medium was improved significantly as the initial cell density increased from 3×106 to 5×106 cells/ml.

摘要

利用乳清、卵黃乳化物及脂質濃縮物等血清替代物及無血清培養液，測試對斜紋夜蛾(Spodoptera litura)細胞株生長之影響。結果除了添加乳清之試驗組具有明顯的效果外，其他卵黃乳化物及脂質濃縮物等，在培養五代後，細胞相繼停止生長。添加乳清之TNM-FH細胞培養液，無論細胞生長曲線或細胞倍增時間，均與添加血清之培養液效果相似。利用已經商品化的無血清培養液(Sf900．II)及實驗室自行調配之培養液(ISC-06)均可成功培養斜紋夜蛾細胞株。利用ISC-06培養液培養之細胞株，其細胞數最高可達1.2xl07 cells/ml;而Sf900-II則可達1.7xl07, cells/ml。利用ISC-06培養液培養斜紋夜蛾SL7B細胞時，若起始培養細胞密度從3x106 cells/ml提高至5xl06 cells/ml時，可加快細胞生長速度。

Key words: Spodoptera litura, Cell fetal bovine serum replacements, serum-free medium.
關鍵詞: 斜紋夜蛾、細胞株、血清替代物、無血清培養液。

Full Text: PDF(0.45 MB)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: http://entsocjournal.yabee.com.tw

中華昆蟲 16: 177-185(1996)
Chinese J. Entomol. 16: 177-185(1996)

血清替代物及無血清培養液對斜紋夜蛾細胞培養之影響

石正人* 張瑞珠 國立台灣大學植物病蟲害學系

摘 要

利用乳清、卵黃乳化物及脂質濃縮物等血清替代物及無血清培養液，測試對斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)細胞株生長之影響。結果除了添加乳清之試驗組具有明顯的效果外，其他卵黃乳化物及脂質濃縮物等，在培養五代後，細胞相繼停止生長。添加乳清之TNM-FH細胞培養液，無論細胞生長曲線或細胞倍增時間，均與添加血清之培養液效果相似。利用已經商品化的無血清培養液(Sf900-II)及實驗室自行調配之培養液(ISC-06)均可成功培養斜紋夜蛾細胞株。利用ISC-06培養液培養之細胞株，其細胞數最高可達1.2×10^7 cells / ml；而Sf900-II則可達1.7×10^7 cells / ml。利用ISC-06培養液培養斜紋夜蛾SL7B細胞時，若起始培養細胞密度從3×10^6 cells / ml提高至5×10^6 cells / ml時，可加快細胞生長速度。

關鍵詞：斜紋夜蛾、細胞株、血清替代物、無血清培養液。

前 言

昆蟲細胞體外培養的歷史，最早是由Goldschmidt(1915)，利用昆蟲體液當作培養液，培養昔古比天蠶蛾(*Hyalophora cecropia*)的精巢細胞(spermatocytes)。Wyatt (1956)進而利用合成之培養液，並添加5%昆蟲血淋巴共同培養家蠶(*Bombyx mori*)細胞。其後Grace(1962)以化學合成之培養液，添加10%胎牛血淸，建立第一株昆蟲細胞株。此後昆蟲細胞培養被廣泛應用於各項基礎及應用項目之研究。

昆蟲細胞培養之應用範圍很廣，例如病毒致病機制之探討(Granados and Hashimoto, 1994)或病毒殺蟲劑之生產與研究改進(Granados and Williams, 1986; Holtke *et al.*, 1992)。自從Smith *et al.* (1983)建立桿狀病毒表現載體系統，生產人類β-干擾素之後，利用昆蟲細胞表現外源蛋白之研究更蓬勃發展(Wu *et al.*, 1989; Luckow, 1993)。此後，昆蟲細胞工業化之大量培養，成爲最近昆蟲學領域中重要研究項目之一。

昆蟲細胞培養液中最常添加之物質爲胎牛血淸(fetal bovine serum, FBS)。對所有昆蟲細胞之初級培養(primary culture)而言，添加胎牛血淸是必需的，一般使用濃度

*抽印本索取及論文聯繫之負責人

爲5％至20％，血清添加量會因細胞株種類之不同而有差別。添加血清的目的在於提供細胞一些生長因子、加強細胞之吸附作用及保護細胞免於裂解(Mitsuhashi, 1989)，並可加速細胞生長，縮短細胞倍增時間(Shih and Chang, 1995)。但血清價格昂貴，約佔培養液成本八成左右，且產品品質不一，因此尋求血清替代物或開發無血清培養液，乃降低細胞培養成本的捷徑。

本試驗之目的即利用已建立之斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)細胞株(Shih and Lin, 1995)，測試各種血清替代物及無血清培養液對該細胞株生長之影響，期望能降低細胞生產成本，以供將來斜紋夜蛾細胞大量培養時使用。

材料與方法

一、供試細胞株之培養

斜紋夜蛾細胞株SL7B已由本實驗室建立多年，均以TNM-FH昆蟲細胞培養液並添加8％胎牛血清培養。TNM-FH昆蟲細胞培養液，係按Grace's medium(Gibco, 11300-027)依廠商說明書調配而成，並經0.2μ孔徑之無菌過濾膜過濾。爲防止微生物污染，於培養液中另添加0.2％之Penicillin、Streptomycin(Gibco, 15070-014)及Fungizon(Gibco, 15295-017)等抗生素。細胞培養盒(25T tissue culture flask; NUNC, Cat. No. 163371)及細胞括起器(cell scraper; NUNC, Cat. No. 179693)分別購自NUNC公司。細胞培養盒置於28℃之定溫培養箱，每隔三天進行一次繼代培養。

二、細胞之適應及生長曲線測試

試驗前細胞例行培養於TNM-FH昆蟲細胞培養液中，進行胎牛血清替代物及無血清培養液試驗前，先讓細胞適應於新的培養液至少五代。適應方法爲每次繼代培養時保留一半舊培養液，並添加一半新的培養液，如此重複五代後，使原來培養之細胞充分適應各種培養條件後，再進行相關試驗。試驗時自細胞培養源中，以細胞括起器將細胞括下，然後接種SL7B細胞(細胞數：3×10^6 cells)於25T培養盒，待細胞吸附完全，將舊培養液倒出，並換以3ml供試之培養液。在倒立式顯微鏡下，定時定點拍照細胞培養盒中細胞生長情形，並用以計算培養盒中之細胞增長數目。試驗共觀察5天，10個不同生長時段，記錄細胞生長情形並求得細胞生長曲線，藉以判別各種血清添加物及無血清培養物之培養效果。

三、胎牛血清替代物對SL7B細胞培養的影響

本試驗選用乳清、卵黃乳化物及脂質濃縮物等，進行胎牛血清替代物試驗。乳清之取得乃購至市售之光泉低脂鮮乳，經28,000 rpm(Hitachi SCP 85H2, RSP28 Rotor)，4℃，20分鐘，超高速離心兩次，將大分子的蛋白質及固脂類物質等分離。取上清液再利用各種不同孔徑過濾膜，分層分次逐漸縮小濾紙孔徑過濾，最後經0.2μ濾膜過濾後，保存於4℃冰箱中備用。試驗時，分別添加4％及8％於TNM-FH培養液中，以替代血清之功能。卵黃乳化物乃將乾粉卵黃(Sigma, Cat. No. E-0625)，溶於滅菌之二次蒸餾水中，經分層過濾後，存於4℃冰箱中備用。測試時，分別添加0.1％、0.2％(w／v)於TNM-FH培養液中，培養SL7B之細胞。至於脂質濃縮物，乃將購買的Lipid concentrate(Gibco, Cat. No. 19K6230)，經0.2μ過濾後，存於4℃冰箱備用。試驗時，分別添加4％及8％於TNM-FH培養液中培養SL7B細胞。

四、無血清培養液對SL7B細胞株生長之影響

無血清培養液Sf900-Ⅱ乃購至Gibco 公司(Cat. No. 10902-013)。而自行配製的ISC-06培養液，其配方如下：海水(取自淡水河口)加二倍體積二次蒸餾水稀釋後備用。取80ml稀釋後之海水，將下列化合物溶於水中，calcium chloride, 0.0151g; magnesium chloride, 0.0047g; potassium chloride, 0.0200g; sodium chloride, 0.7000g; sodium phosphate, 0.0174g; lactalbumin hydrolysate 0.6500g; yeastolate, 0.5000g; D(+)glucose, 0.4000g; fructose, 0.4000g。待化合物完全溶解後，將pH值調至6.3。最後以稀釋之海水將體積補充至100ml後，以121℃, 30分鐘之高溫滅菌法滅菌。

結　果

一、胎牛血清替代物對斜紋夜蛾細胞株生長之影響

本試驗就乳清、卵黃乳化物及脂質濃縮物等三種化合物，測試其替代胎牛血清用以培養斜紋夜蛾細胞株之可行性。結果顯示，將三種化合物分別添加於TNM-FH昆蟲細胞培養液中，除了添加乳清之試驗組具有明顯的效果外，其他卵黃乳化物及脂質濃縮物等二種化合物，在逐次的適應培養中，相繼在第五代時停止生長，顯見此二種添加物，不適用於取代胎牛血清用以培養斜紋夜蛾細胞株。

利用乳清取代血清培養斜紋夜蛾細胞之試驗組，逐次添加乳清替代血清培養細胞，經細胞逐步適應培養五代後，最後可完全以乳清添加物，取代胎牛血清進行細胞繼代培養。比較添加乳清及添加血清之細胞培養液對細胞生長的影響，可知就細胞生長曲線而言，添加8%乳清之細胞培養液，無論細胞生長曲線或細胞倍增時間，均與添加8%血清之TNM-FH培養液效果相似。此外，將添加物比例改變爲4%時，亦得相同之結果。比較不同添加比例對細胞生長之影響可知，隨著添加血清或乳清比例增加，可縮短細胞倍增時間(圖一)。

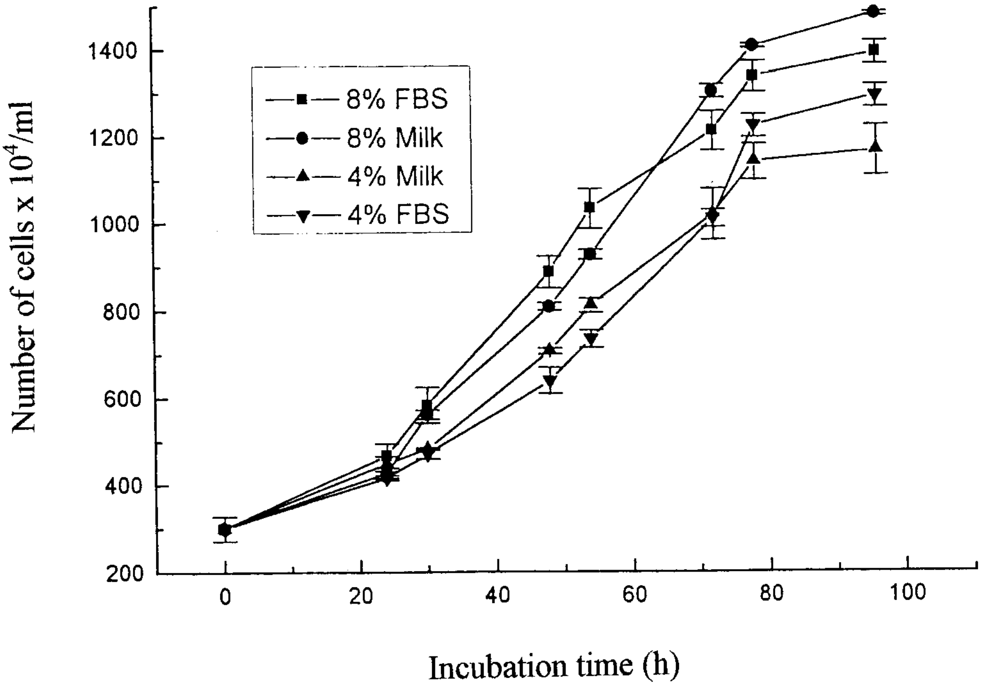
二、無血清培養液對斜紋夜蛾細胞株生長之影響

爲降低斜紋夜蛾細胞株培養成本，及提高細胞大量培養之可行性，乃進行無血清培養液之開發。本試驗利用已經商品化的無血清培養液(Sf900-Ⅱ)及實驗室自行合成之培養液(ISC-06)分別對斜紋夜蛾細胞株SL7B進行試驗。細胞從含8%FBS之TNM-FH培養液中，各經逐次適應培養15代後，進行細胞生長情形測試。結果如圖二所示。無論就細胞生長曲線或細胞倍增時間而言，均可證實斜紋夜蛾細胞株SL7B，可於供試之二種無血清培養液中進行繼代培養。

利用實驗室自行合成之ISC-06培養液與商品化Sf900-Ⅱ培養液培養之細胞，在五天之培養期中，細胞生長情形相似。自培養後第六天起，利用ISC-06培養之細胞株，其細胞數在到達1.2×10^7 cells/ml後，即呈飽和狀態，停止分裂增殖。相較之下，利用Sf900-Ⅱ培養液培養之細胞，則可繼續分裂增值，最後細胞生長密度可達1.7×10^7 cells/ml。

三、起始細胞培養密度對斜紋夜蛾細胞株生長之影響

一般而言，在進行細胞培養時，培養初期的細胞濃度甚爲重要。從前項試驗可知，實驗室自行合成之ISC-06培養液，可用於斜紋夜蛾SL7B細胞之培養，爲使培養方法更臻完善，乃進行起始培養細胞濃度測試。結果可知，利用ISC-06培養液培養細胞時，若以一般細胞(SF9或SF21AE)培養密度(3×10^6



圖一　斜紋夜蛾細胞株在添加乳清及胎牛血清之培養液生長曲線

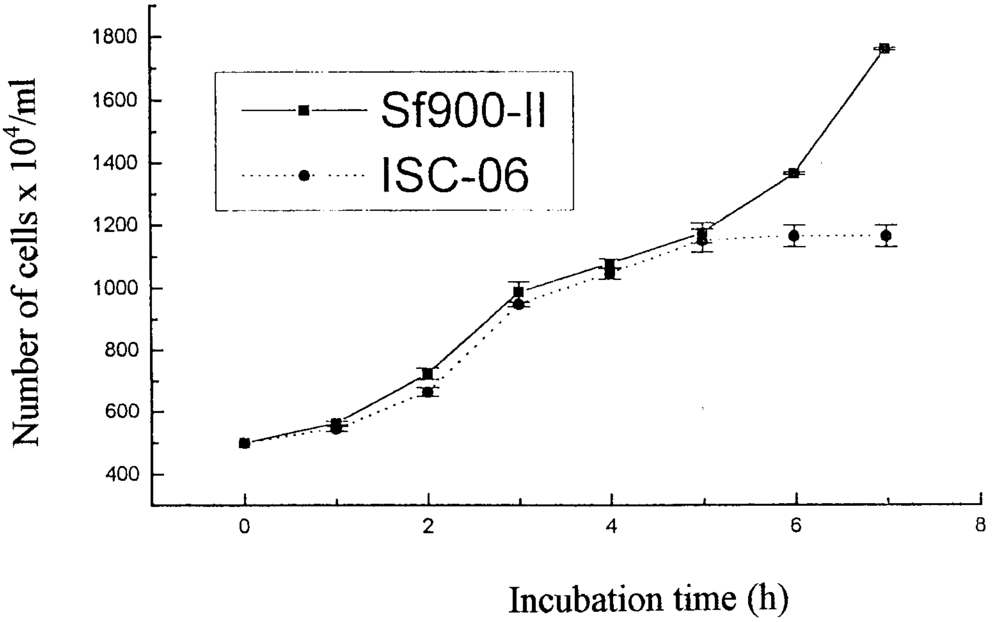
Fig 1. Growth curves of *Spodoptera litura* cell line SL7B cultured in TNM-FH medium supplemented with milk extract and fetal bovine serum.

cells / ml)作爲起始培養密度時，細胞生長緩慢，但若將起始細胞培養密度提高至5×10^6 cells / ml時，則斜紋夜蛾細胞生長速度隨之加快(圖三)。

討　論

本試驗結果可知，以乳清添加物進行細胞繼代培養，具有取代胎牛血清之功能。鮮乳營養成份高且價格便宜，具有實用價值。據Nagasawa *et al.* (1987)的研究結果顯示，存在於牛奶中之乾酪水解物(casein hydrolysate)與脂質水解物，對一種麻蠅(*Sarcophaga peresrina*)細胞株生長有幫助。分析牛乳營養成份，可知其中所含物質包括乳糖(lactose)、無機離子、微量元素、維他命、酵素及多種蛋白質。其中蛋白質含有20種生長必需氨基酸，可提供細胞生長所需。而無機離子在細胞生長方面則促進作用(Weiss *et al.*, 1982)。因此可知，本試驗利用市售鮮乳提純之乳清可以取代血清，作爲細胞培養液之添加物，很可能是乳清中含有大量的營養物質。

胎牛血清中所含的成份衆多，其中膽固醇(cholesterol)及血清蛋白(albumins)也是卵黃乳化物(egg yolk emulsion)的兩種重要成份。Lery and Frediere(1990)將此兩種成份經熱處理後，分別添加1、10、100　mg / l

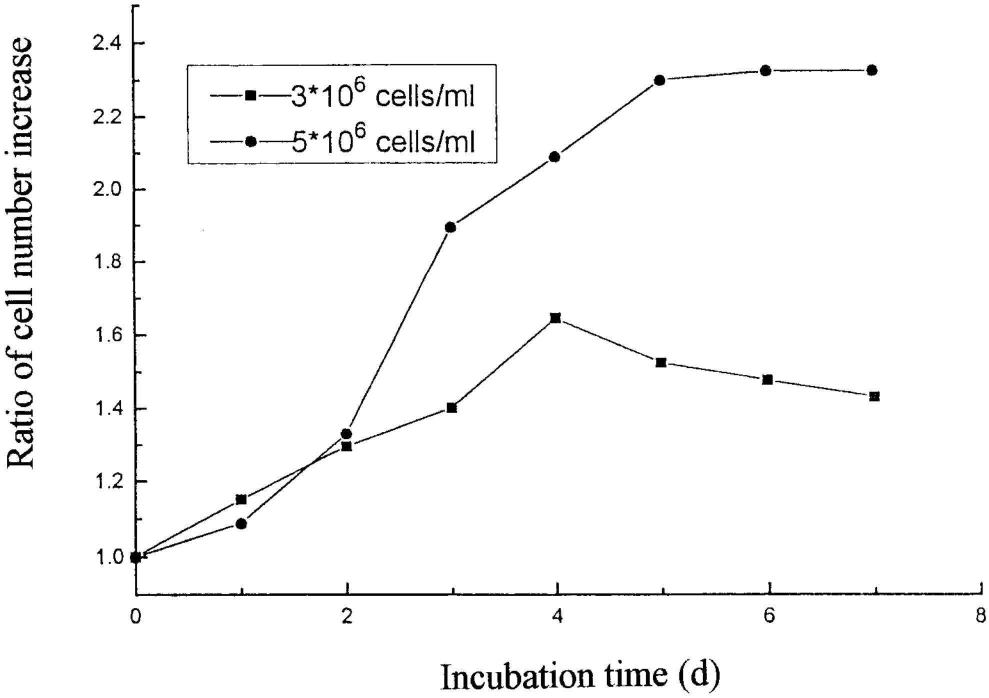


圖二　斜紋夜蛾細胞株在Sf900-Ⅱ及ISC-06無血清培養液之生長曲線
Fig 2. Growth curves of *Spodoptera litura* cell line SL7B cultured in serum-free media Sf900-II and ISC-06.

及5、50、500　mg／l於培養液中進行測試，結果經過熱處理的低劑量添加組，可以獲得和添加血清組相同的培養效果。此外利用1%卵黃乳化物(Roder, 1982)、酵母抽取物(Maiorella *et al.*, 1988)及脂質(Hink *et al.*, 1985)等均已證實可取代胎牛血清培養細胞。然而本試驗選用之卵黃乳化物及脂質濃縮物，均無法取代胎牛血清用以培養斜紋夜蛾細胞，可能爲不同細胞對營養成分之需求不同所致。

由於胎牛血清中含有大量之蛋白質，例如血清蛋白、免疫球蛋白(immunoglobulin)及血纖維蛋白原(fibrinogen)等，因此添加胎牛血清培養細胞，對將來要純化細胞所表現之外源蛋白，會增加很多複雜的純化步驟，徒增生產成本。所以開發無血清培養液進行昆蟲細胞培養，對於利用昆蟲細胞株生產外源蛋白之研究，具有重要的實用價值。

Koike and Sato (1988)利用經過高溫滅菌處理及經無菌過濾膜處理之M.M.培養液，在不添加血清情況下培養兩個甘藍夜蛾(*Mamestra brassicae*)細胞株(Mabr-32及Mabr-93)，結果此二細胞株均可培養超過10代以上，但是另外有七株細胞株則無法培養超過五代，足見細胞株本身對營養需求之差異性很大，有些昆蟲細胞可以用高溫滅菌之培養液培養。本試驗自行合成之ISC-06培養液，乃修改自M.M.培養液而得，其中主要



圖三　起始細胞培養密度對斜紋夜蛾細胞株生長曲線之影響
Fig 3. Effect of initial cell density on growth curves of *Spodoptera litura* cell line SL7B.

成份之不同為添加海水稀釋液及果糖等。就營養成份而言，從試驗結果得知，ISC-06培養液中，海水提供之微量元素對M.M.培養液中之一些不耐高溫高壓之營養成份有互補作用，對細胞之生長有重要影響。至於主要影響之因子為何，則尚待進一步之分析與研究。

本試驗利用實驗室合成之培養液(ISC-06)，可成功培養斜紋夜蛾細胞株SL7B，對將來本細胞株大量培養建立堅強基礎。ISC-06不但價格便宜，且可利用高溫滅菌處理，可減輕細胞培養液無菌過濾之繁雜手續，具有發展潛力。

一般而言，在建立細胞培養時，於培養初期細胞數增長緩慢，但至培養中期，由於細胞數增加，細胞分裂增殖速度亦隨之加快。因此在培養初期，較高密度之細胞數有利於細胞之增殖。此乃因細胞濃度高時，其內每一細胞可以分享其他細胞生長所代謝產生的生長素(growth factor)較多，故有利細胞之增殖。本試驗得知，在利用ISC-06無血清培養液培養斜紋夜蛾SL7B細胞時，初期細胞濃度必須增加方能提高細胞生長速度，可能原因為ISC-06所含營養物質並不充足，必須依靠細胞彼此分泌之生長素補充。因此將來仍需尋找多細胞生長所需營養物質，以進一步提高ISC-06之實用價值。

參考文獻

Goldschmidt, R. 1915. Some experiments in spermatogenesis *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1: 220-222.

Grace, T. D. C. 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. Nature 195: 788.

Granados, R. R., and K. A. Williams. 1986. *In vivo* infection and replication of baculvirus. pp. 89-108. *in:* R. R. Granados, and B. A. Federici, eds. The Biology of Baculovirus. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Granados, R. R., and Y. Hashimoto. 1994. Infectivity of baculoviruses to cultured cells. pp. 3-14. *in:* J. Mitsuhashi, ed. Invertebrate Cell System Applications. Vol.2. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Hink, W. F., D. A. Ralph, and K. H. Joplin. 1985. Metabolism and characterization of insect cell culture. pp. 547-570. *in:* C. A. Kerkut, and L. I. Gilbert, eds. Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Holtke, H. J., G. Sanger, C. Kessler, and G. Schmitz. 1992. Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acid: a fast and simple protocol and it's application. Biotechniques 12: 104-113.

Koike, M., and K. Sato. 1988. Culture of insect cell lines originated from *Mamestra brassicae* with autoclaved serum-free media. pp. 7-9. *in:* Y. Kuroda, E. Kurstak, and K. Maramorosch, eds. Invertrbrate and Fish Tissue Culture. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.

Lery, X., and G. Fediere. 1990. Effect of different amino acids and vitamins on Lepidoptera cell culture. J. Invertebr. Pathol. 56: 422-427.

Luckow, V. A. 1993. Baculovirus systems for the expression of human gene product. Curr. Opin. Biotechnol. 4: 564-572.

Maiorella, B., I. D. Shauger, and D. Harano. 1988. Large-scale insect cell-culture for recombinant proteins production. Bio/Technology 6: 1406-1410.

Mitsuhashi, J. 1989. Nutritional requirements of insect cell *in vitro*. pp. 3-20. *in:* J. Mitsuhashi, ed. Invertebrate Cell System Application. Vol 1. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Nagasawa, H., J. Mitsuhashi, and A. Suzuki. 1987. Growth factor in the lactalbumin hydrolysate to the cells of the fleshfly, *Sarcophaga pergrina*. pp.29-32. *in:* Y. Kuroda, E. Kurstak, and K. Maramorosch, eds. Invertebrate and Fish Tissue Culture. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.

Roder, A. 1982. Development of a serum-free medium for cultivation of insect cells. Naturwissenschaften 69: 93-98.

Shih, C. J., and R. W. Lin. 1995. Establishment of a cell line from

pupal ovaries of *Spodoptera litura* (Lepidoptera:Noctuidae). Chinese J. Entomol. 15: 333-344. (in Chinese).

Shih C. J., and J. C. Chang. 1996. The effect of fetal bovine serum and temperature on growth of *Spodoptera litura* cell line. Memoirs College of Agri. NTU. 36: 58-65. (in Chinese).

Smith, G. E., M. D. Summers, and M. J. Fraser. 1983. Production of human β-interferon in insect cells infect with a baculovirus expression vector. Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165.

Weiss, S. A., G. C. Smith, J. L. Vaughn, E. M. Dougherty, and G. J. Tompkins. 1982. Effect of aluminum chlorine and zinc sulfate on *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) replication in cell culture. In Vitro 18: 937-944.

Wu, J., G. King, A. J. Daugulis, P. Faulkner, D. H. Bone, and M. F. A. Goosen. 1989. Engineering aspects of insect cell suspension culture: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 249-255.

Wyatt, S. S. 1956. Culture *in vitro* of tissue from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Gen. Physiol. 39: 841-852.

收件日期：1996年9月19日
接受日期：1996年10月24日

Effects of Fetal Bovine Serum Replacements and Serum-free Medium to Culture a *Spodoptera litura* cell line.

Cheng-Jen Shih* **and Jui-Chu Chang** Department of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the potential application of some fetal bovine serum replacements and serum-free medium for culturing *Spodoptera litura* cell line SL7B. Results revealed that milk extract could successfully replace fetal bovine serum to culture SL7B, whereas lipid concentrate and egg yolk emulsion failed. Both commercial serum-free media Sf900-II and newly developed serum-free medium ISC-06 were suitable for culturing SL7B cells. The maximum density of SL7B cells produced from SIC-06 and Sf900II serum-free media were 1.2×10^7 cells / ml and 1.7×10^7 cells / ml, respectively. The cell growth rate in ISC-06 serum-free medium was improved significantly as the initial cell density increased from 3×10^6 to 5×10^6 cells / ml.

Key words: *Spodoptera litura,* Cell fetal bovine serum replacements, serum-free medium.

*Correspondence/reprint request address