



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Factors Affecting Mass Production of HBsAg in M-BmN Cells cultured in Shaking Flasks 【Research report】

利用震盪器培養家蠶細胞量產B型肝炎表面抗原蛋白之影響因素【研究報告】

Shou-Liang Wang, Roger F. Hou and Min-Ying Wang
王守良、侯豐男、王敏盈*

*通訊作者E-mail :

Received: Accepted: 1997/09/19 Available online: 1997/12/01

Abstract

This study describes the effect of stirring speed, concentration of serum, working volume and mode of culture methods on cell growth of the M-BmN cell line which was established from *Bombyx mori*. The cells could be cultured in suspension in shaking flasks at a speed of 80 rpm or below. If 0.2% of Pluronic F-68 was added into the IPL-41 medium, the cells could grow, even if the stirring speed was increased to 250 rpm. Studies on the effect of fetal bovine serum (FBS) concentrations on cell growth show that cells grew better in medium supplemented with 10% FBS than did those with 5% FBS. We also found that, when the working volume was 60 ml or more in a 250ml shaking flask, the pH of the culture medium kept dropping and finally inhibited cell growth. In contrast, change of pH values in the culture medium, for cells growing in a flask with a working volume of 30ml, first dropped, but then increased again. The increase of pH was used as a sign to indicate the timing to feed glucose and glutamine in a fed-batch culture method. This method, when applied to MBm-N cells culture, can increase the maximum cell density from 32×10^5 to 48×10^5 cells/ml. More significantly, the production of HBsAg could also be increased from 230 to 560 ng/ml.

摘要

本文主要探討M-BmN家蠶細胞株在懸浮狀況下培養於震盪器之情形，以了解有關攪拌速率、血清濃度、起始接種密度及操作體積等因子對細胞生長之影響。發現添加0.2%之Pluronic F-68於IPL-41培養基中，在高轉速(250 rpm)下，可有效地保護細胞生長於震盪瓶內，同時當利用饋料批次模式培養，在高轉速下，能提高最大細胞密度約30%(從 32×10^5 至 48×10^5 cells/ml)。在血清濃度方面，顯示M-BmN細胞在10%血清中的生長狀況比在5%胎牛血清為佳，尤其是利用饋料批次模式培養。而操作體積方面，則發現過大的體積(大於60ml)會導致溶氧量下降，使pH值偏低而不利於細胞生長。而在起始接種密度部份，發現較高的接種密度，細胞將生長更好，達到最大細胞密度的時間也較短。饋料批次培養模式不僅可增加細胞密度，亦可應用於增加異源重組蛋白之表現量，目前B型肝炎表面抗原之產量已可由批次培養所得之230 ng/ml，提高到利用饋料批次培養所得之570 ng/ml。

Key words: insect cell culture, shaker, fed-batch, Hepatitis B surface antigen.

關鍵詞: 昆蟲細胞培養，震盪器，饋料批次，B型肝炎表面抗原。

Full Text:  [PDF \(0.65 MB\)](#)

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

利用震盪器培養家蠶細胞量產 B 型肝炎表面抗原蛋白之影響因素

王守良 侯豐男 王敏盈* 國立中興大學農業生物科技學研究所 台中市國光路250號

摘 要

本文主要探討M-BmN家蠶細胞株在懸浮狀況下培養於震盪器之情形，以了解有關攪拌速率、血清濃度、起始接種密度及操作體積等因子對細胞生長之影響。發現添加0.2%之Pluronic F-68於IPL-41培養基中，在高轉速(250 rpm)下，可有效地保護細胞生長於震盪瓶內，同時當利用饋料批次模式培養，在高轉速下，能提高最大細胞密度約30%(從 32×10^6 至 48×10^6 cells/ml)。在血清濃度方面，顯示M-BmN細胞在10%血清中的生長狀況比在5%胎牛血清為佳，尤其是利用饋料批次模式培養。而操作體積方面，則發現過大的體積(大於60 ml)會導致溶氧量下降，使pH值偏低而不利於細胞生長。而在起始接種密度部份，發現較高的接種密度，細胞將生長更好，達到最大細胞密度的時間也較短。饋料批次培養模式不僅可增加細胞密度，亦可應用於增加異源重組蛋白之表現量，目前B型肝炎表面抗原之產量已可由批次培養所得之230 ng/ml，提高到利用饋料批次培養所得之570 ng/ml。

關鍵詞：昆蟲細胞培養，震盪器，饋料批次，B型肝炎表面抗原

前 言

桿狀病毒表現系統最常被使用的為苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica* multi-nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV)與家蠶核多角體病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)表現系統，其中有關利用BmNPV表現系統生產外源蛋白的研究，始自Maeda *et al.* (1985)成功地表現人類 α -干擾素(human-

α -interferon)於家蠶細胞後，便持續發展中。如以此系統共同表現抗體的重鏈(heavy chain)和輕鏈(light chain)而組成具免疫活性的抗體(Reis *et al.*, 1992)，或表現氯乙醯轉移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT) (Zhang *et al.*, 1994)，及人類的生長激素(human growth hormone)(Kadono-Okuda *et al.*, 1995)，凡此皆顯示BmNPV表現系統，已被廣泛地利用於表現異源蛋白。

有關BmNPV表現系統中細胞培養之研究，自Wyatt (1956)利用合成之培養液，添加5%昆蟲血液培養家蠶(*Bombyx mori*)細胞開始。其後Grace (1967)以化學合成之培養液，添加10%胎牛血清(FBS)，建立第一株家蠶細胞株。此後家蠶細胞株便被廣泛的應用於各項研究。家蠶細胞株大多數以T型培養盒做靜態培養，但Stavroulakis *et al.* (1991a)首先添加0.3%甲基纖維素(methylcellulose, MCL)到含10% FBS 之IPL-41培養液中，而成功地懸浮培養Bm-5家蠶細胞株於80 rpm轉速下。他們的資料顯示穀氨醯胺(glutamine)及葡萄糖(glucose)是Bm-5細胞株在高細胞密度培養時的限制性營養物。並在培養過程中，發現氨水(ammonia)並不像哺乳動物細胞培養時有累積的現象，反而是被消耗，而導致尿酸(uric acid)的累積。另外也發現細胞代謝所生成的乳酸對細胞的生長有抑制的現象(Stavroulakis *et al.*, 1991b)。

Zhang *et al.* (1992)首先嘗試降低血清添加之濃度，並成功地培養Bm-5家蠶細胞於含5%胎牛血清的IPL-41培養液及無血清的Ex-cell 400培養液中，但此研究發現Bm-5家蠶細胞卻無法適應生長於含2%胎牛血清的IPL-41，無血清的SF-900及ISFM培養液中，因此血清添加對細胞生長之影響可能需再研究。同一報告中亦指出家蠶核多角體病毒包含體(occlusion body, OB)的產量在含10%和5%血清的IPL-41培養液與無血清的Ex-cell 400培養液中，分別為 1.74×10^6 、 2.00×10^6 、 2.79×10^6 (OBs/ml)，顯然OB的產量隨著培養液中血清濃度的增加而減少，此亦顯示血清可能會抑制OB的生產。Zhang *et al.* (1993)又發現細胞在感染後葡萄糖或氧氣(O₂)的消耗速率比未感染前高50%，亦證實以BmNPV / Bm-5表現系統生產CAT酵素的產量為82~90 μg CAT / 10⁶ cells，與

A c M N P V / S f - 9表現系統的產量相似。Zhang *et al.* (1994)再利用兩個生物反應器培養串聯，以量產CAT。並發現細胞培養的方法和細胞的年齡皆會對重組蛋白質的產量有所影響，最大的重組蛋白質產量是以懸浮培養方式培養，並且又以細胞在生長指數期(log phase)的中晚期做感染，其產量最佳。

上述的資料顯示對家蠶細胞懸浮培養的研究，均使用spinner flasks和生物反應器，對於實驗室中最易取得和操作的震盪器(shaker)，並無最適化懸浮培養及重組蛋白生產的系統性研究。故我們嘗試培養家蠶細胞於shaking flasks中，並對會影響家蠶細胞生長的環境因子，包括轉速，培養體積，接種密度，血清濃度等逐一地探討，並藉此尋找出最佳生產重組蛋白的條件。

材料與方法

細胞株

本試驗所使用之細胞株為M-BmN，係由本校昆蟲系昆蟲病理研究室取得。所使用之培養基則為IPL-41培養基(Gibco)，在靜態培養中全都添加10%胎牛血清(Gibco, Cat. No. 26140-038)，而懸浮培養所使用之血清濃度於各實驗中將會另外標明。

病毒株

本試驗所使用到之病毒株包括B型肝炎疫苗病毒株(YFHBs)和野生型BmNPV病毒。兩者皆取自本校昆蟲系昆蟲病理研究室，其中YFHBs是由pYFHBs與野生型家蠶核多角體病毒DNA經共同轉移感染後所得之重組病毒，具有家蠶核多角體病毒p10基因啓動子，用以調控B型肝炎表面抗原蛋白major S基因，並可由果蠅熱休克蛋白基因啓動子調控

大腸桿菌lac Z基因(Liu, 1996)。

靜態培養(Stationary culture)

將M-BmN細胞株培養於28°C之培養箱內，每隔3~4天將貼滿T型培養盒(T-flask)底部之細胞以刮細胞器(rubber policeman)刮下後，取1 ml之均勻混合細胞液至另一新T型培養盒，使細胞黏貼於底部後(即靜置5~10分鐘)，再加入4 ml新鮮之培養液進行繼代培養(subculture)。

懸浮培養(Suspension culture)

當一個或數個25T培養盒中的細胞已長滿時，即刮下細胞，然後用二至三倍體積的新鮮之培養液均勻地將細胞置於錐形培養瓶中(250 ml shaking flasks)，細胞即可慢慢適應於懸浮式地生長。待細胞長到高密度時，再取部份之細胞，通常即以 2.5×10^6 cells/ml做為起始值接種到新的錐形培養瓶，約每隔3天做1:5的繼代培養，當培養轉速在110 rpm以上時，則再加入0.2% Pluronic-Polyol F68 (Sigma, Lot 45H0278)，其為一種能保護細胞免於受剪切力傷害的界面活性劑。

分析方法

(1)細胞計數及pH測定

取一定量之細胞液樣品，用0.85% NaCl溶液，稀釋至適當之稀釋度，再取等量的稀釋細胞液與0.4% trypane blue (Sigma)混合染色，以血球計數器分別計數死細胞與活細胞數目。取懸浮培養的細胞液樣品，以pH meter (MettlerToledo 340, Schott Gerate Z451)測定pH值。

(2)葡萄糖定量分析

取懸浮培養的細胞液樣品，以葡萄糖分析儀(YSI, 2700 Select)直接測定。其原理是

利用固定於膜上之葡萄糖氧化酶(glucose oxidase)將葡萄糖氧化，測所產生之過氧化氫(H_2O_2)，以決定葡萄糖的量。

(3)B型肝炎表面抗原蛋白之測定

M-BmN細胞被能表現B型肝炎表面抗原蛋白的病毒株(YFHBs)感染後，逐日收取細胞培養液，經離心後可得上清液與細胞兩部份，細胞部份以PBS清洗兩次，以500 μ l細胞分解液(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate)充分溶解後，將細胞溶解物與上清液保存於-20°C。待收齊樣品後，使用永進公司之單株HBsAg酵素免疫檢驗試劑(Ever New Monoclonal HBsAg EIA)測定B型肝炎表面抗原蛋白，將細胞培養液、細胞溶解物、陽性對照組四個(6.0, 4.5, 3.0, 1.5 ng/ml)、陰性對照組兩個與空白組兩個，分別取100 μ l加入滴定條之孔洞中，於40°C培養箱反應2小時；以清洗液(washing buffer)清洗3次，每次200 μ l，再加入100 μ l anti-HBsAg-HRPO(horseradish peroxidase)，於40°C反應1小時後，再以清洗液清洗3次，接下來加入100 μ l受質溶液OPD(o-phenylenediamine)，置於室溫黑暗中避光反應30分鐘，最後加入100 μ l 2N硫酸終止反應，用ELISA reader (Physica Elica-5)讀取OD₄₉₂。然後以四個已知B型肝炎表面抗原蛋白含量的陽性對照組與其相對應的OD₄₉₂讀值，求出一條回歸曲線方程式，再將樣品的讀值代入該方程式以求得蛋白質的含量。

結果與討論

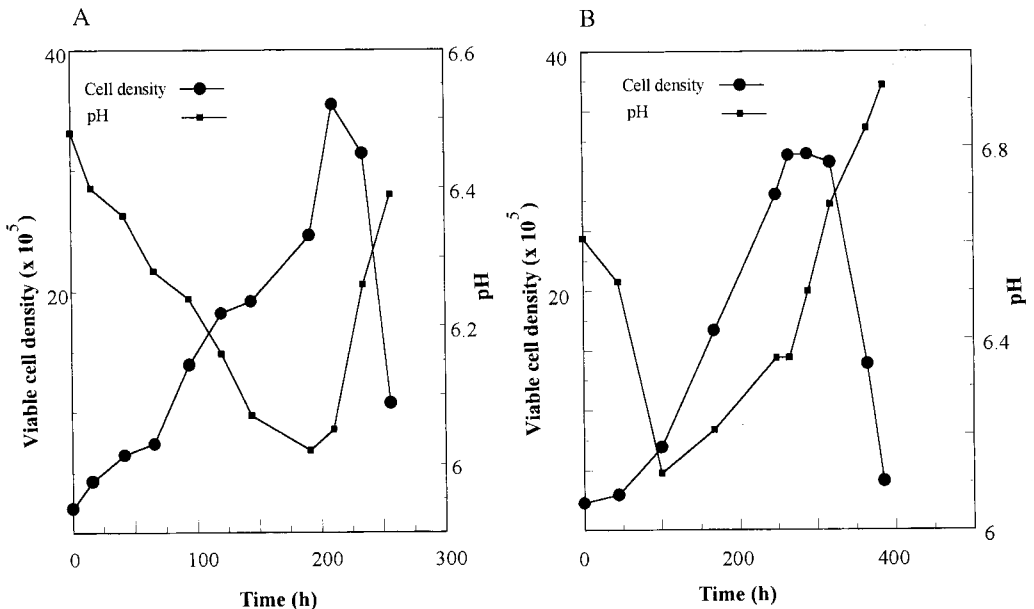
有關昆蟲細胞之工業化大量培養的研究，多針對AcMNPV所能感染的30多種昆蟲細胞株(Entwistle and Evans, 1985)，如

IPLB-SF21AE (*Spodoptera frugiperda*); IPLB-TN368(*Trichoplusia ni*)等。但對於大量培養家蠶細胞的研究則較少，尤其是在台灣地區，多數BmNPV載體表現大都以蟲體或T型培養盒的靜態培養進行。三度空間的懸浮培養，將可提供更多的細胞及量產病毒和外源蛋白，因此我們為了瞭解在懸浮培養過程中，一些相關環境因子對M-BmN細胞生長的影響，故進行下列試驗。

1. M-BmN細胞株在錐形培養瓶(shaking flask)培養之適應性：

初期嘗試將M-BmN細胞養於80 rpm的錐形培養瓶中，細胞可生長，其存活率約在70%~80%之間，但是當培養的轉速提升至110 rpm時，細胞便破裂死亡，存活率明顯的快速下降。直到加入0.2% Pluronic-Polyol

F-68後，細胞才能再生長，且其存活率也大幅提升至接近90% (資料未現)。圖一A所示之結果為M-BmN已適應於110 rpm轉速下之情形。活細胞數可由 3×10^5 cells/ml長到 35×10^5 cells/ml，我們並發現當活細胞數達到最高點時，培養基之pH值先由原本6.3下降到6.0，再開始稍微上升至6.05。但一天後，pH值便劇烈上升至6.25，而此時細胞之存活率下降至75%，由於此時在培養基中之葡萄糖濃度僅有0.2 g/L(資料未現)，因此pH值的上升，可能因培養基中之葡萄糖嚴重不足，導致細胞轉而利用其他碳源，如氨基酸等而釋放出氨水，造成培養基之pH值上升。其他文獻亦有相同報導，如Sf-9昆蟲細胞的培養(Wang, 1994)。即使我們將轉速增加到250 rpm，如圖一B所示，pH值的變化大體上與圖一A相似，係先下降再上升，因此我們



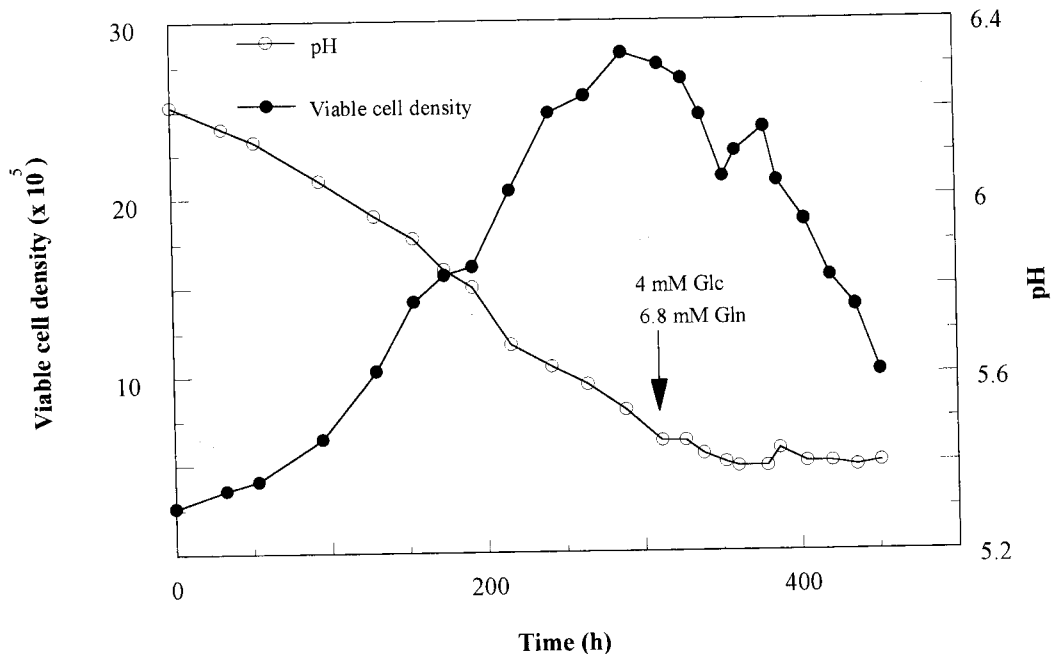
圖一 MBm-N細胞在轉速(a)110轉或(b)250轉下培養之活細胞數、酸鹼值、及葡萄糖濃度動態變化。
Fig. 1. Kinetic data of viable cell density, pH, glucose concentration of MBm-N cells cultures with a stirring speed of either 110 rpm (a) or 250 rpm (b).

以下做饋料培養 (fed-batch culture) 時，均在連續量測 pH 值變化過程中，發現 pH 值上升時便添加葡萄糖及穀氨醯。但本次培養的細胞密度僅達 32×10^5 cells / ml。

2. 操作體積對細胞生長之影響：

培養基中之溶氧度對細胞之生長亦相當重要。因在錐形培養瓶中培養基之體積不同，其溶氧之程度就會不同，在固定轉速下通常體積愈大，其溶氧度就會愈少。如我們以 60 ml 的操作體積來做培養時，由圖二可見細胞在初期與低操作體積 (約 30 ml) 的生長情形差異不大，但 pH 值的變化卻與在 30 ml 操作體積培養下之結果有相當大之差異，即其 pH 值在到達細胞生長最高密度時，並無如圖一 A 或一 B 所示之 pH 值上升的現象，反而 pH 值持續下降至 5.4 左右，此現象明顯的表示操作體

積的大小，可能影響細胞的生理代謝，故連帶影響其細胞可生長之最大細胞密度。表一顯示在 30 ml 的操作體積下，其最高細胞密度可達 35.2×10^5 cells / ml，而最低 pH 值則為 6.02；但當操作體積增加為 60 ml 時最高細胞密度則僅達 28.2×10^5 cells / ml，而最低 pH 值卻降至 5.4，這些結果顯示操作體積過大將不利於細胞生長。主要因素是培養的液體體積會影響到培養的混合度，剪切力 (shear stress) 及氧氣的轉移。因此在一定的培養轉速下，當培養體積增加時，細胞的混合程度和剪切力便會下降。從 Neutra *et al.* (1992) 的報告中顯示，在 110 rpm 轉速下，於錐形培養瓶中，最適於 Sf-9 細胞生長的操作體積是培養瓶總體積的 25% ~ 45%。但當培養操作體積超過 50% 時，便會導致細胞沈降和聚集於瓶底，因而使細胞的生長速率減緩且未能達



圖二 MBm-N細胞在工作體積60ml下培養之活細胞數、及酸鹼值動態變化。箭頭標明外加之葡萄糖 (Glc) 及穀氨醯胺 (Gln) 濃度。

Fig. 2. Kinetic data of viable cell density and pH for a culture of M-BmN cells grown in a 250-ml shaking flask with a 60-ml working volume at 250 rpm. Feedings of glucose (Glc) and glutamine (Gln) are indicated.

高細胞密度。M-BmN細胞體積比Sf-9細胞大，可能需要比較大的剪切力，才能達到均勻混合的效果。因此，即使操作體積(60 ml)僅及培養瓶總體積(250 ml)之25%，且轉速達200 rpm，但對M-BmN細胞而言，已足於影響其生長(表一)。

表一 不同工作體積時，培養MBm-N細胞所達之最低酸鹼值及最大細胞密度

Table 1. Effect of working volume on minimum pH and maximum cell density achieved. MBm-N cells were cultured with a working volume of either 30 or 60 ml.

Working volume (ml)	Minimum pH	Maximum cell density ($\times 10^6$ cells / ml)
30	6.02	35.2
60	5.4	28.2

3. 轉速對細胞生長的影響：

當細胞以懸浮方式培養時，須以機械式或氣泡式的攪拌來使細胞均勻的分散於培養基中，如此細胞才能有效的生長增殖。但攪拌所產生剪切力，會造成細胞的破裂死亡。為了解M-BmN細胞在不同的培養轉速下，對細胞的生長是否有所影響，我們以饋料培養方式進行不同轉速的試驗，且添加0.2%之Pluronic-Polyol F68。由表二可明顯發現M-BmN細胞培養在5% FBS的培養液中，當轉速為200 rpm時，其最高細胞密度可達 25×10^6 cells / ml，而在轉速150rpm下的最高細胞密度則僅 20×10^6 cells / ml，減少約20%。另外表二則顯示培養於含10% FBS培養液時，在高轉速250 rpm的培養下，最大細胞密度可達 48.6×10^6 cells / ml，而培養於轉速200 rpm下，則為 41.4×10^6 cells / ml，減少約13%。以上的結果皆顯示在高轉速培養下，細胞均能比低轉速達到較高的細胞密度，而且在5% FBS的培養條件下(減少20%，表二)其差距

更是比10% FBS下之培養(減少13%，表二)明顯。而Zhang *et al.* (1994)在以磁攪拌式培養瓶(spinnerflask)做Bm5細胞懸浮培養時，亦發現當轉速為40 rpm時，其所能達到之最大細胞密度及生長速率均較60及80 rpm時低。

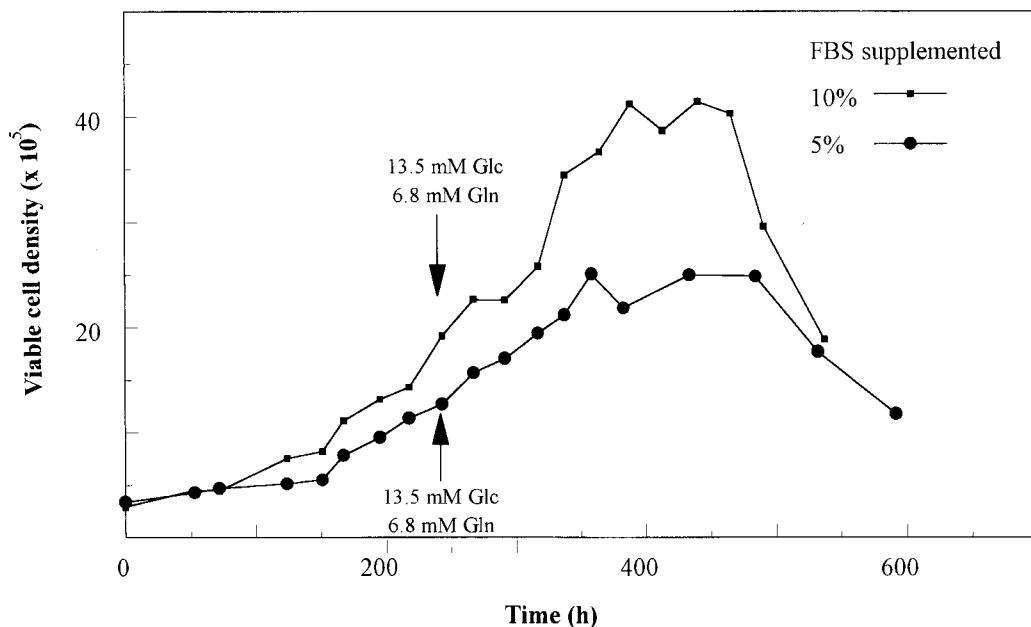
表二 不同血清濃度，不同轉速時，培養MBm-N細胞所能達之最大細胞密度

Table 2. Effect of stirring speed on maximum cell density achieved. MBm-N cells were cultured with supplements of either 5% or 10% FBS.

Supplement of FBS (%)	Stirring speed (rpm)	Maximum cell density ($\times 10^6$ cells / ml)
5	150	20
	200	25
10	200	41
	250	49

4. 血清對細胞生長的影響：

降低細胞培養的成本，是量產細胞及病毒所要達成的目標。而培養基中之血清成本幾乎就佔細胞培養基總成本的90%。所以，若能降低血清的使用量，應能降低昆蟲細胞培養之成本。但降低血清是否會影響細胞的生長，有待加以研究。雖然我們已可將M-BmN細胞培養於血清濃度5%的培養液中，且其存活率可達80%~90%之間，不過由圖三結果顯示M-BmN細胞在10%血清濃度下培養，其最大細胞密度可達 41.4×10^6 cells / ml，而培養於5% FBS者之最高細胞密度僅達 25.1×10^6 cells / ml，由此顯示M-BmN細胞在高血清濃度下，其生長狀況較佳。顯然血清濃度對M-BmN細胞株於IPL-41培養基中的生長確實有所影響。我們曾試去除血清，則無法培養此細胞株。此外，血清濃度對細胞生長的影響亦見於Sf-9細胞，以TNM-FH培養基為基礎培養基，隨著血清濃度的下



圖三 添加10%或5%胎牛血清對M-Bm-N細胞生長之影響。箭頭標明外加之葡萄糖(Glc)及穀氨醯胺(Gln)濃度。
 Fig. 3. Effect of serum on M-BmN cell growth. Cells were grown in 250-ml shaking flasks using IPL-41 medium supplemented with either 10% (squares) or 5% (circles) FBS. Feedings of glucose (Glc) and glutamine (Gln) are indicated.

降，其細胞倍增時間 (population doubling time) 便增加，而最大細胞密度則成下降趨勢 (Murhammer and Goochee, 1988)。

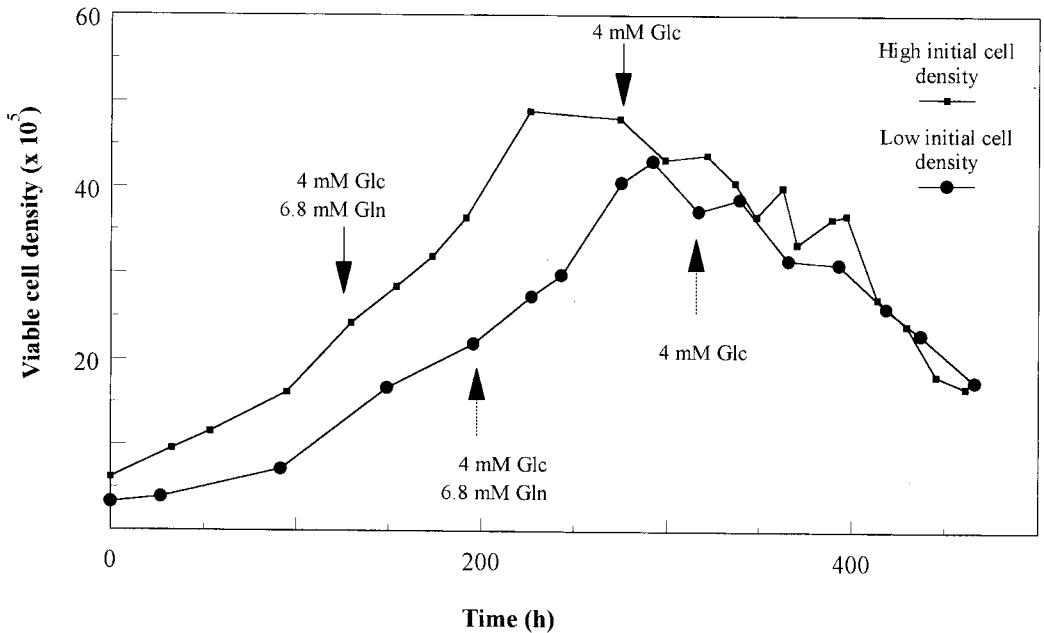
5. 起始接種密度對細胞生長的影響：

以不同的起始細胞密度進行M-BmN細胞的批次饋料培養，圖四顯示起始細胞密度較高者 (6.2×10^5 cells/ml)，其達到最大細胞密度的時間會比低接種密度 (3.3×10^5 cells/ml) 縮短，且其pH值也較早上升，故穀氨醯胺及葡萄糖的添加也需提早，同時高接種密度所經歷延遲期 (lag phase) 之時間也比低密度接種為短。另起始接種密度較高者所能達到的最大細胞密度為 48.8×10^5 cells/ml，亦比低起始接種密度者之 43.1×10^5 cells/ml 稍高。Neutra *et al.* (1992) 以錐形培養

瓶接種不同細胞密度 ($1.2 \sim 22 \times 10^5$ cells/ml) 的Sf-9細胞做懸浮培養的報告中，發現當接種密度過低時，細胞生長速率將下降，而且最大細胞密度會下降。最佳的生長速率和最大的細胞密度是當接種密度為 $8 \sim 22 \times 10^5$ cells/ml。但Murhammer and Goochee (1988) 以磁攪拌式培養瓶培養Sf-9細胞時，卻發現只要接種密度不低於 0.4×10^5 cells/ml，就不會影響細胞的生長。

6. 穀氨醯胺對細胞生長的影響：

關於穀氨醯胺已有許多報告證明其為昆蟲細胞生長重要的限制性營養物質 (limiting nutrient) (Stavroulakis *et al.*, 1991b; Ferrance *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994)，而且穀氨醯胺除可作為合成嘌呤 (purines)，嘧



圖四 不同起始密度(6.2×10^5 或 3.3×10^5 cells / ml)對M-Bm-N細胞生長之影響。箭頭標明外加之葡萄糖(Glc)及穀氨醯胺(Gln)濃度。

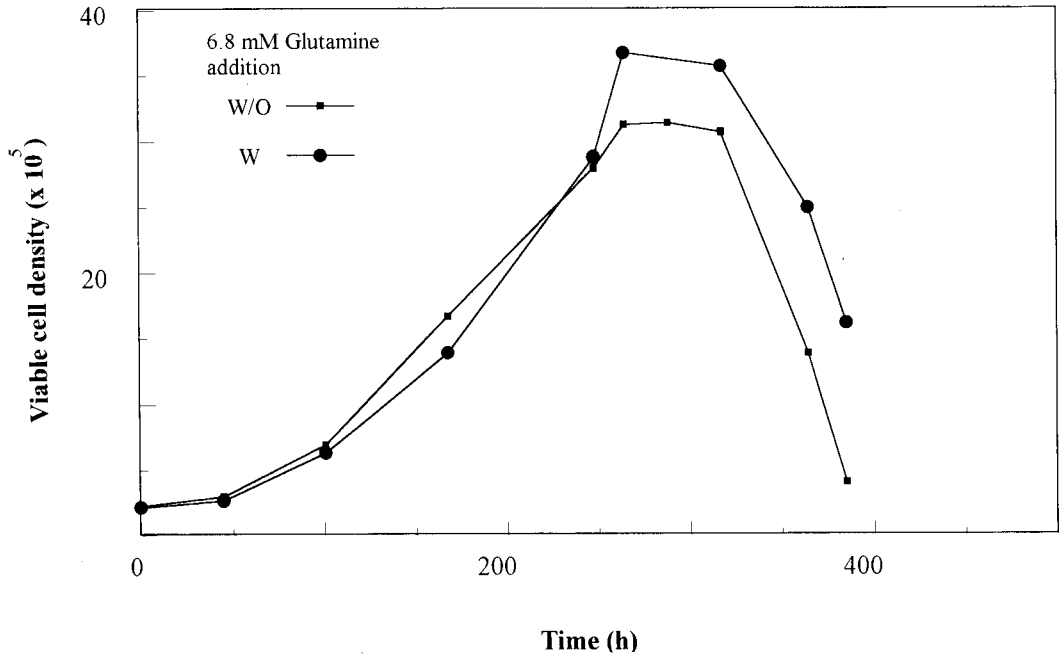
Fig. 4. Effect of initial cell density on M-BmN cell growth. Cells were grown in 250-ml shaking flasks seeded either with an initial cell density of 6.2×10^5 (squares) or 3.3×10^5 (circles) cells / ml. Feedings of glucose (Glc) and glutamine (Gln) are indicated.

啶(pyrimidines), 糖(amino sugars)和asparagine的重要氨基酸外, 亦可進行氧化代謝(oxidativemetabolism)產生細胞所需的能量來源, 故穀氨醯胺在細胞培養上, 特別是對動物細胞而言, 佔有不可或缺的角色(Butler and Jenkins, 1989)。為進一步了解穀氨醯胺是否對M-BmN細胞株有相同之效應, 我們接種約 3×10^5 cells / ml的細胞到兩瓶250 ml的培養瓶中, 並監控其pH值。如前所述, pH值會先下降, 等到pH值再上升時, 其中一組便添加6.8 mM穀氨醯胺到培養液中, 再觀察兩組的細胞生長上之差異。從圖五顯示加穀氨醯胺的試驗組最大的細胞密度為 36.7×10^5 cells / ml, 而不加穀氨醯胺的對照組, 則為 31.4×10^5 cells / ml, 兩者相差約13%。顯

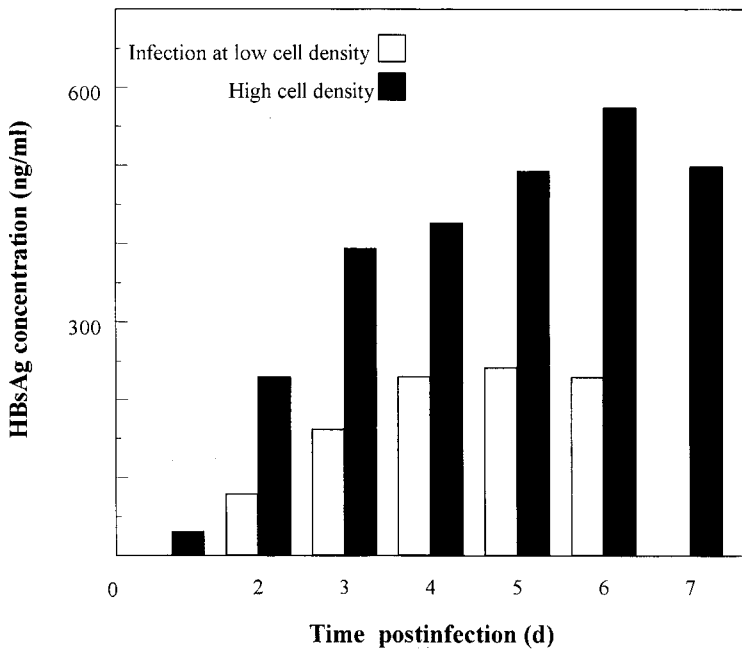
然穀氨醯胺的添加有助於M-BmN細胞生長。

7. 以懸浮培養的M-BmN細胞株表現B型肝炎表面抗原：

為證明懸浮培養的M-BmN細胞株亦可表現外源蛋白, 因此我們利用帶有B型肝炎表面抗原蛋白major S基因之重組病毒, 感染懸浮培養所得之細胞。第一組試驗是當細胞密度達 1×10^6 cells / ml時, 加入高multiplicity of infection(MOI)之病毒液以感染細胞, 因加入病毒液後, 細胞密度不再增加, 表示絕大多數之細胞已遭感染。由圖六空白長條圖得知, 感染後第二天, 被分泌至培養基中之蛋白質即達80 ng / ml, 隨後並逐天增加, 至感染後第五天產量達最高點, 約242 ng



圖五 添加6.8 mM之穀氨醯胺對MBm-N細胞生長之影響。
 Fig. 5. Effect of supplementing 6.8 mM glutamine on cell growth.



圖六 被分泌至培養基中之B型肝炎表面抗原產量之動態變化。
 Fig. 6. Kinetic data of secreted foreign protein (HBsAg) production.

/ ml, 隔天隨即降至230 ng / ml。另一組實驗則是待細胞長至高細胞密度(25×10^5 cells / ml)再感染, 同時加入13.5 mM葡萄糖和6.8 mM穀氨醯胺, 這兩組試驗之MOI是相同的, 因此感染後, 細胞密度不再增加。但不同於前組實驗的是在感染後第二天, 即可測得分泌至胞外的蛋白質量已高達230 ng / ml(圖六實心長條圖), 隨後並逐天增加至感染後第六天, 產量達最高點(約570 ng / ml), 隔天隨即降至500 ng / ml。

由以上之結果, 不僅可證明懸浮培養之M-BmN細胞株可表現B型肝炎表面抗原, 亦可明顯發現提高感染時細胞密度至 25×10^5 cells / ml, 其B型肝炎表面抗原蛋白的產量也伴隨增加, 從230 ng / ml到570 ng / ml。另外, 高低細胞密度感染的生產高峰, 分別為第五和第六天, 顯然高細胞密度感染時, 重組蛋白產量的最高峰有延遲的現象。另外當兩組產量達最高峰後, 隨後產量便下降, 此可能與蛋白堦(protease)的降解(degradation)有關(Wang *et al.*, 1996)。

誌 謝

本試驗承農委會86科技-1.1-糧-42(2)及國科會NSC 86-2316-B-005 -001-BC之經費補助, 本校遺傳中心劉萬欣助理及昆蟲系蔡雅津小姐之協助, 在此特誌謝忱。

參考文獻

- Butler, M., and H. Jenkins. 1989. Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. *J. Biotechnol.* 12: 97-110.
- Entwistle, P. F., and H. F. Evans. 1985. Viral control, pp. 347-412. in L. I. Gilbert and G. A. Kerkut, eds., *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 12. Pergamon Press, Oxford.
- Ferrance, J. P., A. Goel, and M. M. Ataai. 1993. Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 697-707.
- Grace, T. D. C. 1967. Establishment of a line of cells from the silkworm *Bombyx mori*. *Nature* 219: 613.
- Kadono-Okuda, K., M. Yamamoto, Y. Higashino, K. Taniai, Y. Kato, S. Chowdhury, J. Xu, S. K. Choi, M. Sugiyama, and K. Nakashima. 1995. Baculovirus-mediated production of the human growth hormone in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 389-396.
- Liu, W. -H. 1996. Expression of hepatitis B surface antigen and carp gonadotropin using *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) expression system. Master's Thesis, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan (In Chinese).
- Maeda, S. T., T. Kawai, M. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Sato, and M. Furusawa. 1985. Production of human alpha-interferon in silkworm using abaculovirus vector. *Nature* 315: 592-594.
- Murhammer, D. W., and C. F. Goo-

- chee.** 1988. Scaleup of insect cell cultures: protective effects of pluronic F-68. *Bio / Technology* 16: 1411-1415.
- Neutra, R., B. Z. Levi, and Y. Shoham.** 1992. Optimization of protein-production by the baculovirus expression vector system in shake flasks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 74-78.
- Reis, U., B. Blum, B. U. von Specht, H. Domdey, and J. Collins.** 1992. Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Bio / Technology* 10: 910-912.
- Stavroulakis, D. A., N. Kalogerakis, and L. A. Behie.** 1991a. Growth characteristics of a *Bombyx mori* insect cell line in stationary and suspension cultures. *Can. J. Chem. Eng.* 69: 457-464.
- Stavroulakis, D. A., N. Kalogerakis, and L. A. Behie.** 1991b. Kinetic data for the BM-5 insect cell line in repeated-batch suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 116-126.
- Wang, M. Y.** 1994. Optimization of recombinant protein production and single-step purification in insect cell baculovirus expression system. Ph. D. Dissertation, University of Maryland, College Park, MD, USA.
- Wang, M. Y., T. R. Pulliam, M. Valle, V. N. Vakharia, and W. E. Bentley** 1996. Kinetic analysis of protease, recombinant protein production and metabolites for infected Sf-9 cells under different DO levels, *J. Biotechnol.* 46: 243-254.
- Wyatt, S. S.** 1956. Culture *in vitro* of tissue from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Gen. Physiol.* 39: 841-852.
- Zhang, J., N. Kalogerakis, and L. A. Behie.** 1992. Investigation of reduced serum and serum-free media for the cultivation of insect cells (Bm5) and the production of baculovirus (BmNPV). *Biotechnol. Bioeng.* 40: 1165-1172.
- Zhang, J., N. Kalogerakis, L. A. Behie, and K. Iatrou.** 1993. A two-stage bioreactor system for the production of recombinant proteins using a genetically engineered baculovirus / insect cell system. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 357-366.
- Zhang, J., N. Kalogerakis, L. A. Behie and K. Iatrou.** 1994. Optimum infection conditions for recombinant protein production in insect cell (Bm5) suspension culture. *Biotechnol. Prog.* 10: 636-643.

收件日期：1997年8月19日

接受日期：1997年9月19日

Factors Affecting Mass Production of HBsAg in M-BmN Cells Cultured in Shaking Flasks

Shou-Liang Wang, Roger F. Hou and Min-Ying Wang* Graduate Institute of Agricultural Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung, 40227 Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

This study describes the effect of stirring speed, concentration of serum, working volume and mode of culture methods on cell growth of the M-BmN cell line which was established from *Bombyx mori*. The cells could be cultured in suspension in shaking flasks at a speed of 80 rpm or below. If 0.2% of Pluronic F-68 was added into the IPL-41 medium, the cells could grow, even if the stirring speed was increased to 250 rpm. Studies on the effect of fetal bovine serum (FBS) concentrations on cell growth show that cells grew better in medium supplemented with 10% FBS than did those with 5% FBS. We also found that, when the working volume was 60 ml or more in a 250-ml shaking flask, the pH of the culture medium kept dropping and finally inhibited cell growth. In contrast, change of pH values in the culture medium, for cells growing in a flask with a working volume of 30 ml, first dropped, but then increased again. The increase of pH was used as a sign to indicate the timing to feed glucose and glutamine in a fed-batch culture method. This method, when applied to MBm-N cells culture, can increase the maximum cell density from 32×10^5 to 48×10^5 cells/ml. More significantly, the production of HBsAg could also be increased from 230 to 560 ng/ml.

Key words: insect cell culture, shaker, fed-batch, Hepatitis B surface antigen.