

Cambrex特色无血清培养基介绍及应用

培养动物细胞，无论是为了增殖病毒，还是为了获得相关的生物制品，都力求使细胞大规模、高密度生长，并在高密度下维持高的细胞活性，简化下游纯化工艺，提高生物制品的安全性和产率，降低产品的成本，提高市场竞争力。但是常规细胞培养基的组分——血清的存在严重制约了动物细胞的规模培养，使用户不得不再每次都要费心挑选出不同批次的血清中质量最好的一批，并为此而投入大笔的成本资金。如果您也为此而头痛，为什么不尝试一下无血清培养基呢？

无血清培养基 (serum free medium, SFM) 是全部用已知成分组配的不加血清的合成培养基，通常在含有细胞所需营养和贴壁因子的基础培养基中加入适宜的促细胞生长因子，保证细胞良好生长，是最适合于制药生产的培养基。它在提高细胞培养质量的同时，还有以下诸多优点：

- 无血清培养基批次一致性高，可以省去对培养基进行预筛选的工作。
- 无血清培养基成本降低，价格波动不大。如果用血清，那么很容易受到周围环境的影响（如天气干旱时，血清产量降低），而使血清价格有所调整。
- 无血清培养基不含有丝分裂原抑制剂，可以促进细胞增殖。
- 无血清培养基可以降低病毒、真菌、支原体等微生物污染的可能性。
- 无血清培养基组分稳定，可大量配制。
- 无血清培养基培养细胞，可以简化提纯和鉴定各种细胞产物的程序。

自1975年Sato首次成功地用无血清培养基培养了垂体细胞株以来，已经有几十种细胞系被报道可以在无血清培养基中成功地生长和增殖。20多年来，多家细胞学试剂公司加入到无血清培养基产品开发和研究的队伍中，而其中美国的Cambrex公司以其提供的高品质、多种类的无血清培养基而闻名于世界。

Cambrex的无血清培养基根据成分来划分，主要有三大类：

一、无血清培养基

无血清培养基中虽然不含血清，但仍然含有个别

蛋白或大量蛋白组分。它在基础培养基（如DMEM，F12，1640）里补充了一些添加物，包括人激素、牛的转铁蛋白，牛血清白蛋白等，其中胰岛素是重要的生长因子，可以刺激葡萄糖的利用和RNA、蛋白和磷脂的合成；转铁蛋白可以结合铁，也是重要的生长刺激蛋白；牛血清蛋白作为脂肪酸和某些微量元素的载体，还具有脱毒剂和保护细胞抗御剪切损伤的功能。Cambrex的Ultraculture，PC-1，HL-1以及X-VIVO系列都属于无血清培养基，它们的蛋白含量最高可达3mg/ml（Ultraculture serum-free medium），最低仅为20 μg/ml（如UltraMDCK serum-free medium）。Ultraculture，PC-1，HL-1培养基可以广泛应用于多种细胞系的培养；而X-VIVO系列主要用于造血细胞系的培养。

二、无蛋白无血清培养基

无血清培养基尽管相对常规培养基有它固有的优点，但是也有它不可避免的缺点。如需要对每个细胞系优化配方，添加成本较高的激素和生长因子，导致长的迟滞期，降低细胞生长速率、最大细胞密度和细胞活性等。所以无血清培养成功后，科学家又把眼光投入到无蛋白培养基的研究中，在无血清培养基中不再添加蛋白，仅加入一些化学成分明确的物质（如氨基酸、维生素和用柠檬酸铁代替转铁蛋白），但同样也能满足细胞生长和增殖的需要。这种无蛋白培养基可以广泛应用于实验室或工业规模的细胞培养，由于培养液中的蛋白都是由培养的细胞分泌产生，所以显著地简化了下游的纯化和处理程序；同时可以降低培养基的成本，便于培养基的存放和使用。Cambrex公司专门开发了UltraDOMA-PF无血清、无蛋白培养基用于培养杂交瘤细胞。

三、无动物来源的无血清培养基

无血清无动物组分细胞培养基是指以基础培养基配制的培养液无须添加牛血清，且该培养基成分中不含有任何动物来源成分，即可培养细胞和维持生长。许多利用基因工程技术重组的蛋白质最终要用于人体，所以在细胞培养生产生物制品过程中如果不添加动物来源

成分,可以避免疯牛病、口蹄疫等传播进入人体,减少人、兽在使用生物制品时的特异性免疫反应、降低产品成本(如降低培养液成本,简化下游纯化工作及提高产品收获量等)。

无血清无动物组分细胞培养基通常是特定细胞专用培养基,Cambrex公司提供了针对各种不同细胞系的多种无动物组分(NAO)的无血清培养基。

1. ProCHO系列

ProCHO₃-CDM, ProCHO₄-CDM和ProCHO₅-CDM是专门用于培养高密度的悬浮CHO细胞,它们能用于大规模、高密度的生产体积;维持细胞以高密度、高活性(通常>90%)生长;提供3种优化配方,供用户选择。其中ProCHO₃-CDM用于培养悬浮CHO细胞,可以增加细胞的生长,例如,当CHO-K1细胞以 3×10^5 cells/ml的密度播种,在细胞的存活率相似的情况下,ProCHO₃-CDM培养基培养的细胞显然比对照培养基的细胞生长要快;ProCHO₄-CDM用于CHO贴壁细胞向悬浮细胞的转化培养和CHO悬浮细胞的培养,CHO细胞可以从贴壁有血清培养向无血清悬浮培养快速转化,例如,CHO-K1细胞贴壁生长在DMEM/F12+10%FBS中,将其转移至无血清培养基中培养,ProCHO₄-CDM培养基中的细胞能够更快地适应在无血清悬浮培养环境;ProCHO₅-CDM用于培养悬浮CHO细胞,并能提高细胞蛋白的产率。

2. Pro293系列

Pro293系列的培养基都是用于培养293 HEK细胞。Cambrex提供两种Pro293培养基,Pro293a-CDM能够使培养在常规培养基中的293贴壁细胞适应在无血清培养基中生长,并能维持贴壁性和高存活率;Pro293s-CDM能够使贴壁细胞能够在无血清培养基中以单细胞状态悬浮生长,并能保持较高的存活率,例如,当293细胞以 4×10^5 cells/ml的密度接种于无血清培养基,Pro293s-CDM培养基培养的细胞明显具有更高的存活率和生长力。

3. ProDoma系列

ProDoma系列的培养基都是用于培养杂交瘤细胞的。Cambrex提供3种ProDoma无动物来源的无血清培养基,其中ProDoma1是化学成分明确的培养基,主要包含了Hepes和NaHCO₃缓冲液和0.1%的用于保护细胞抵御剪切力的乳化剂。

4. ProPer 1

ProPer 1培养基用于培养Per.C6细胞,该细胞在腺病毒基因治疗,疫苗、细胞因子和抗体的生产中起着重要的作用。ProPer 1培养基可以在最短的时间(24小

时)内使细胞密度达到 1.8×10^6 cells/ml,并维持较高存活率。长期培养的er.C6细胞也够维持生长、形态和功能的遗传稳定性。

5. ProVero 1

ProVero 1培养基用于培养Vero细胞系,也支持MDCK细胞的贴壁生长。

无血清培养基在培养细胞时,一般需要经过适应性训练,才能保证细胞可以在新的环境下正常生长和增殖。不过对于有些生长力比较顽强的细胞,可以不经适应性训练而直接将细胞接种至无血清细胞培养基中培养。Cambrex提供的UltraCULTURE无血清培养基蛋白含量高,成分复杂,与含血清的常规培养基组成相似,所以细胞可以很容易在该培养基中实现无血清培养。而无蛋白或者无动物来源的无血清培养基由于成分简单,与常规培养基的组成相差很大,所以需要针对特定的细胞进行配方设计,并且有进行适应性训练的必要性。

细胞从常规培养基到无血清培养基的适应性训练方法根据细胞的类型分为2种,在这里做一个简单的介绍。

对于悬浮细胞(需要2-6周):

1. 当细胞密度达到最大时开始适应性训练;
2. 加入无血清培养基,使细胞密度变为原来的1/2;
3. 当细胞密度达到最大时,加入无血清培养基,使细胞密度成为原来的1/5;
4. 培养细胞,如果细胞达到最大密度时,细胞的存活率大于85%,并且达到最大密度的时间与之前相近,那么细胞可以继续适应性训练;如果细胞显示生长缓慢或者存活率降低,那么需要重复2-3步3次;
5. 逐步提高无血清培养基的比例,直至细胞可以完全在无血清培养基中生长。

对于贴壁细胞(需要2-6周):

1. 细胞达到最大密度时,开始适应性训练;
2. 胰酶消化贴壁细胞,350×g离心5min收集细胞,用含5%血清的无血清培养基重悬,使细胞密度达到 3.0×10^5 cells/ml。
3. 培养细胞至达到最大密度;
4. 重复2-3步骤,依次在无血清培养基中加入2%,1%,0.5%和0.1%的血清,进行细胞培养;如果细胞的存活率低于80%,那么需要恢复至前一个血清的含量,或者采用更加细化的递减含量。
5. 无血清培养基培养细胞。