

搅拌釜式生物反应器中 Sf9 细胞培养入门指南

Marcus Deinstadt and Ma Sha

Eppendorf, Inc., Enfield, CT, USA

Contact: bioprocess-experts@eppendorf.com

摘要

本应用文献介绍了在搅拌釜式生物反应器中利用昆虫杆状病毒表达系统培养 Sf9 昆虫细胞并生产重组蛋白的方案，涵盖了不同工作流程步骤，包括制备用于感染 Sf9 细胞的病毒、在摇瓶中扩增 Sf9 细胞以及在生物反应器中培养 Sf9 细胞生产重组蛋白。研究采用配备 BioBLU® 3c 一次

性生物反应罐体的实验室规模 BioFlo® 120 生物反应器控制系统，利用 Sf9 细胞生产绿色荧光蛋白 (GFP)。本入门指南中提出的 Sf9 细胞培养原则可适用于更小或更大规模 Sf9 细胞培养工艺。

引言

Sf9 细胞来自草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*, 俗称秋黏虫) 蛹卵巢组织，常用于生产重组蛋白，以及分离和繁殖重组杆状病毒原液，同时也是生产重组腺相关病毒 (rAAV) 等其他病毒载体的合适宿主。Sf9 细胞能够悬浮培养，操作相对简单生长速度快，且可以进行翻译后修饰，因此已成为一种流行的表达系统。

利用 Sf9 细胞进行蛋白表达时常会用到杆状病毒表达载体系统 (BEVS)。BEVS 以杆状病毒科中的昆虫病毒为载体。此类病毒为杆状 dsDNA 病毒，可以感染鳞翅目昆虫，即 Sf9 细胞的来源昆虫。由于 BEVS 系统可以稳定产出正确折叠的生物活性蛋白且保持较高产率，因此被广泛用于昆虫细胞表达重组蛋白。自 Smith 等人于 40 年前发现并表征 BEVS 以来 [1]，BEVS 已被用于生产数千种蛋白，以进行各种研究 [2]。近年来，该技术已被用于商业化生产多种兽用和人用疫苗，包括几种流感疫苗和最近获批的一种新冠肺炎疫苗 [2]。BEVS 应用灵活、易于操作且整体安全性高，已成为研究人员

的一个宝贵工具。

杆状病毒有望成为基因疗法领域的基因递送载体。杆状病毒能够转导哺乳动物细胞，因此可以作为载体，介导具有治疗效果蛋白或非编码 RNA 的表达。除利用杆状病毒作为基因递送载体外，科研人员也正对 BEVS 昆虫细胞平台能否用于生产基因疗法领域的重组腺相关病毒 (rAAV) 进行评估 [2, 5]。

BEVS 工艺应用首先需要构建包含靶基因 (GOI, Gene of Interest) 的重组杆状病毒。方法是先将靶基因克隆至转运质粒中，再将转运质粒转化至感受态大肠杆菌，形成包含 GOI 和杆状病毒基因组的大型重组质粒 (杆粒)，最后将重组杆粒提取出来，并转染至昆虫细胞中以生产病毒。刚生产出来的病毒原液被称为一代，需要进行扩增以提高滴度和培养体积，才能用于生产重组蛋白 (图 1)。

本应用文献介绍了在实验室规模搅拌釜式生物反应器中使用 Sf9 细胞表达蛋白的工作流程 (图 2)。Sf9 细胞培养采用配备 BioBLU 一次性生物反应罐体的 BioFlo® 120 生物反应器控制系统。包含绿色荧光蛋白 (GFP, Green Fluorescent Protein) 作为 GOI 的杆状病毒, 被用于分析蛋白生产。

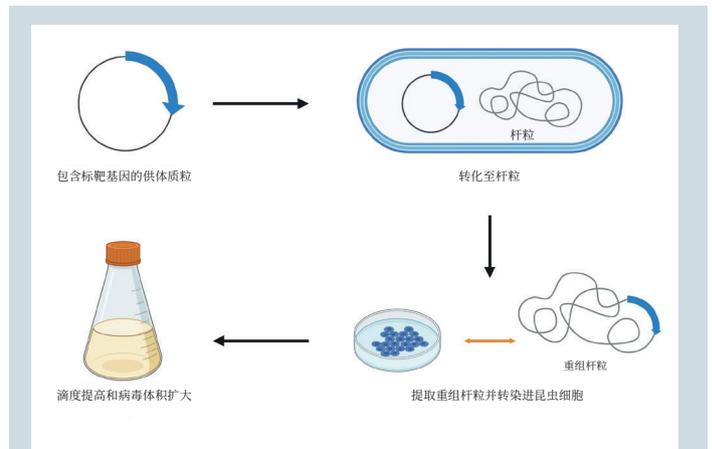


图 1: 杆状病毒构建。
使用 BioRender.com 绘制

材料与amp;方法

图 2 展示了本研究中利用 Sf9 细胞生产重组蛋白的工作流步骤。

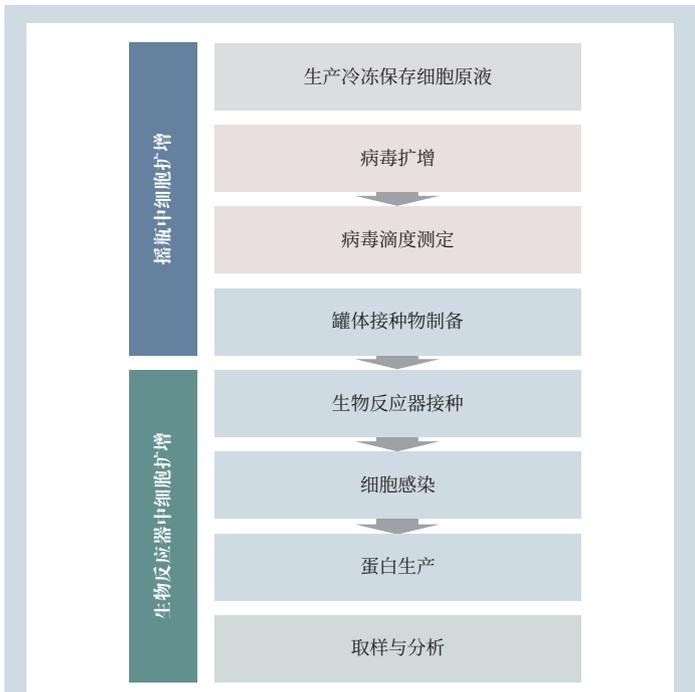


图 2: 本研究中利用 Sf9 细胞生产重组蛋白的工作流步骤。

细胞系与培养基

所有实验均使用 Thermo Fisher Scientific® 的悬浮 Sf9 细胞系 (Gibco Sf9 细胞, 货号 11496015)。细胞培养基选用 Sf-900 II SFM (Thermo Fisher Scientific, 美国), 一种不含血清和蛋白的昆虫细胞培养基, 十分适合 Sf9 细胞生长。培养装置选择不通风的一次性聚碳酸酯平底摇瓶 (Corning®, 美国), 且摇瓶置于 Innova® S44i 摇床 (Eppendorf, 德国) 中, 或选择配备 BioBLU 一次性生物反应罐体的 BioFlo 120 生物反应器控制系统 (Eppendorf, 德国)。摇床培养条件为 135 rpm 和 27°C, 而生物反应器则根据表 3 所列工艺参数进行细胞培养。

冷冻保存原液的制备

使用最初收到的细胞瓶创建细胞库。细胞解冻采用 ThawSTAR® CFT2 细胞复苏仪 (MedCision®, 美国)。将细胞转移到 125 毫升摇瓶中, 并加入 25 毫升预热培养基。之后在 Innova® S44i 摇床中进行细胞培养, 培养条件设定为 135 rpm、27°C。培养 3 天后, 根据赛默飞世尔科技公司提供的产品信息检查细胞密度和活力是否正常。确认细胞生长正常后, 再培养三代然后进行冷冻保存。冷冻保存过程如下, 所有步骤均需无菌: 首先在已加入 100 毫升培养基的 250 毫升摇瓶中进行细胞接种, 接种密度为 1.0×10^6 细胞 / 毫升。待细胞进入对数生长中期 ($2.0 - 4.0 \times 10^6$ 细胞 / 毫升) 后, 测定摇瓶中的细

胞总数。接着将细胞在 $130 \times g$ 下离心沉淀 3 分钟 (Eppendorf, 德国 5430 R 离心机), 并按 1.5×10^7 细胞 / 毫升的目标细胞密度将细胞重悬于表 1 所示预制冷冻保存混合物中。然后将细胞以 1 毫升的体积分装到 2 毫升冷冻小瓶 (Corning®, 美国) 中, 并将小瓶放入细胞冻存盒中, 一起放入 -80°C 冷冻柜中冷冻过夜。最后将细胞转移到液氮中保存, 以备将来实验使用。

表 1: 冷冻保存培养基

组分	最终浓度
Sf-900 II SFM 条件培养基	46.25%
新鲜 Sf-900 II SFM 培养基	46.25%
二甲基亚砷 (DMSO) 冷冻保存剂	7.5%

摇瓶中细胞扩增与罐体接种物制备

为扩增病毒或准备罐体接种物, 首先需要在摇瓶中扩增 Sf9 细胞。首先按照上节所述解冻复苏一个冷冻保存的冻存管, 再将细胞转移至 125 毫升摇瓶 (内含 25 毫升预热培养基) 中。培养 3 天后, 根据赛默飞世尔科技公司提供的产品信息检查细胞密度和活力是否正常。确认细胞生长正常后再培养两周, 然后启动病毒原液生产和罐体接种。每周一、三、五进行细胞传代。周一和周三接种密度为 1.0×10^6 细胞 / 毫升, 周五接种密度为 0.5×10^6 细胞 / 毫升。摇瓶装液量保持在所用摇瓶总容量的 30% - 40% 之间。表 2 列出了实验的传代数、所用摇瓶和培养物体积。

表 2: 所用细胞培养摇瓶和培养物体积

细胞传代数	摇瓶容积	培养物体积
1-2	125 mL	50 mL
3-5	250 mL	100 mL
5+	1000 mL	300 mL

病毒制备

为证明杆状病毒可以用于生产重组蛋白, 我们使用包含绿色荧光蛋白 (GFP) 作为 GOI 的杆状病毒。包含 GFP 的杆状病毒来自 ABM® (Applied Biological Materials Inc., 加拿大)。

病毒扩增

我们从供应商处购买的病毒小瓶中含有 10 毫升病毒, 二代滴

度为 10^6 感染细胞 / 毫升, 需要扩增并提高滴度和病毒量后, 才能用于感染罐体中细胞。扩增病毒原液时, 感染复数 (MOI, Multiplicity of Infection) 应小于等于 0.5, 以防止缺陷病毒颗粒堆积 [3]。

为扩增病毒, 摇瓶接种密度为 1.0×10^6 Sf9 细胞 / 毫升, 培养过夜, 至密度达到约 $1.5 - 2.0 \times 10^6$ 细胞 / 毫升。第二天使用 Vi-CELL® BLU 细胞计数仪 (Beckman-Coulter®, 美国) 进行计数, 测定摇瓶中细胞总数。之后再根据以下公式, 以 0.1 的感染复数 (MOI) 感染细胞, 并按照上文所述方式进行培养。

$$\text{用于感染的病毒量 [mL]} = \frac{\text{所需 MOI [pfu/cell]} \times \text{细胞总数}}{\text{病毒接种滴度 [pfu/mL]}}$$

公式 1: 确定用于感染的病毒量

pfu: 空斑形成单位

感染后 48 小时收获细胞。收获时, 在层流罩内使用血清移液器将培养物移取至离心管内, 然后在 $250 \times g$ 离心力下离心 5 分钟, 以去除细胞和碎片。离心结束后, 使用血清移液器将病毒转移至层流罩内的储存瓶中, 在 4°C 下避光保存直至使用。每次罐体接种均需连续重复上述流程两次, 以提高病毒量和病毒滴度。

病毒滴度测定

以合适的 MOI 感染细胞培养物进行蛋白生产, 必须获知病毒滴度。测定 BEVS 病毒滴度的标准方法是空斑测定法。但这种方法耗时费力, 步骤繁多, 需要 7-10 天才能完成。因此, 本研究采用 Imasaki 等人 [4] 描述的方法测定病毒原液滴度, 该方法既易于操作又能快速估算滴度。简单来说, 该方法是对病毒进行多次稀释, 再用其感染多个摇瓶, 并用一个未感染摇瓶作为对照。感染 24 小时后进行细胞计数, 以测定细胞密度。该测定方法假设已感染细胞不会再行分裂。根据这一假设, 如果所有细胞均已被感染, 则细胞密度在感染时和感染 24 小时后保持不变。如果细胞亚群被感染, 则其不会分裂, 但未感染细胞仍会增殖。因此, 可以根据感染后 24 小时细胞密度计算出初始感染率, 并由此推算出 MOI, 进而估算出病毒滴度。总而言之, 病毒滴度可以根据加入细胞培养物中的病毒原液量和感染 24 小时后细胞密度计算得出。详细的方案, 包括计算公式, 详见参考文献 4。

生物反应器中 Sf9 细胞培养

Sf9 细胞培养采用 BioFlo 生物反应器控制系统 (图 3)。BioFlo 120 可以同时控制 Eppendorf 玻璃罐体和 BioBLU 一次性生物反应罐体。本次实验选择使用一次性生物反应罐体。一次性生物反应罐体具有诸多优势,如无需对生物反应器进行清洗和高温高压灭菌,有助于减少准备时间,降低实验污染风险。

接种密度

所有培养物的接种密度均为 $0.5 - 0.6 \times 10^6$ 细胞 / 毫升。

感染

所有培养物感染的 MOI 均为 2, 但细胞密度不同, 以研究密度对蛋白产量的影响。

温度

温度设定为 27°C, 使用加热毯进行控制。设定温度需于接种前输入并达到。

pH

使用凝胶填充 pH 传感器监测 pH 值。本次实验仅对 pH 值进行监测而不加以控制。原因是在 Sf-900 II SFM 培养基中培养 Sf9 细胞时, pH 值通常稳定在约 6.1-6.5 之间, 此种小范围波动一般不会影响实验运行或所生产产品。

溶氧

实验使用极谱传感器 (Mettler Toledo®, 瑞士) 测量溶氧, 并在 3-Gas 自动模式下通过大型分布器喷入空气和 / 或氧气 (流速 0.04 SLPM – 3.0 SLPM), 将溶氧控制在 50%。

如果接种时仍未达到溶氧设定值, 通常是可接受的。初始溶氧测量值约为 100% 没有问题, 会随着培养物代谢氧气而逐渐下降。

搅拌

培养物搅拌使用一个斜叶桨, 搅拌速度 115 rpm (叶尖线速度 0.4 m/s)。



图 3: 配备 BioBLU® 3c 一次性生物反应罐体的 BioFlo® 120 生物反应器控制系统。

技术特点

BioBLU® c 系列一次性生物反应罐体的工作体积从 100 毫升到 40 升不等, 并有多种型号可供选择, 各型号间区别在于分布器类型、叶轮数量、叶轮类型和可兼容传感器类型。此外, 一次性隔膜、三端口和压缩接头适配器也有助于灵活使用 Pg 13.5 端口。



如需进一步了解 BioBLU c 系列一次性生物反应罐体的技术信息, 请访问

www.eppendorf.group/bioblu-c

表 3: 工艺参数和设定值

参数	设备/设定值
起始体积	2.5 L
接种密度	0.5 – 0.6 × 10 ⁶ 细胞 / 毫升
搅拌速度	115 rpm (轮缘速度 0.4 m/s)
温度	27 °C
溶解氧	50 % (P=2; I=0.09)
通气范围	空气流速: 0.04 SLPM – 3 SLPM 氧气流速: 0 SLPM – 3 SLPM
病毒体积	MOI 为 2

生物反应器运行

接种后，生物反应器即按照上文所述工艺参数开始运行。

接种两天或三天后，用病毒以 2 的 MOI 感染细胞。为此，需按照病毒制备一节所述无菌收集病毒并离心沉淀，然后将其加入无菌转运瓶中。当培养物达到所需密度后，将转运瓶焊接至生物反应器，病毒悬浮液就可通过系统泵转移至罐体中。感染完成后，继续培养 4-5 天。

结果

本研究目的在于分析在 BioFlo 120 生物反应器控制系统中使用昆虫细胞生产重组蛋白的可行性。为评估其可行性，我们共进行了两批次培养。第一批培养物的目标感染细胞密度为 2.0 × 10⁶ 细胞 / 毫升。第二批培养物的目标感染细胞密度为 3.0 × 10⁶ 细胞 / 毫升。

细胞生长分析

第一批培养中，细胞数量在约 24 小时便实现翻倍，即在接种后第二天达到 2.1 × 10⁶ 细胞 / 毫升。在用病毒原液以 2 的 MOI 感染细胞后，细胞生长停滞 (图 4A)。感染后 24 小时，平均细胞直径从感染前约 15.6 μm 增大到感染后约 17.5 μm。感染后细胞活力开始下降，符合对细胞培养物感染病毒后的预期 (图 4A)。

取样与分析

每天从每个罐体中取样分析。为确保从培养物中提取到无菌样品，将一个 5 毫升无菌注射器连接至鲁尔锁取样口。首先取样 3 毫升并丢弃，然后换用新注射器再次取样 3 毫升，用于分析和细胞测量。

细胞生长与活力

使用 Vi-CELL 分析仪测量细胞数量、活力和直径。病毒感染导致细胞生长停滞和细胞直径增大，因此监测这些参数可用于估算感染成功率。

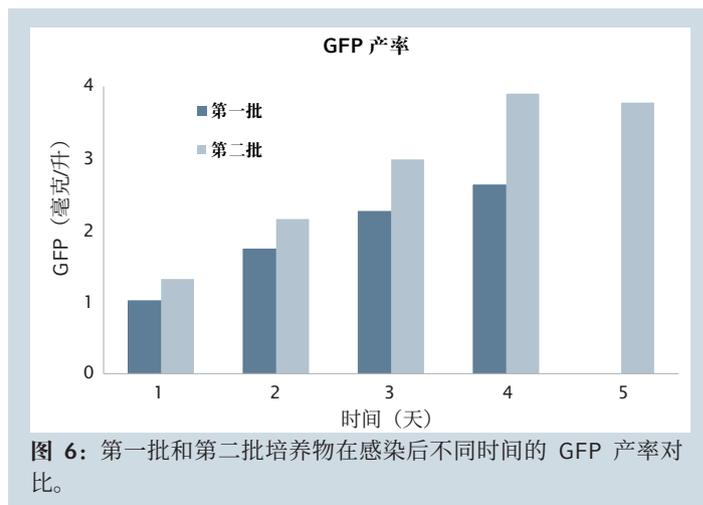
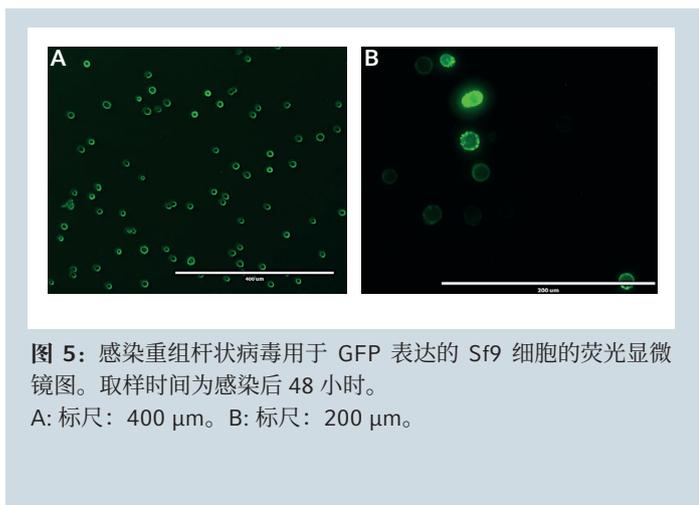
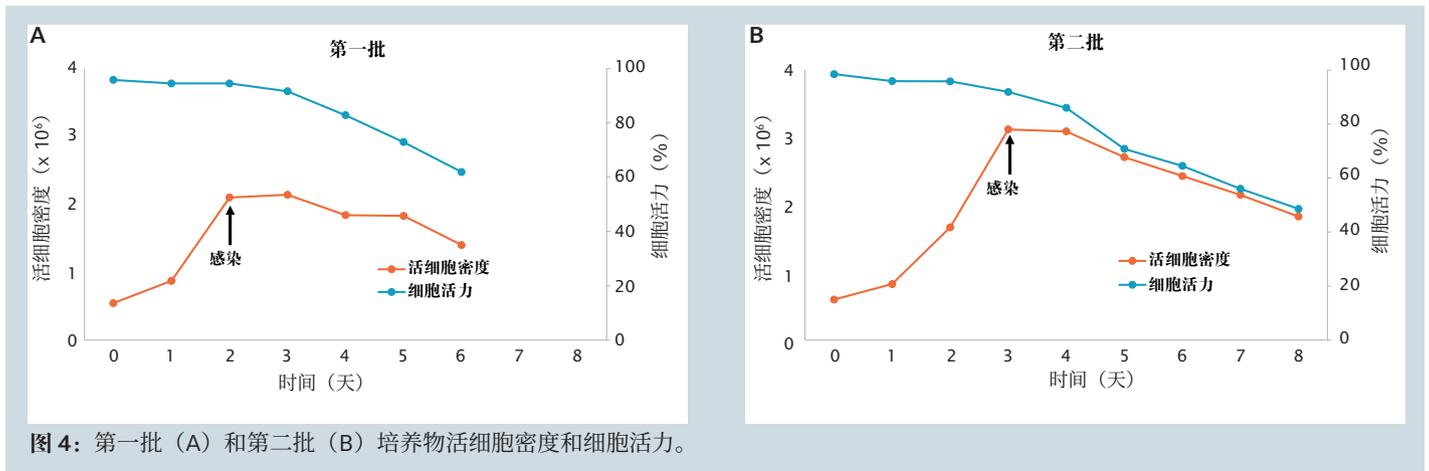
GFP 生产

感染 24 小时后开始取样分析重组 GFP 生产。首先取样并在 -80°C 下冷冻；然后通过荧光显微镜分析 GFP 表达，并使用 Abcam® (Abcam, 英国) GFP 定量试剂盒进行测量。

第二批培养选择提高感染密度，以 3.0 × 10⁶ 细胞 / 毫升作为目标。细胞生长与第一批培养一致，第三天活细胞密度达到 3.1 × 10⁶ 细胞 / 毫升 (图 4B)。与第一批培养相同，在用病毒原液以 2 的 MOI 感染细胞后，细胞生长停滞 (图 4B)。感染前平均细胞直径约 16 μm，感染 24 小时后增大到约 17 μm。

GFP 表达分析

感染后每 24 小时取样一次，以分析蛋白生产。GFP 表达可通过荧光显微镜展示 (图 5)。此外，GFP 生产的定量结果如图 6 所示。第二批培养物在每个取样点的产率均高于第一批，第 4 天产率甚至高出约 50%，该结果与第二批培养物的感染密度较高有关。第五天未对第一批培养物进行取样。而对第二批培养物则坚持每日取样，直至第 5 日观察到蛋白浓度开始下降。



结论

上述实验展示了借助 BioFlo 120 生物反应器控制系统，使用 BioBLU 一次性生物反应罐体在昆虫细胞中生产重组蛋白的工作流程。两批培养物的细胞密度不同，但都成功感染病毒。每

批培养物的 GFP 分析表明，感染密度越高，蛋白产率越高。所述方案可作为进一步优化的基础。

参考文献

- [1] Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol.* 1983 Dec;3(12):2156-65. doi: 10.1128/mcb.3.12.2156-2165.1983. PMID: 6318086; PMCID: PMC370086.
- [2] Pidre, M.L.; Arrías, P.N.; Amorós Morales, L.C.; Romanowski, V. The Magic Staff: A Comprehensive Overview of Baculovirus-Based Technologies Applied to Human and Animal Health. *Viruses* 2023, 15, 80. <https://doi.org/10.3390/v15010080>
- [3] Wickham, T.J., Davis, T., Granados, R.R. et al. Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. *Biotechnol Lett* 13, 483–488 (1991). <https://doi.org/10.1007/BF01049204>
- [4] Imasaki T, Wenzel S, Yamada K, Bryant ML, Takagi Y. Titer estimation for quality control (TEQC) method: A practical approach for optimal production of protein complexes using the baculovirus expression vector system. *PLoS One.* 2018 Apr 3;13(4):e0195356. doi: 10.1371/journal.pone.0195356. PMID: 29614134; PMCID: PMC5882171.
- [5] Fradin S. Development of a Scale-Down Model for rAAV Viral Vector Production Using a Sf9/BEV System. Eppendorf Application Note 303.

订购信息

产品描述	订购号
BioFlo® 120, 基础控制站, 配备水管接头	询问 *
BioBLU® 3c 一次性生物反应罐体, 大型分布器, 1 片斜叶叶轮, 光学 pH 传感器, 无菌, 1 件	1386125000
Innova® S44i, 可叠放摇床	询问 *
5430R 离心机, 高速离心机	询问 *

*询问您所在国家的零件编号

Eppendorf 中国

服务热线: 400 885 6070

电子邮件: marketinfo@eppendorf.cn

www.eppendorf.com

Abcam® is a registered trademark of Abcam PLC, United Kingdom. Mettler Toledo® is a registered trademark of Mettler-Toledo GmbH, Switzerland. ABM® is a registered trademark of Applied Biological Materials Inc., Canada. VI-CELL® is a registered trademark of Beckman Coulter, Inc., USA. Beckman Coulter® is a registered trademark of Beckman Coulter, Inc., USA. ThawSTAR® is a registered trademark of MedCision, LLC, USA. MedCision® is a registered trademark of Biocision, LLC, USA. Thermo Fisher Scientific® is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific Inc., USA. Corning® is a registered trademark of Corning Inc., USA. Eppendorf®, the Eppendorf Brand Design, and BioBLU® are registered trademarks of Eppendorf SE, Germany. BioFlo® and Innova® are registered trademarks of Eppendorf, Inc., USA.

Eppendorf SE reserves the right to modify its products and services at any time. This application note is subject to change without notice. Although prepared to ensure accuracy, Eppendorf SE assumes no liability for errors, or for any damages resulting from the application or use of this information. Viewing the application note alone cannot as such provide for or replace reading and respecting the current version of the operating manual. All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2023 by Eppendorf SE.