

新型一次性积压管 用于快速精确评估哺乳动物悬浮细胞生物量

Matthieu Stettler, Nicolas Jaccard, David Hacker, Maria De Jesus,
Florian M. Wurm, Martin Jordan

École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Faculty of Life Sciences,
Institute of Bioengineering, Laboratory of Cellular Biotechnology,
CH-1015 Lausanne, Switzerland; telephone: +41 21 693 61 41;
fax: +41 21 693 61 40; e-mail: florian.wurm@epfl.ch

Received 27 February 2006; accepted 2 June 2006

Published online 25 July 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.21071

摘要: 我们展示一种全新的, 通过一次性微量离心机进行细胞培养生物量测量管。特别设计的管子配有一个上腔体用于样品上样, 下腔体5 μ L是用于离心过程中收集细胞的毛细管。细胞体积 (PCV) 可以定量, 表示为占总体积的百分比。本研究的重点是使用几个示例验证其广泛适用于哺乳动物细胞系的可行性。

PCV方法被证明比手动细胞计数更精确, 快速和更高重复性

关键词: 积压细胞体积 CHO DG44; HEK 293; NS0; 细胞生长; PCV管; 细胞体积

介绍

生物量是评价生物工艺的关键参数。

需要对该变量进行精确监控, 以确保特定的生长速率和最大或最终细胞密度。

此外, 生物量的准确评估是确定代谢变化的先决条件, 也是建立连续培养补料的控制策略必要条件。

(Konstantinov, 1996)。

市面上有多种方法可以测量生物量。

微生物领域中, 光密度和干重测定被广泛用于监测生长。

但是这些方法敏感度较低并不适用于哺乳动物细胞, 因为哺乳动物细胞在体外生长的密度相对较低。

染色细胞计数法仍然是最常见的学术实验室中使用的方法。

Correspondence to: F.M. Wurm

Martin Jordan's present address is Laboratoires Serono SA, Succursale de Corsier-sur-Vecvey, Route de Fenil Z.I. B, CH-1804 Corsier-sur-Vecvey Switzerland.

然而此方法的重现性和准确性有限, 并且显微镜检查是非常主观的而乏味的, 尤其是检测多个样品时。

自动化粒子计数器可提供更快, 重复性更好的细胞计数方法。

这类仪器结合采样设备, 必要染料和计数腔体与集成显微镜或不使用染料, 用电学或光学特性区分活细胞和死细胞。

但是, 这些系统通常需要稀释细胞内的悬浮液确定的细胞密度范围, 细胞染色以及需要特定的悬浮液缓冲液。

并且, 细胞聚集体可能导致生物量测定误差。尽管其中一些系统已经在工业生物工艺中应用, 这主要其实是由于成本因素。

对于仪器化生物反应器, 耗氧量或葡萄糖消耗的速率可以间接在线测定哺乳动物细胞浓度 (Ducommun等人, 2001; Lubenova et al., 2003; Schoenherr et al., 2000)。

常见细胞内酶法也已被用于测量活细胞数。

这些方法需要谨慎控制培养条件和建立每种细胞的标准曲线。

对于当前生物量测定的局限性, 我们测试了一种广泛应用用于血液分析的方法

通常, 一份 (50 μ l) 的血液

被装入毛细管, 然后离心。

用仪器测量毛细管内的细胞颗粒高度

表示为细胞体积 (PCV) 或

红细胞压积, 即血液中细胞的占有率。

在这种情况下, 典型的PCV值范围为30 - 50%。

对于培养细胞, PCV要低得多。

红细胞压积管的灵敏度不够高。

因此，为克服了这一局限性我们设计并测试了一种新型的一次性微量离心管。

该管的几何形状经过精心选择，使其上腔最大可装1毫升细胞悬液。外径与标准1.5毫升微量离心管相同。下部腔体是一个带有刻度的毛细管，容量为5ul。离心后，样品中的细胞会聚集在毛细管内。由此利用样品中的细胞和可离心的细胞碎片测量生物量的多少。

该方法的优点是比显微镜细胞计数法更精确，重复性更高，速度更快。

在对大量工艺条件进行多参数测试的情况下，PCV方法能够在任意时间对数百种不同培养物的生物量增量进行比较。

一般来说，这种方法处理50个样品仅需不到30分钟，这显然比任何其他现有的生物量测定方法更快。

这种方法的精确性和易用性使它可以在短短几个小时的间隔内对大细胞培养容器内的生长参数进行精确快速的测量分析。

在此，我们介绍一种用于哺乳动物细胞悬浮液生物量测量的新型的一次性微型PCV管。

这项研究的重点是比较其与手动细胞计数法的重现性、精度和可靠性。

PCV管成功应用的示例：

中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，

人胚肾293（HEK 293）细胞和小鼠NS0骨髓瘤细胞。

材料和方法

细胞培养

已适应悬浮生长的 CHO DG44, HEK 293和NS0细胞，限定化学成分培养基ProCHO5-CDM

（Cambrex Bio Sciences, Verviers, 比利时），EX-CELL 293无血清培养基（SAFC Biosciences, 英国安多佛），和HyQ-CDM4NS0（HyClone, South Logan, UT）。

除非另有说明，否则细胞在50 mL一次性使用的TubeSpin1生物反应器中（TPP）或500 mL圆形或方形瓶中培养。

细胞培养环境是带有CO₂以及湿度控制，在37° C（ISF-4-W, Adolf KuhnerAG）下圆周轨道摇动培养。

细胞每隔3-4天在细胞密度2-5x10⁵ cells/mL的情况下传一代。

此外，在20 L中试规模的生物反应器中培养重组NS0细胞系超过250小时。

不同存活率的CHODG44样本由活细胞和死细胞混合获得。

生产死细胞，细胞悬液200g离心5分钟
去掉上清液后，取细胞颗粒37°C孵育4h，
使用台盼蓝染色检测法手工计数

（见下文）证明细胞失去了活力，但仍保持其大小和形状。

通过按不同比例混合活细胞和非活细胞获得最终样品。

细胞计数和PCV测定

用血细胞计数器，台盼蓝染色检测法评估细胞密度和活性。

细胞密度包括活细胞和非活细胞，因此称为总细胞密度。除非另有说明，否则测试标准按如下参数进行：

将混匀的悬浮培养液的等分试样

（100-1,000 mL以100 mL的倍数）转移至迷你PCV管（TPP）（图1A）。

将试管在离心机（型号5417C, Eppendorf AG, 汉堡, 德国）配转子（型号A-8-11, Eppendorf AG）在2,500g（5,000 rpm）下持续离心1分钟。

确定细胞沉淀高度：

用毛细管自带的刻度线（图1B）。

或者，以制造商提供的无刻度管使用内部图像分析装置（图1C）。

微型PCV管的下半部分是用网络摄像头（Watchport / V2 USB摄像头, Inside Out网络, 得克萨斯州奥斯汀市）拍摄，并使用为此专门使用Java开发的程序自动进行分析：

该软件已经优化，可以测量

细胞沉淀的高度并计算相应的

体积占加载到容器中的总体积的百分比

结果与讨论

确定最佳离心条件：

首先，保持恒定在1分钟的离心时间，

将装载于PCV管中的CHO DG44或HEK 293

测试离心力100至6,000g下结果。

当离心力在100-1000之间变化时，PCV在1%-2%的数值范围内急剧下降。

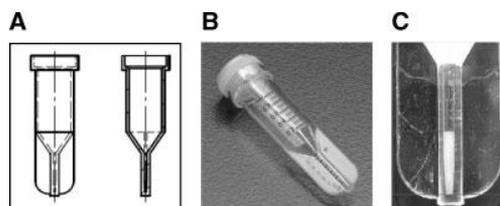


Figure 1. Mini PCV tube geometry (A), commercial version of the mini PCV tube with graduation (B), and image analysis of the cell pellet (C) (technical drawing and photo courtesy of Techno Plastic Products AG, Switzerland). The transparent tube has a diameter of 13 mm and a height of 43 mm. The maximal volume of the capillary is 5 mL.

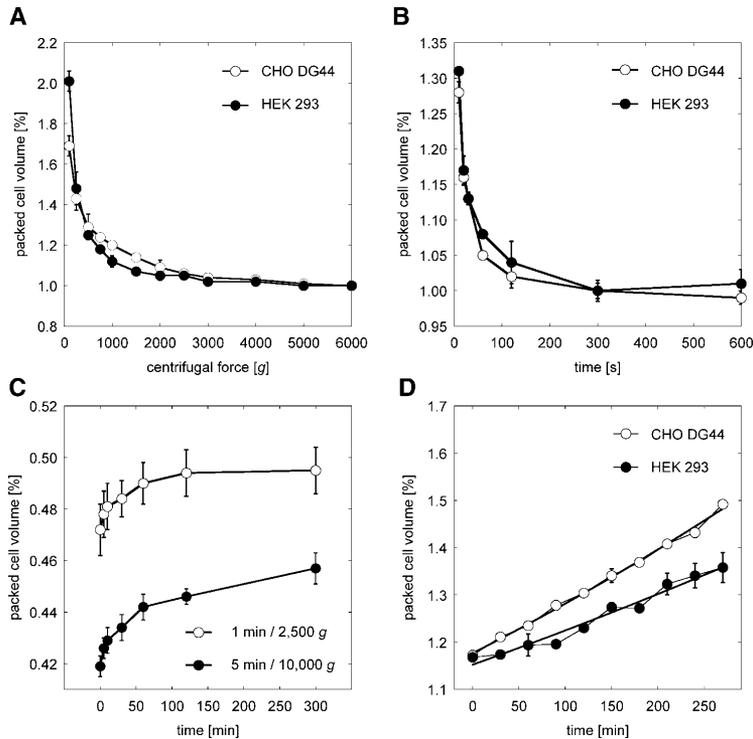


Figure 2. Variation of the PCV as a function of the centrifugation force (A) and centrifugation time (B) for suspension CHO DG44 and HEK 293 cells. The cells were centrifuged for 1 min in mini PCV tubes. Average PCV values are reported (n % 3). (C) Increase of the packed cell volume post-centrifugation in mini PCV tubes at different time and speed combinations. PCV measurements were made from the same batch of CHO DG44 cells. Average PCV values are reported (n % 8). (D) Packed cell volume measurements at 30 min time intervals of suspension CHO DG44 and HEK 293 cells in exponential growth phase. Average PCV values are reported (n % 3).

离心力大于2500g时，PCV趋于稳定朝向水平渐近值。离心力小于2500g时，CHODG44和hek293细胞曲线明显不同。在较低的离心力测试时，即使是培养基粘度微小的差异也会导致这种现象。

CHO DG44和HEK 293细胞培养，即使在大致相同的生物量浓度情况下，由于培养基成分不同，粘度也不同以及细胞系特异性代谢产生的化学物质不同，在低离心力的情况下可能导致沉淀间隙差异。在更高的离心力下，这些差异似乎不那么重要。

接下来，离心力保持恒定在2500g离心时间10到600s。CHO DG44和HEK 293细胞的所得PCV值大约1%到1.3%（图2B）。

离心时间1分钟的时间似乎是沉淀体积变化和速度2种需求之间的一个很好的折衷选择。根据这些观察结果，PCV的标准条件测量值定义为：2500g，持续1分钟。

但是，随着细胞堆积密度的增加，离心后细胞沉淀度越高越容易观察到膨胀（图2C）现象。

细胞培养样品在两个不同的微型PCV管中离心然后，沉淀细胞在5小时内进行监控。结果表明，经过5分钟以10,000g离心时，细胞沉淀的膨胀率，离心后5小时为8.2%。

这几乎是标准测量的膨胀量两倍（1分钟和2500克时为4.7%）。

而且，在更高的离心力下较长的离心时间，在室温下5小时后沉淀物仍在继续膨胀

结果还表明：大部分颗粒膨胀发生在离心后10分钟内（图2C）。

在这段时间内，由于颗粒膨胀而引起的PCV增量约为2%。

因此PCV的测量应当在离心后立即进行，从而提高重现性。

我们猜想这种膨胀是由于细胞在离心时变形离心后的细胞在恢复更球形的细胞形状导致。

PCV测量的准确性通过对相同的CHO DG44测量10个单独
样品悬浮培养。

然后进行PCV测量，

1小时后用相同的培养样本重复一次。

统计结果分析表明：

一，10次独立PCV测量的误差通常要少于平均值的1%，
显示高度可靠性。

二，一小时内生物量的增与平均PCV在统计学上相关。
两个时间点的值分别为0.484%和0.492%。

图示的高精度打开了细胞培养生长监测新的一页
在此之前，很难在很短的时间内测量细胞的生长
主要是因为生物量分析的常规方法：
手动计数或血细胞计数器通常会产生
5%-20%的误差。

而该PCV方法，最有可能产生错误的原因在于采样和
将材料放入迷你PCV管的过程中。

但是，出现错误的概率非常低，因为只需要一次移液就
可以了，不需要稀释步骤。

验证PCV方法在非常短的时间间隔内对于悬浮生长细胞分
辨率，将处于对数生长期的CHO DG44和hek293细胞在
500ml正方形培养基中培养，每30min取样一次，持续
4h。

结果表明，生物量从一开始1.17%，增加到了
CHO-DG44和hek293细胞分别为1.49%和1.36%。

用指数曲线拟合数据，CHO-DG44和HEK-293细胞的
生长速率(m)分别为 8.6×10^{-4} 和 $6.1 \times 10^{-4}/\text{min}$
(图2D)。这些值分别对应约13h和19h的对数增长。

这个例子表明：

即使细胞系间或者由于工艺条件的不同生长存在差异
也可以很容易地在短时间内用PCV方法进行可靠的测定。

同样的程序对于手动测量是不可行的，由于该方法误差
率较高。

为了确定处于对数生长期的培养物手工计数的细胞密度
值与PCV之间的相关性，将CHO DG44和NS0细胞在50 mL的
TubeSpin1生物反应器培养，每3-4天进行传代。

测定PCV和细胞密度每个细胞系每天重复两次，共30天，
共120个样本。

将每个平均PCV值绘制为对应的平均细胞密度(图3)。

从结果可以明显看出，这两个细胞系有不同的沉淀体
积。但是，对于两种细胞系来说，直至密度 4×10^6 个细胞
/ mL，PCV与细胞密度之间的大概都线性相关(图3)。

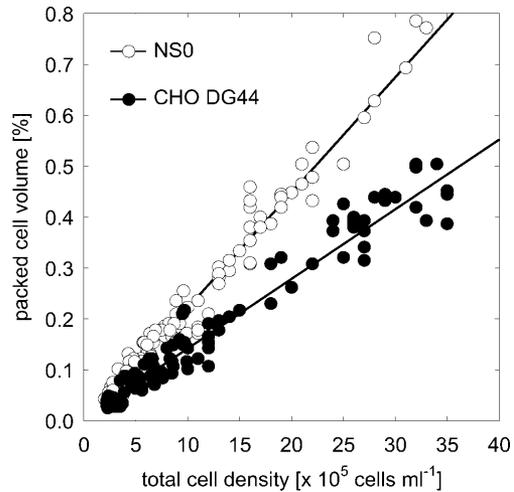


Figure 3. PCV of CHO DG44 and NS0 myeloma cells as a function of
total
cell density assessed by manual cell counting. The cells were subcultivated
every 3-4 days and samples were taken twice per day. The linear regression
gives the correlation between the two biomass assessment
methods for each cell line. Average PCV values and manual cell
counts are reported
(n=2).

然而，在更加高的细胞密度下，平均细胞体积略有减
少，**相关系数不是线性的**(数据未显示)。
这表明细胞培养趋近于稳定期时，**细胞体积发生了变化**
这可以解释为**细胞体积的增加不一定与细胞生长周期正**
相关。事实上，当细胞密度增加，生长因子的可利用性
可能降低导致较小的细胞体积(Conlon
and Raff, 2003)。

通常，细胞生长包括两个细胞参数的增加——数量和体
积。

但是，PCV与手动细胞计数两种方法本质上是不同的。
生物量分析的层面上，考虑到由于渗透压变化也会影响
细胞体积的变化。

一份(200毫升)的混合CHO DG44或HEK293细胞的悬浮液
用相同体积不同浓度的PBS缓冲液稀释，使渗透压从低
(150mosm/kg)至高状态(1500mosm/kg)。

在每种不同的渗透条件下测得PCV值，并将其标准化为
150 mOsm/kg(图4A)。

令人惊讶的是，两种细胞系的细胞体积在150-
800mosm/kg之间存在三倍的差异。

然而，在800至1500 mOsm/kg范围内测得的PCV几乎没有
差异(图4A)。

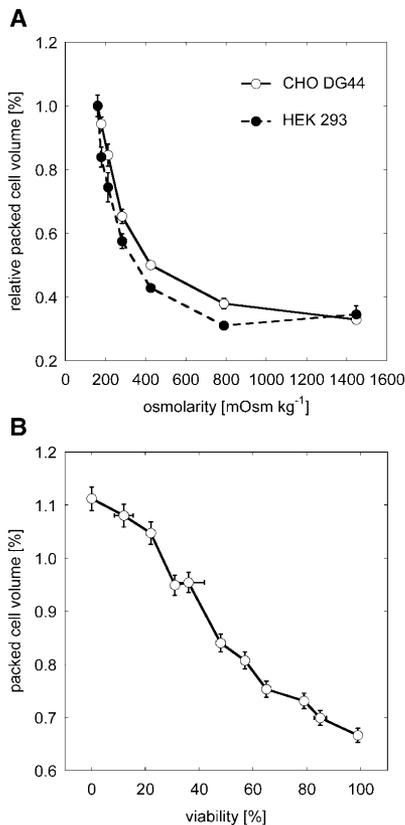


Figure 4. A: Relative PCV of CHO DG44 and HEK 293 cells under different osmotic conditions. Sample (200 mL) were mixed with 200 mL of PBS at different concentrations and transferred to a mini PCV tube for measurement. The samples were taken from the same initial cultures of CHO DG44 and HEK 293 cells, respectively. Average relative PCV values are reported (n = 3). B: Packed cell volume of CHO DG44 cells under hyperosmotic conditions (1,300 mOsm/kg) as a function of cell culture viability. The viability was

最后，将PCV法应用于20L规模生物反应器NSO细胞株的重组蛋白生产的监测。

使用手动细胞计数和PCV值用于确定培养物的生长曲线（图5）。

在整个对数生长期，观察到两种测量方法之间的良好相关性。

而PCV法的平均误差（1.7%）较人工细胞计数（5%）低。达到最大细胞密度后，PCV保持相对恒定，而总细胞密度下降（数据未显示）。

这可能是由于死亡细胞和细胞碎片随时间的积累，这些细胞碎片包括在PCV测量中，但不包括在人工细胞计数中。

在培养的稳定期和凋亡期，由于存在大量颗粒、细胞碎片和聚集体，人工细胞计数极不准确。

相比之下，由于所有可离心材料都压缩了，即使在培养的后期，PCV测量的误差仍然非常低。

市面上大多数细胞培养基渗透压在260至310 mOsm/kg之间。

数据表明在这个范围内渗透压的微小变化会大大影响细胞体积。

类似的渗透压变化已经被以前用红细胞和软骨细胞进行的实验证实。

《Boyle-van't Hoff 关系预测不同渗透条件下的细胞体积》（Guilak等人，2002年；Yang和Kamino，1995年）。

真核细胞的这种“理想”渗透行为被用来区分渗透活性（活的）和非活性（死的）细胞。

当细胞培养超过3天或4天时，培养物的活力通常会下降，可能是由于营养物质耗尽和代谢废物的积累。

我们认为死细胞失去了渗透的能力。制备多份细胞密度相同，存活率0-99%的CHO DG44细胞的样品，并与等量的浓缩PBS溶液混合，使之最终渗透压为1300mOsm/kg。

然后绘制不同培养物的PCV值作为细胞培养活力的函数（图4B）。

在这些条件下，存活率为99%的细胞的PCV值为0.7%，而相同数量的死细胞的PCV值超过1.1%（图4B）。

因此，正如所假设的那样，死细胞（通过台盼蓝排除法）对渗透压的增加没有反应。

这些结果表明，PCV方法也可以作为一种用于快速评估细胞活力的工具。

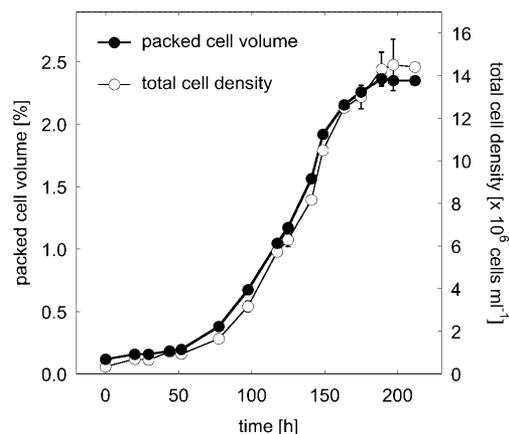


Figure 5. PCV and total cell density of a recombinant NSO myeloma cell line. The cells were cultivated in a 20-L fed batch bioreactor for the production of a monoclonal antibody. Average PCV and cell counts are reported (n = 2). The average errors for all the PCV

本文介绍了一种快速、低成本高精确性的生物量测量方法。

通过对该方法的验证，确定了离心的最佳条件。该研究还证明了该方法在不同条件、不同细胞系、培养基和培养技术下的潜在应用。

与人工细胞计数不同，PCV方法统计总生物量更可靠，包括培养后期出现的细胞碎片和聚集体。由于该方法的高灵敏度，即使是代谢活动的微小变化也能得到高精度的监测。

这种新方法迈出了在现代生物工艺中可用的低成本一次性技术的新的第一步。

We acknowledge Alexandre Super for technical assistance, the EPFL workshop for constructing the PCV analyzer and Delf Heger (Techno Plastics Products AG, Trasadingen, Switzerland) for discussions and for supplying the mini PCV tubes.

References

- Conlon I, Raff M. 2003. Differences in the way a mammalian cell and yeast cells coordinate cell growth and cell-cycle progression. *J Biol* 2(1):7.
- De Jesus M, Girard P, Bourgeois M, Baumgartner G, Jacko B, Amstutz H, Wurm FM. 2004. TubeSpin satellites: A fast track approach for process development with animal cells using shaking technology. *Biochem Eng J* 17(3):217–223.
- Ducommun P, Bolzonella I, Rhiel M, Pugeaud P, von Stockar U, Marison IW. 2001. On-line determination of animal cell concentration. *Biotechnol Bioeng* 72(5):515–522.
- Guilak F, Erickson GR, Ping Ting-Beall H. 2002. The effects of osmotic stress on the viscoelastic and physical properties of articular chondrocytes. *Biophys J* 82(2):720–727.
- Konstantinov KB. 1996. Monitoring and control of the physiological state of cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 52(2):271–289.
- Lubenova V, Rocha I, Ferreira EC. 2003. Estimation of multiple biomass growth rates and biomass concentration in a class of bioprocesses. *Bioprocess Biosyst Eng* 25(6):395–406.
- Muller N, Girard P, Hacker DL, Jordan M, Wurm FM. 2005. Orbital shake technology for the cultivation of mammalian cells in suspension. *Biotechnol Bioeng* 89(4):400–406.
- Schoenherr I, Stapp T, Ryll T. 2000. A comparison of different methods to determine the end of exponential growth in CHO cell cultures for optimization of scale-up. *Biotechnol Prog* 16(5):815–821.
- Yang XS, Kamino K. 1995. Photometric determination of phenomenological correlation between osmotic behavior and hemolysis of red blood cells.