



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111676184 B

(45) 授权公告日 2021.01.29

(21) 申请号 202010411552.7

(22) 申请日 2020.05.15

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111676184 A

(43) 申请公布日 2020.09.18

(73) 专利权人 上海多宁生物科技有限公司

地址 201601 上海市松江区新桥镇民强路
1525号30幢4层

(72) 发明人 王龙 纪明宇 王猛

(74) 专利代理机构 上海点威知识产权代理有限公司 31326

代理人 许晓琳

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/075 (2010.01)

(56) 对比文件

CN 109415688 A, 2019.03.01

CN 107460159 A, 2017.12.12

EP 1576182 B1, 2010.11.17

审查员 张进

权利要求书4页 说明书14页 附图2页

(54) 发明名称

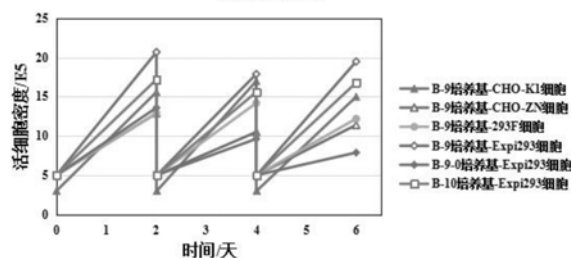
一种由补料培养基共混的基础培养基及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及无血清细胞培养基技术领域,具体公开了一种由补料培养基共混的基础培养基,包括补料培养基A、补料培养基B和添加剂,所述补料培养基B的体积用量是补料培养基A的5-15%;所述补料培养基A包含有总浓度为12900-124000mg/L的氨基酸,总浓度为1210-12560mg/mL的无机盐和微量元素,总浓度为780-10260mg/L的维生素,以及总浓度为1300-8020mg/mL的其它成分;所述补料培养基B包含有总浓度为18000-180000mg/L的L-色氨酸、L-酪氨酸、L-半胱氨酸;所述添加剂包括总浓度0.103-1.251g/L的丙酮酸钠、乙醇胺、谷胱甘肽、精胺、柠檬酸铁铵、亚硒酸钠。本发明基础培养基能够支撑工业界和实验室主流细胞株的生长代谢,具有广谱的适用性,原料价格低廉,工艺操作简单,适合大批量工业生产。

CN 111676184 B

活细胞密度/ES



1. 一种由补料培养基共混的基础培养基,其特征在于,由补料培养基A、补料培养基B和添加剂组成,所述补料培养基共混的基础培养基包括如下体积份数的组分:补料培养基A 100份、补料培养基B 5-15份、添加剂5-15份、余量为水,总量共计1000份;

所述补料培养基A的具体成分及其含量如下:

氨基酸部分。

氨基酸	含量范围 mg/L		氨基酸	含量范围 mg/L	
L-甲硫氨酸	2500	2700	L-丝氨酸	7000	8000
L-苯丙氨酸	5000	6000	L-苏氨酸	6000	7000
L-天冬酰胺	9000	10000	L-缬氨酸	4000	5000
羟基L-脯氨酸	500	700	L-异亮氨酸	4000	5000
L-组氨酸	4000	5000	L-谷氨酸	13000	14000
L-脯氨酸	6000	7000	L-精氨酸	4000	5000
L-赖氨酸	5000	6000	甘氨酸	300	500
L-亮氨酸	3000	4000	L-半胱氨酸	500	700
L-天冬氨酸	3000	4000	L-丙氨酸	500	700

无机盐和微量元素部分。

无机盐和微量元素	含量范围 mg/L		无机盐和微量元素	含量范围 mg/L	
氯化钾	3000	4000	硫酸镍	0.03	0.05
氯化钠	400	500	硅酸钠	25	30
氯化钙	200	300	氯化铝	0.3	0.5
磷酸氢二钠	2000	3000	偏钒酸钠	0.005	0.007
氯化亚锡	0.003	0.01	钼酸钠	0.02	0.04
硫酸锌	200	300	亚硒酸钠	0.01	0.03
硫酸镁	300	400	硫酸铜	0.4	0.6
柠檬酸铁	100	300	氯化锂	0.5	0.7
氯化锰	0.02	0.04			

维生素部分。

维生素	含量范围 mg/L		维生素	含量范围 mg/L	
DL- α -硫辛酸	200	300	烟酰胺	2.5	3.0
氰钴胺素	50	80	盐酸硫胺	300	350
D-生物素	3	4	氯化胆碱	2200	2500
叶酸	20	50	乙醇胺	400	500
维生素 C	800	900	l-肌醇	1500	2000
D-泛酸钙	100	150	对氨基苯甲酸	350	450
吡哆醇	130	170	腐胺	20	30
核黄素	30	40			

其它成分。

其它成份	含量范围 mg/L		其它成份	含量范围 mg/L	
亚油酸	10	20	P188	1500	2000
丙酮酸钠	600	1000			

所述补料培养基 B 中各组分具体含量如下：

氨基酸	含量范围 mg/L		氨基酸	含量范围 mg/L	
L-色氨酸	27000	30000	L-半胱氨酸	23000	26000
L-酪氨酸	45000	49000			

所述添加剂由以下用量的组分组成：丙酮酸钠 0.1-0.25 g/L、乙醇胺 0.016-0.050 g/L、谷胱甘肽 0.0005-0.002 g/L、精胺 0.015-0.05 g/L、柠檬酸铁铵 0.05-0.1 g/L、亚硒酸钠 0.0002-0.0005 g/L。

2. 根据权利要求 1 所述的由补料培养基共混的基础培养基，其特征在于，所述补料培养基 B 的具体成分及其含量如下：L-色氨酸 28000mg/L、L-酪氨酸 48300mg/L、L-半胱氨酸 24400mg/L，所述补料培养基 A 的具体成分及其含量如下：

氨基酸	含量 mg/L	氨基酸	含量 mg/L
L-甲硫氨酸	2538	L-丝氨酸	7930
L-苯丙氨酸	5630	L-苏氨酸	6730
L-天冬酰胺	9270	L-缬氨酸	4779
羟基 L-脯氨酸	540	L-异亮氨酸	4882
L-组氨酸	4500	L-谷氨酸	13089
L-脯氨酸	6378	L-精氨酸	4324
L-赖氨酸	5640	甘氨酸	349
L-亮氨酸	3304	L-半胱氨酸	540
L-天冬氨酸	3990	L-丙氨酸	540
无机盐和微量元素	含量 mg/L	无机盐和微量元素	含量 mg/L

氯化钾	3420	硫酸镍	0.04
氯化钠	500	硅酸钠	28
氯化钙	234	氯化铝	0.34
磷酸氢二钠	2330	偏钒酸钠	0.006
氯化亚锡	0.005	钼酸钠	0.03
硫酸锌	230	亚硒酸钠	0.02
硫酸镁	320	硫酸铜	0.5
柠檬酸铁	200	氯化锂	0.7
氯化锰	0.03		
维生素	含量 mg/L	维生素	含量 mg/L
DL- α -硫辛酸	230	烟酰胺	2.8
氰钴胺素	70	盐酸硫胺	320
D-生物素	3.2	氯化胆碱	2300
叶酸	30	乙醇胺	430
维生素C	880	l-肌醇	1800
D-泛酸钙	120	对氨基苯甲酸	394
吡哆醇	150	腐胺	25
核黄素	34		
其它成份	含量 mg/L	其它成份	含量 mg/L
亚油酸	14	P188	1800
丙酮酸钠	800		

3. 一种如权利要求1或2所述由补料培养基共混的基础培养基的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:按比例将补料培养基A、补料培养基B以及添加剂加入适量水中,搅拌混匀,然后依次加入缓冲剂、消泡剂和渗透压调节剂,混匀;用HCl调节pH值至7.0-7.4后加水定容,用滤膜过滤,即得所述基础培养基。

4. 一种如权利要求1或2所述由补料培养基共混的基础培养基在细胞培养中的应用。

一种由补料培养基共混的基础培养基及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及无血清细胞培养基技术领域,具体涉及一种由补料培养基共混的基础培养基及该基础培养基的制备方法,以及该基础培养基在细胞培养中的应用。

背景技术

[0002] 我国医药发展历史源远流长,先人们用中草药缓解病痛,积累了丰富的药理学知识;近代以来,随着对疾病机理的深入研究,小分子化药由于其针对性强,疗效好,作用快等优势,在医药市场占据主导地位;然而,在面对肿瘤,免疫系统疾病,以及病毒感染等挑战时,小分子化药还是显得力不从心。随着免疫学、分子生物学的发展,单克隆抗体药物的出现为解决这些疑难杂症提供了新的途径。

[0003] 单克隆抗体药物是基于抗原和抗体特异性结合的原理发展而来。单抗类药物能中和多种毒素,使其丧失生物学活性;激活巨噬细胞,吞食入侵的抗原;启动抗体和补体依赖细胞毒作用,杀死肿瘤细胞,病原体。可以说单抗药物的发展,给人类战胜疾病带来了新的曙光。

[0004] 动物细胞是生产单克隆抗体最主要的载体,但是动物细胞比较脆弱,对外界环境敏感,且营养需求高,因此开发适合其生长代谢的培养基和培养工艺十分重要。细胞培养基的组分丰富,且组分含量的不同会对细胞密度,抗体蛋白的表达量和质量造成影响。当前国内的细胞培养基被国外生物公司所垄断,使得抗体药物的研发和生产成本居高不下,故抗体药物细胞培养基的国产化具有很重要的现实意义。

[0005] 单抗药物生产所用的细胞培养基分为基础培养基和补料培养基。基础培养基的开发和优化通常会采用DOE实验、培养基成分消耗分析、代谢组学、高通量筛选系统等技术手段。这些方法耗时长,且工作量大。因此本领域迫切需要开发新的具有广谱适用性的基础培养基。

发明内容

[0006] 针对现有技术的不足,本发明提供了一种由补料培养基共混的基础培养基及该基础培养基的制备方法,以及该基础培养基在细胞培养中的应用,很好的支持当前工业界和实验室常用细胞株的生长代谢,具有广谱的应用价值。

[0007] 本发明是通过如下的技术方案实现的:

[0008] 一种由补料培养基共混的基础培养基,包括补料培养基A、补料培养基B和添加剂,所述补料培养基B的体积用量是补料培养基A的5-15%;所述补料培养基A包含有总浓度为12900-124000mg/L的氨基酸,总浓度为1210-12560mg/mL的无机盐和微量元素,总浓度为780-10260mg/L的维生素,以及总浓度为1300-8020mg/mL的其它成分;所述补料培养基B包含有总浓度为18000-180000mg/L的氨基酸,所述补料培养基B中的氨基酸由L-色氨酸、L-酪氨酸、L-半胱氨酸组成;所述添加剂包括总浓度0.103-1.251g/L的以下组分:丙酮酸钠、乙醇胺、谷胱甘肽、精胺、柠檬酸铁铵、亚硒酸钠。

[0009] 优选的,所述添加剂由以下用量的组分组成:丙酮酸钠0.1-1.0g/L、乙醇胺0.001-0.050g/L、谷胱甘肽0.0005-0.05g/L、精胺0.001-0.05g/L、柠檬酸铁铵0.001-0.1g/L、亚硒酸钠0.000001-0.0005g/L。

[0010] 作为优选的技术方案,所述补料培养基共混的基础培养基包括如下体积份数的组分:

补料培养基 A 100 份、

补料培养基 B 5-15 份、

[0011]

添加剂 5-15 份、

余量为水,总量共计 1000 份。

[0012] 进一步的,上述由补料培养基共混的基础培养基,还包括缓冲剂、渗透压调节剂和消泡剂。

[0013] 所述缓冲剂、渗透压调节剂和消泡剂均为本领域的常用材料,例如缓冲剂可以选用HEPES和NaHCO₃、渗透压调节剂可以选用NaCl,消泡剂可以选用P188(泊洛沙姆188)。上述助剂的用量可以根据实际应用需要进行调节。

[0014] 进一步优选的,所述补料培养基B中各组分具体含量如下:

氨基酸	含量范围 mg/L		氨基酸	含量范围 mg/L	
L-色氨酸	5000	50000	L-半胱氨酸	5000	50000
L-酪氨酸	8000	80000			

[0016] 所述补料培养基B中各组分更优选的含量如下:

氨基酸	含量范围 mg/L		氨基酸	含量范围 mg/L	
L-色氨酸	20000	30000	L-半胱氨酸	20000	30000
L-酪氨酸	30000	50000			

[0018] 所述补料培养基B中各组分含量最好如下:

氨基酸	含量范围 mg/L		氨基酸	含量范围 mg/L	
L-色氨酸	27000	30000	L-半胱氨酸	23000	26000
L-酪氨酸	45000	49000			

[0020] 作为优选的技术方案,所述补料培养基A的具体成分及其含量如下:

[0021] 氨基酸部分

[0022]	氨基酸	含量范围 mg/L		氨基酸	含量范围 mg/L	
	L-甲硫氨酸	300	3000	L-丝氨酸	1000	10000
L-苯丙氨酸	800	8000	L-苏氨酸	1000	10000	
L-天冬酰胺	1000	10000	L-缬氨酸	800	8000	
羟基L-脯氨酸	150	1500	L-异亮氨酸	500	5000	

[0023]	L-组氨酸	500	5000	L-谷氨酸	1500	15000
	L-脯氨酸	500	7000	L-精氨酸	800	8000
	L-赖氨酸	1000	10000	甘氨酸	100	1000
	L-亮氨酸	1000	10000	L-半胱氨酸	150	1500
	L-天冬氨酸	800	8000	L-丙氨酸	1000	5000

[0024] 无机盐和微量元素部分

[0025]	无机盐和微量元素	含量范围 mg/L		无机盐和微量元素	含量范围 mg/L	
	氯化钾	500	5000	硫酸镍	0.005	0.05
氯化钠	50	500	硅酸钠	5	50	
氯化钙	50	500	氯化铝	0.1	1	
磷酸氢二钠	500	5000	偏钒酸钠	0.001	0.01	
氯化亚锡	0.001	0.01	钼酸钠	0.005	0.05	
硫酸锌	5	500	亚硒酸钠	0.005	0.05	
硫酸镁	50	500	硫酸铜	0.01	5	
柠檬酸铁	50	500	氯化锂	0.1	1	
氯化锰	0.005	0.05				

[0026] 维生素部分

[0027]	维生素	含量范围 mg/L		维生素	含量范围 mg/L	
	DL- α -硫辛酸	5	500	烟酰胺 (B3)	0.45	4.5
氰钴胺素	5	100	硫胺, HCl	20	500	
D-生物素	0.5	5	氯化胆碱	300	3000	
叶酸 (M)	5	100	乙醇胺	5	500	
维生素 C	50	1000	l-肌醇	300	3000	

[0028]	D-泛酸钙	25	250	对氨基苯甲酸	50	1000
	吡哆醇 (B6)	5	200	腐胺	5	50
	核黄素	5	50			

[0029] 其它成份

[0030]	其它成份	含量范围 mg/L		其它成份	含量范围 mg/L	
	亚油酸	0.5	20	P188	1000	5000
丙酮酸钠	300	3000				

[0031] 进一步优选的,所述补料培养基A的具体成分及其含量如下:

[0032] 氨基酸部分

[0033]	氨基酸	含量范围 mg/L		氨基酸	含量范围 mg/L	
	L-甲硫氨酸	2500	2700	L-丝氨酸	7000	8000
L-苯丙氨酸	5000	6000	L-苏氨酸	6000	7000	
L-天冬酰胺	9000	10000	L-缬氨酸	4000	5000	
羟基L-脯氨酸	500	700	L-异亮氨酸	4000	5000	
L-组氨酸	4000	5000	L-谷氨酸	13000	14000	
L-脯氨酸	6000	7000	L-精氨酸	4000	5000	
L-赖氨酸	5000	6000	甘氨酸	300	500	
L-亮氨酸	3000	4000	L-半胱氨酸	500	700	
L-天冬氨酸	3000	4000	L-丙氨酸	500	700	

[0034] 无机盐和微量元素部分

无机盐和微量元素		含量范围 mg/L		无机盐和微量元素		含量范围 mg/L	
[0035]	氯化钾	3000	4000	硫酸镍	0.03	0.05	
	氯化钠	400	500	硅酸钠	25	30	
	氯化钙	200	300	氯化铝	0.3	0.5	
	磷酸氢二钠	2000	3000	偏钒酸钠	0.005	0.007	
	氯化亚锡	0.003	0.01	钼酸钠	0.02	0.04	
[0036]	硫酸锌	200	300	亚硒酸钠	0.01	0.03	
	硫酸镁	300	400	硫酸铜	0.4	0.6	
	柠檬酸铁	100	300	氯化锂	0.5	0.7	
	氯化锰	0.02	0.04				

[0037] 维生素部分

维生素		含量范围 mg/L		维生素		含量范围 mg/L	
[0038]	DL- α -硫辛酸	200	300	烟酰胺 (B3)	2.5	3.0	
	氰钴胺素	50	80	硫胺, HCl	300	350	
	D-生物素	3	4	氯化胆碱	2200	2500	
	叶酸 (M)	20	50	乙醇胺	400	500	
	维生素 C	800	900	l-肌醇	1500	2000	
	D-泛酸钙	100	150	对氨基苯甲酸	350	450	
	吡哆醇 (B6)	130	170	腐胺	20	30	
	核黄素	30	40				

[0039] 其它成分

其它成份		含量范围 mg/L		其它成份		含量范围 mg/L	
[0040]	亚油酸	10	20	P188	1500	2000	
	丙酮酸钠	600	1000				

[0041] 本发明还进一步公开了上述由补料培养基共混的基础培养基的制备方法,包括如下步骤:按比例将补料培养基A、补料培养基B以及添加剂加入适量水中,搅拌混匀,然后依次加入缓冲剂、消泡剂和渗透压调节剂,混匀;用HCl调节pH值至7.0-7.4后加水定容,用滤膜过滤,即得所述基础培养基。

[0042] 所述滤膜优选0.22 μ m滤膜。

[0043] 其中所述补料培养基A的制备方法包括如下步骤:

[0044] 1) 按配制体积定量称取补料培养基A中各成分,混匀;

[0045] 2) 将步骤1的补料培养基混合物溶解于超纯水中,水温控制在20-30 $^{\circ}$ C,并加入氢氧化钠调pH促进溶解;

[0046] 3) 每升培养基中加入75g葡萄糖,搅拌均匀;

[0047] 4) 调整pH在6.7-6.9之间,并用超纯水定容;

[0048] 5) 采用0.22 μ m滤膜过滤,2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0049] 所述补料培养基B的制备方法包括如下步骤:

[0050] 1) 按配制体积定量称取补料培养基B中各成分,混匀;

[0051] 2) 加入配制体积70%的水,水温控制在20-30 $^{\circ}$ C;

[0052] 3) 加入配制体积20%的6N氢氧化钠溶液;

[0053] 4) 调节pH在10.80-11.80之间,并用超纯水定容;

[0054] 5) 采用0.22 μ m滤膜过滤,2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0055] 本发明还进一步提供所述由补料培养基共混的基础培养基在细胞培养中的应用,可广泛应用于诸如CHO细胞株、293F细胞株、Expi293细胞株等细胞株的培养。

[0056] 与现有技术相比,本发明提供的由补料培养基共混的基础培养基具有如下有益效果:

[0057] 1、本发明基础培养基能够支撑工业界和实验室主流细胞株的生长代谢,具有广谱的适用性。

[0058] 2、基础培养基中的组分明确且不含有动植物来源成分,能确保批次间的一致性。

[0059] 3、本发明的设计思路新颖,由补料培养基开发基础培养基的成功,能给其他科研工作者提供借鉴。

[0060] 4、本发明基础培养基的原料价格低廉,工艺操作简单,适合大批量工业生产。

附图说明

[0061] 图1为各实施例和对比例基础培养基培养细胞的活细胞密度随时间变化图;

[0062] 图2为各实施例和对比例基础培养基培养细胞的细胞活率随时间变化图;

[0063] 图3为各实施例和对比例基础培养基培养细胞的细胞直径随时间变化图。

具体实施方式

[0064] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。本发明配方中各组分如无特别说明,均为常规市售产

品。

[0065] 实施例中,补料培养基A的成分及配方:

[0066]

氨基酸	含量 mg/L	氨基酸	含量 mg/L
L-甲硫氨酸	2538	L-丝氨酸	7930
L-苯丙氨酸	5630	L-苏氨酸	6730
L-天冬酰胺	9270	L-缬氨酸	4779
羟基 L-脯氨酸	540	L-异亮氨酸	4882
L-组氨酸	4500	L-谷氨酸	13089
L-脯氨酸	6378	L-精氨酸	4324
L-赖氨酸	5640	甘氨酸	349

	L-亮氨酸	3304	L-半胱氨酸	540
	L-天冬氨酸	3990	L-丙氨酸	540
	无机盐和微量元素	含量 mg/L	无机盐和微量元素	含量 mg/L
	氯化钾	3420	硫酸镍	0.04
	氯化钠	500	硅酸钠	28
	氯化钙	234	氯化铝	0.34
	磷酸氢二钠	2330	偏钒酸钠	0.006
	氯化亚锡	0.005	钼酸钠	0.03
	硫酸锌	230	亚硒酸钠	0.02
	硫酸镁	320	硫酸铜	0.5
	柠檬酸铁	200	氯化锂	0.7
[0067]	氯化锰	0.03		
	维生素	含量 mg/L	维生素	含量 mg/L
	DL- α -硫辛酸	230	烟酰胺 (B3)	2.8
	氰钴胺素	70	硫胺, HCl	320
	D-生物素	3.2	氯化胆碱	2300
	叶酸 (M)	30	乙醇胺	430
	维生素 C	880	l-肌醇	1800
	D-泛酸钙	120	对氨基苯甲酸	394
	吡哆醇 (B6)	150	腐胺	25
	核黄素	34		
	其它成份	含量 mg/L	其它成份	含量 mg/L
	亚油酸	14	P188	1800
[0068]	丙酮酸钠	800		

[0069] 配制补料培养基A的方法如下：

[0070] (1) 按配制体积定量称取补料培养基中各成分，混匀；

[0071] (2) 将步骤(1)的补料培养基混合物溶解于超纯水中，水温控制在20-30℃，并加入氢氧化钠调pH促进溶解；

[0072] (3) 每升培养基中加入75g葡萄糖，搅拌均匀；

[0073] (4) 调整pH在6.7-6.9之间，并用超纯水定容；

[0074] (5) 采用0.22μm滤膜过滤，2-8℃保存。

[0075] 补料培养基B的成分及配方：

氨基酸	含量mg/L	氨基酸	含量mg/L
L-色氨酸	28000	L-半胱氨酸	24400
L-酪氨酸	48300		

[0077] 配制补料培养基B的方法如下：

[0078] (1) 按配制体积定量称取补料培养基中各成分，混匀；

[0079] (2) 加入配制体积70%的水，水温控制在20-30℃；

[0080] (3) 加入配制体积20%的6N氢氧化钠溶液；

[0081] (4) 调节pH在10.80-11.80之间，并用超纯水定容；

[0082] (5) 采用0.22μm滤膜过滤，2-8℃保存。

[0083] 添加剂(B-9添加剂)由以下用量的组分经简单混合定容而成：丙酮酸钠(0.25g/L)、乙醇胺(0.016g/L)、谷胱甘肽(0.002g/L)、精胺(0.015g/L)、柠檬酸铁铵(0.05g/L)、亚硒酸钠(0.0002g/L)。

[0084] 实施例1

[0085] 1、B-9基础培养基配制步骤：

[0086] (1) 取800mL超纯水，加入100mL补料培养基A，10mL补料培养基B，以及10mL B-9添加剂将搅拌器的转速调节至800r/min，磁力搅拌10min；

[0087] (2) 向步骤(1)中加入1.8g HEPES，搅拌10min，使其完全溶解；

[0088] (3) 向步骤(2)中加入1.8g P188，搅拌10min；

[0089] (4) 向步骤(3)中加入NaHCO₃的2.1g，搅拌10min；

[0090] (5) 向步骤(4)中加入NaCl的2g，搅拌10min；

[0091] (6) 利用6N的HCl调节步骤(5)中溶液的pH值，使其在7.0-7.4范围内；

[0092] (7) 加水定容至1L；

[0093] (8) 测量步骤(7)得到的溶液的渗透压，其值应该在280-320mOsm/kg；

[0094] (9) 采用0.22μm滤膜过滤，即得B-9基础培养基。

[0095] 2、细胞培养

[0096] 从细胞库中复苏CHO-K1工程细胞株，传代3次后，取样计数，离心去除初始培养基，随后用30mL的B-9基础培养基重悬细胞，调整细胞密度为 3×10^5 cell/mL，接种到125mL摇瓶中进行传代培养。摇床的温度设置为37℃，转速110r/min，CO₂浓度控制在8%。每两天取样，用countstar自动细胞计数仪(产品型号：IC 1000；生产厂家：上海睿钰生物科技有限公司)检测活细胞密度、细胞活率和细胞直径，同样的密度再次传代。传代3次后结束培养。

[0097] 活细胞密度、细胞活率和细胞直径分别如表1和图1、2、3所示。三次传代结果显示，

使用B-9基础培养基后,CHO-K1工程细胞株传代2天后活细胞密度维持在 1.59×10^6 cell/mL左右,细胞活率在97.4%左右,细胞直径在14.7 μ m左右。

[0098] 实施例2

[0099] 1、B-9基础培养基配制步骤:

[0100] (1) 取800mL超纯水,加入100mL补料培养基A,10mL补料培养基B,以及10mL B-9添加剂将搅拌器的转速调节至800r/min,磁力搅拌10min;

[0101] (2) 向步骤(1)中加入1.8g HEPES,搅拌10min,使其完全溶解;

[0102] (3) 向步骤(2)中加入1.8g P188,搅拌10min;

[0103] (4) 向步骤(3)中加入NaHCO₃的2.1g,搅拌10min;

[0104] (5) 向步骤(4)中加入NaCl的2g,搅拌10min;

[0105] (6) 利用6N的HCl调节步骤(5)中溶液的pH值,使其在7.0-7.4范围内;

[0106] (7) 加水定容至1L;

[0107] (8) 测量步骤(7)得到的溶液的渗透压,其值应该在280-320mOsm/kg;

[0108] (9) 采用0.22 μ m滤膜过滤,即得B-9基础培养基。

[0109] 2、细胞培养

[0110] 从细胞库中复苏CHO-ZN工程细胞株,传代3次后,取样计数,离心去除初始培养基,随后用30mL的B-9基础培养基重悬细胞,调整细胞密度为 5×10^5 cell/mL,接种到125mL摇瓶中进行传代培养。摇床的温度设置为37 $^{\circ}$ C,转速110r/min,CO₂浓度控制在8%。每两天取样,用countstar自动细胞计数仪(产品型号:IC 1000;生产厂家:上海睿钰生物科技有限公司)检测活细胞密度、细胞活率和细胞直径,同样的密度再次传代。传代3次后结束培养。

[0111] 活细胞密度、细胞活率和细胞直径分别如表1和图1、2、3所示。三次传代结果显示,使用B-9基础培养基后,CHO-ZN工程细胞株传代2天后活细胞密度维持在 1.16×10^6 cell/mL左右,细胞活率在97.0%左右,细胞直径在14.5 μ m左右。

[0112] 实施例3

[0113] 1、B-9基础培养基配制步骤:

[0114] (1) 取800mL超纯水,加入100mL补料培养基A,10mL补料培养基B,以及10mL B-9添加剂将搅拌器的转速调节至800r/min,磁力搅拌10min;

[0115] (2) 向步骤(1)中加入1.8g HEPES,搅拌10min,使其完全溶解;

[0116] (3) 向步骤(2)中加入1.8g P188,搅拌10min;

[0117] (4) 向步骤(3)中加入NaHCO₃的2.1g,搅拌10min;

[0118] (5) 向步骤(4)中加入NaCl的2g,搅拌10min;

[0119] (6) 利用6N的HCl调节步骤(5)中溶液的pH值,使其在7.0-7.4范围内;

[0120] (7) 加水定容至1L;

[0121] (8) 测量步骤(7)得到的溶液的渗透压,其值应该在280-320mOsm/kg;

[0122] (9) 采用0.22 μ m滤膜过滤,即得B-9基础培养基。

[0123] 2、细胞培养

[0124] 从细胞库中复苏293F细胞株,传代3次后,取样计数,离心去除初始培养基,随后用30mL的B-9基础培养基重悬细胞,调整细胞密度为 5×10^5 cell/mL,接种到125mL摇瓶中进行传代培养。摇床的温度设置为37 $^{\circ}$ C,转速110r/min,CO₂浓度控制在8%。每两天取样,用

countstar自动细胞计数仪(产品型号:IC 1000;生产厂家:上海睿钰生物科技有限公司)检测活细胞密度、细胞活率和细胞直径,同样的密度再次传代。传代3次后结束培养。

[0125] 活细胞密度、细胞活率和细胞直径分别如表1和图1、2、3所示。三次传代结果显示,使用B-9基础培养基后,293F细胞株传代2天后活细胞密度维持在 1.31×10^6 cell/mL左右,细胞活率在95.8%左右,细胞直径在18.6 μ m左右。

[0126] 实施例4

[0127] 1、B-9基础培养基配制步骤:

[0128] (1)取800mL超纯水,加入100mL补料培养基A,10mL补料培养基B,以及10mL B-9添加剂将搅拌器的转速调节至800r/min,磁力搅拌10min;

[0129] (2)向步骤(1)中加入1.8g HEPES,搅拌10min,使其完全溶解;

[0130] (3)向步骤(2)中加入1.8g P188,搅拌10min;

[0131] (4)向步骤(3)中加入NaHCO₃的2.1g,搅拌10min;

[0132] (5)向步骤(4)中加入NaCl的2g,搅拌10min;

[0133] (6)利用6N的HCl调节步骤(5)中溶液的pH值,使其在7.0-7.4范围内;

[0134] (7)加水定容至1L;

[0135] (8)测量步骤(7)得到的溶液的渗透压,其值应该在280-320mOsm/kg;

[0136] (9)采用0.22 μ m滤膜过滤,即得B-9基础培养基。

[0137] 2、细胞培养

[0138] 从细胞库中复苏Expi293细胞株,传代3次后,取样计数,离心去除初始培养基,随后用30mL的B-9基础培养基重悬细胞,调整细胞密度为 5×10^5 cell/mL,接种到125mL摇瓶中进行传代培养。摇床的温度设置为37 $^{\circ}$ C,转速110r/min,CO₂浓度控制在8%。每两天取样,用countstar自动细胞计数仪(产品型号:IC 1000;生产厂家:上海睿钰生物科技有限公司)检测活细胞密度、细胞活率和细胞直径,同样的密度再次传代。传代3次后结束培养。

[0139] 活细胞密度、细胞活率和细胞直径分别如表1和图1、2、3所示。三次传代结果显示,使用B-9基础培养基后,Expi293细胞株传代2天后活细胞密度维持在 1.94×10^6 cell/mL左右,细胞活率在98.3%左右,细胞直径在19.2 μ m左右。

[0140] 对比例1

[0141] 1、B-9-0基础培养基(未加入B-9添加剂)配制步骤:

[0142] (1)取800mL超纯水,加入100mL补料培养基A,10mL补料培养基B,以及10mL B-9添加剂将搅拌器的转速调节至800r/min,磁力搅拌10min;

[0143] (2)向步骤(1)中加入1.8g HEPES,搅拌10min,使其完全溶解;

[0144] (3)向步骤(2)中加入1.8g P188,搅拌10min;

[0145] (4)向步骤(3)中加入NaHCO₃的2.1g,搅拌10min;

[0146] (5)向步骤(4)中加入NaCl的2g,搅拌10min;

[0147] (6)利用6N的HCl调节步骤(5)中溶液的pH值,使其在7.0-7.4范围内;

[0148] (7)加水定容至1L;

[0149] (8)测量步骤(7)得到的溶液的渗透压,其值应该在280-320mOsm/kg;

[0150] (9)采用0.22 μ m滤膜过滤,即得B-9基础培养基。

[0151] 2、细胞培养

[0152] 从细胞库中复苏Expi293细胞株,传代3次后,取样计数,离心去除初始培养基,随后用30mL的B-9-0基础培养基重悬细胞,调整细胞密度为 5×10^5 cell/mL,接种到125mL摇瓶中进行传代培养。摇床的温度设置为37℃,转速110r/min,CO₂浓度控制在8%。每两天取样,用countstar自动细胞计数仪(产品型号:IC 1000;生产厂家:上海睿钰生物科技有限公司)检测活细胞密度、细胞活率和细胞直径,同样的密度再次传代。传代3次后结束培养。

[0153] 活细胞密度、细胞活率和细胞直径分别如表1和图1、2、3所示。三次传代结果显示,使用B-9-0基础培养基后,Expi293细胞株随着传代次数增加,活细胞密度逐渐下降,细胞活率也不断降低。

[0154] 对比例2

[0155] 1、B-10基础培养基(采用Hyclone公司的CB7a、CB7b补料培养基替代本发明补料培养基A和补料培养基B,未加入B-9添加剂) 配制步骤:

[0156] (1) 取800mL超纯水,加入100mL CB7a (Hyclone), 10mL CB7b (Hyclone), 将搅拌器的转速调节至800r/min,磁力搅拌10min;

[0157] (2) 向步骤(1)中加入1.8g HEPES,搅拌10min,使其完全溶解;

[0158] (3) 向步骤(2)中加入1.8g P188,搅拌10min;

[0159] (4) 向步骤(3)中加入NaHCO₃的2.1g,搅拌10min;

[0160] (5) 向步骤(4)中加入NaCl的2g,搅拌10min;

[0161] (6) 利用6N的HCl调节步骤(5)中溶液的pH值,使其在7.0-7.4范围内;

[0162] (7) 加水定容至1L;

[0163] (8) 测量步骤(7)得到的溶液的渗透压,其值应该在280-320mOsm/kg;

[0164] (9) 采用0.22μm滤膜过滤,即得B-10基础培养基。

[0165] 2、细胞培养

[0166] 从细胞库中复苏Expi293细胞株,传代3次后,取样计数,离心去除初始培养基,随后用30mL的B-10基础培养基重悬细胞,调整细胞密度为 5×10^5 cell/mL,接种到125mL摇瓶中进行传代培养。摇床的温度设置为37℃,转速110r/min,CO₂浓度控制在8%。每两天取样,用countstar自动细胞计数仪(产品型号:IC 1000;生产厂家:上海睿钰生物科技有限公司)检测活细胞密度、细胞活率和细胞直径,同样的密度再次传代。传代3次后结束培养。

[0167] 活细胞密度、细胞活率和细胞直径分别如图1、2、3所示。三次传代结果显示,使用B-10基础培养基后,Expi293细胞株传代2天后活细胞密度维持在 1.65×10^6 cell/mL左右,细胞活率在98.6%左右,细胞直径在19.1μm左右。

[0168] 各实施例和对比例的细胞培养结果如下表:

[0169] 表1培养细胞的活细胞密度、细胞活率、细胞直径随时间变化数据

细胞株	基础培养基	传代次数	时间/d	活细胞密度/E5	细胞活率/%	细胞直径/μm
[0170] CHO-K1	B-9	1	0	3	94.19	14.66
			2	15.6	97.34	14.47
		2	2.01	3	/	/

[0171]

			4	17	99.39	14.7
		3	4.01	3	/	/
			6	15	98.63	14.88
CHO-ZN	B-9	3	0	5	97.52	14.25
			2	12.9	96.3	14.87
		4	2.01	5	/	/
			4	10.5	94.82	14.54
		5	4.01	5	/	/
			6	11.4	99.32	14.21
293F	B-9	1	0	5	96.67	18.63
			2	12.9	94.67	18.74
		2	2.01	5	/	/
			4	14.2	96.14	18.66
		3	4.01	5	/	/
			6	12.2	95.82	18.53
Expi29 3	B-9	1	0	5	98.1	19.2
			2	20.7	98.27	19.11
		2	2.01	5	/	/
			4	17.9	98.57	19.21
		3	4.01	5	/	/
			6	19.5	98.17	19.1
Expi29 3	B-9-0	1	0	5	98.32	19.33
			2	13.6	94.39	19.42

[0172]		2	2.01	5	/	/	
			4	9.63	92.06	18.81	
		3	4.01	5	/	/	
			6	7.87	80.37	18.87	
		Expi29 3	1	0	5	97.37	19.11
				2	17.2	99.2	19.03
	2		2.01	5	/	/	
			4	15.6	98.85	19.21	
	3		4.01	5	/	/	
			6	16.8	99.08	18.88	

[0173] 本发明以补料培养基为主体,通过添加缓冲剂HEPES和NaHCO₃,消泡剂P188对配方进行优化,制得基础培养基。实验结果显示,本发明基础培养基能很好的支持当前工业界和实验室常用细胞株的生长代谢,具有广谱的应用价值。未加入添加剂的基础培养基,其活细胞密度随着传代次数增加而逐渐下降,细胞活率也不断降低,表明本发明添加剂具有显著的协同增效作用。

[0174] 需要说明的是,在本文中,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、组分或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、组分或者设备所固有的要素。

[0175] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

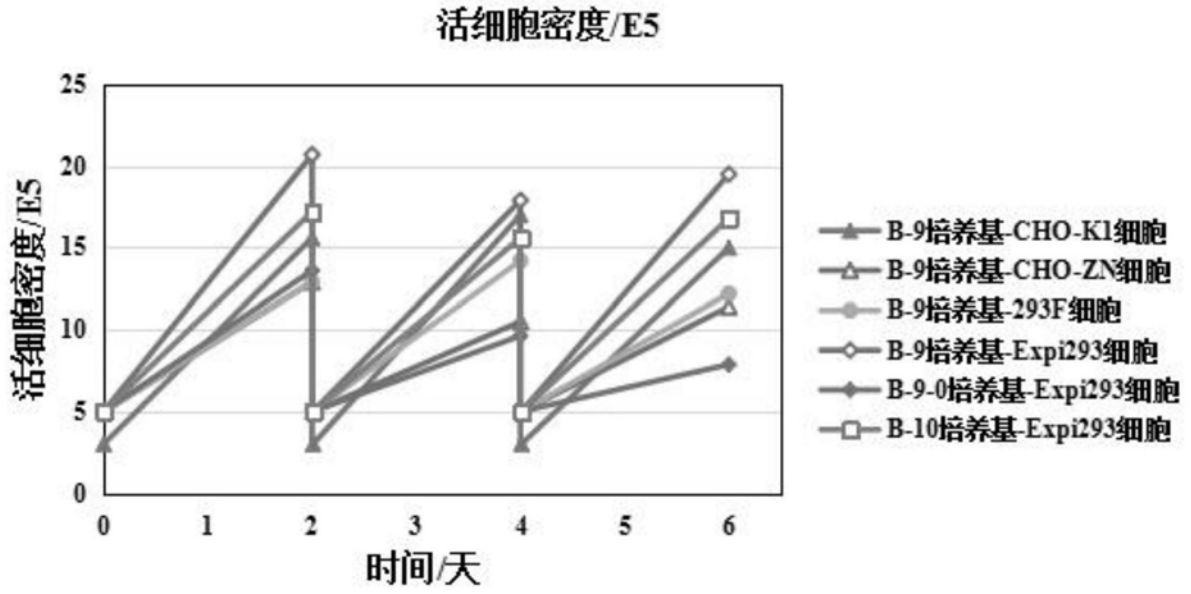


图1

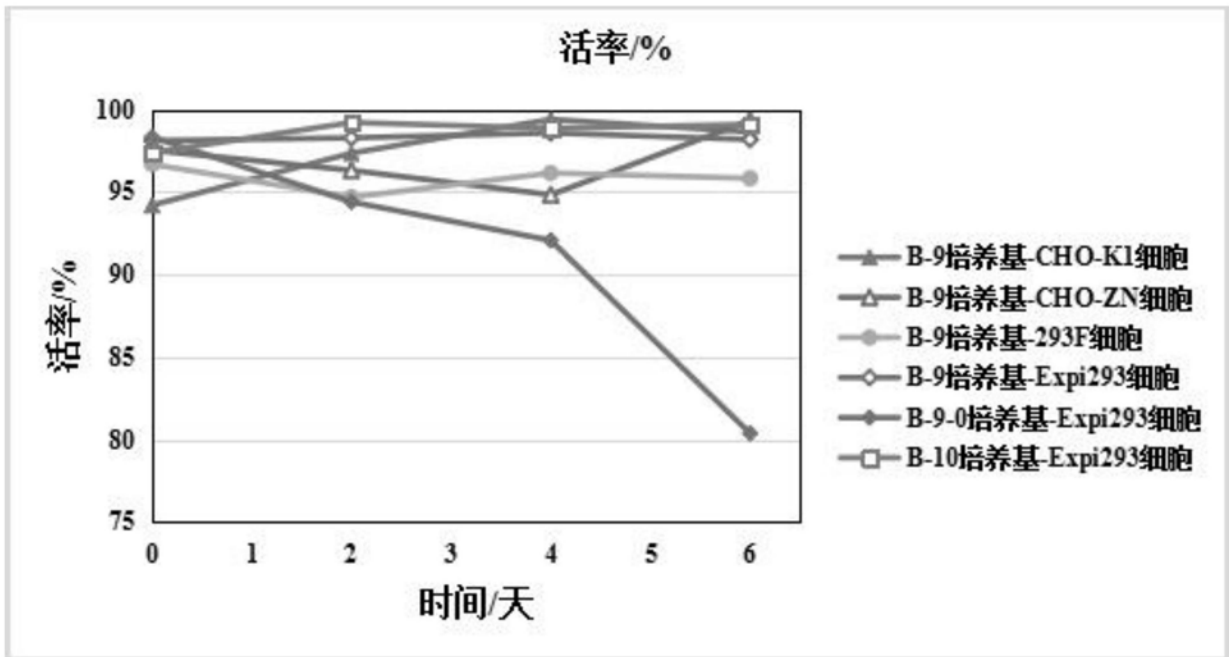


图2

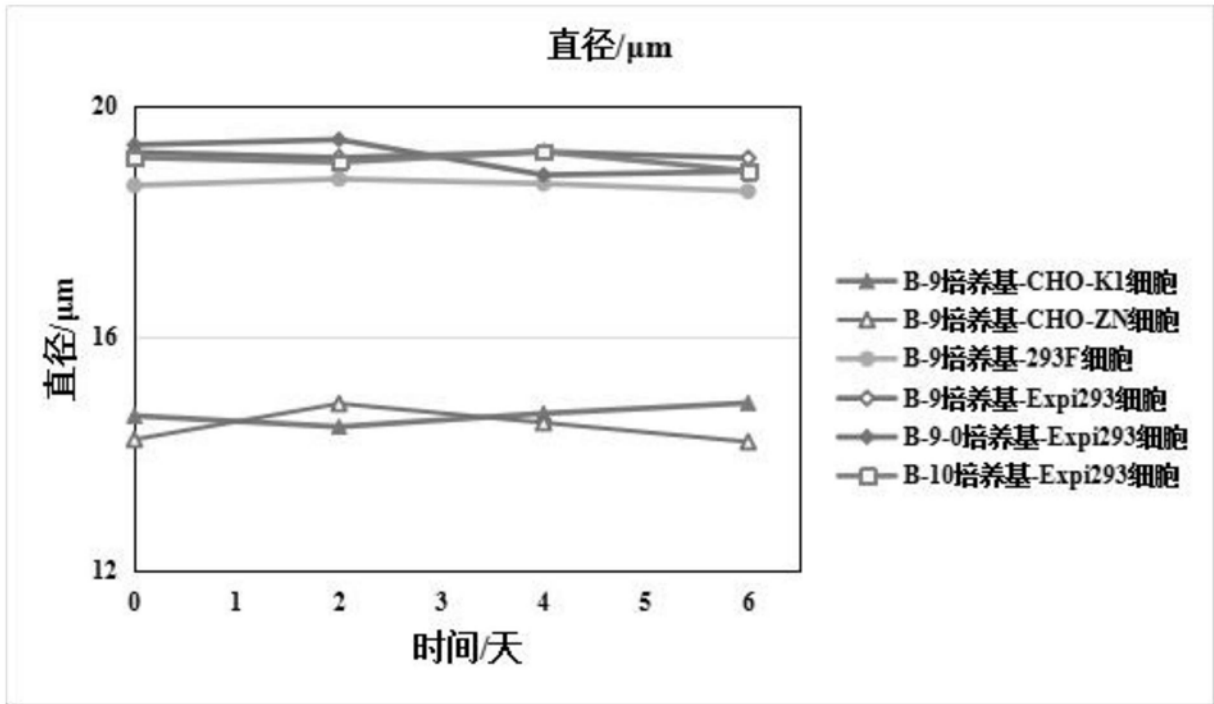


图3