



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102776148 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201210309760. 1

(22) 申请日 2012. 08. 28

(71) 申请人 中国林业科学研究院资源昆虫研究所

地址 650000 云南省昆明市盘龙区白龙寺

(72) 发明人 张欣 冯颖 丁伟峰 李娴 马涛
孙龙 何钊

(74) 专利代理机构 昆明正原专利商标代理有限公司 53100

代理人 徐玲菊

(51) Int. Cl.

C12N 5/07(2010. 01)

C12R 1/91(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 17 页

(54) 发明名称

一种昆虫细胞生长用培养基

(57) 摘要

本发明提供一种昆虫细胞生长用培养基,其特征在于每 1000 毫升培养基中含有下列组分: Grace 培养基 40 ~ 50g,海藻糖 0.5 ~ 3g,酵母抽提物 0.5 ~ 3g,胎牛血清,100 ~ 200ml,余量为水。采用上述方案获得的培养基,不仅配方科学合理,原料易得,制备方法简单,而且经过对 14 种昆虫细胞的培养,结果显示,来源于鳞翅目、鞘翅目、直翅目、膜翅目、双翅目、同翅目等的多种昆虫细胞均适宜用本发明的培养基培养,大部分细胞能在本发明培养基中得以生长,且成功建立了多个有限细胞系和无限细胞系。

1. 一种昆虫细胞生长用培养基,其特征在于每 1000 毫升培养基中含有下列组分:

Grace 培养基	40 ~ 50g
海藻糖	0.5 ~ 3g
酵母抽提物	0.5 ~ 3g
胎牛血清	100 ~ 200ml
水	余量。

一种昆虫细胞生长用培养基

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及一种培养基,尤其是一种适宜多种昆虫细胞生长的培养基,属于细胞培养基技术领域。

背景技术

[0003] 昆虫细胞培养作为一项极具产业化发展潜力的技术,正在日益受到人们的关注。昆虫细胞培养基是培养昆虫细胞的关键物质,昆虫细胞的生长、增值、分化等过程都需要培养基,适宜的培养基对昆虫细胞的生长和增殖会起到极其重要的作用,可以获得较好的培养效果,使原代培养能维持高密度、贴壁的单层细胞。昆虫细胞生长过程中需要补充多方面的营养物质,如多种氨基酸、维生素、辅酶、核酸、嘌呤、嘧啶、激素和生长因子。大部分昆虫细胞都是利用葡萄糖、果糖或麦芽糖作为主要碳源和能源,不同种类的昆虫细胞对氨基酸有不同的要求,至少有 14 种必需的氨基酸是细胞本身不能合成而必须由培养基提供的。昆虫细胞培养基经历了天然培养基、合成培养基和无血清培养基三个发展阶段。天然培养基取自动物体液,或者是从动物组织中提取的成分;合成培养基的各种成分都为公知成分;无血清培养基是在已知细胞所需营养物质和贴壁因子中加入适宜的细胞生长因子而得到的,可保证细胞生长良好,且无须补加血清。到目前为止,至少已报道了 60 多种昆虫细胞培养基。不同细胞系选择的培养基以及培养条件有所不同。常用的有 Grace、TC-199、TC-100、IPL-41、MGM-443、MGM-448、MGM-450、MM 和 M3 等。虽然目前已有多种商品化培养基面世,但不同的昆虫细胞在不同培养基中的生长差异性较大,而能适应多种昆虫细胞生长的培养基至今还比较罕见,特别在新昆虫细胞系的建立方面,寻找适宜的培养基则是较大的难点。因此,有必要研发能够适于不同目昆虫细胞生长的培养基。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种昆虫细胞生长用培养基,以适于不同目的多种昆虫细胞的生长,从而为新昆虫细胞系的建立提供技术支持。

[0005] 本发明通过下列技术方案完成:一种昆虫细胞生长用培养基,其特征在于每 1000 毫升培养基中含有下列组分:

Grace 培养基	40 ~ 50g
海藻糖	0.5 ~ 3g
酵母抽提物	0.5 ~ 3g
胎牛血清	100 ~ 200ml
水	余量。

[0006] 所述 Grace 培养基为市购产品。

[0007] 所述海藻糖为市购的海藻糖 Glucose 产品。

[0008] 所述酵母抽提物为市购的酵母抽提物 TC-Yeastolate 产品。

[0009] 所述胎牛血清为市购的灭活胎牛血清。

[0010] 所述水为纯净水。

[0011] 本发明提供的昆虫细胞生长用培养基经过下列方法制备：将市售 Grace 培养基干粉 40 ~ 50 克溶解在纯净水中；依次加入 0.5 ~ 3g 市售的海藻糖 Glucose 及 0.5 ~ 3g 市售的酵母抽提物 TC-Yeastolate；用 1N 的 NaOH 或 1N 的 HCl 调节 pH 值至 6.1-6.3，加入 100-200ml 市售的胎牛血清，加入纯净水补足 1000ml，按常规过滤、灭菌，得适于不同目的多种昆虫细胞生长的培养基。

[0012] 本发明具有下列优点和效果：采用上述方案获得的培养基，不仅配方科学合理，原料易得，制备方法简单，而且经过对 14 种昆虫细胞的培养，结果显示，来源于鳞翅目、鞘翅目、直翅目、膜翅目、双翅目、同翅目等的多种昆虫细胞均适宜用本发明的培养基培养，大部分细胞能在本发明培养基中得以生长，且成功建立了多个有限细胞系和无限细胞系。

具体实施方式

[0013] 下面通过实施例对本发明做进一步描述。

[0014] 实施例 1

按 1000 毫升培养基的量进行下列备料：

纯净水	800 ml
市购 Grace 培养基	40g
市购海藻糖	3.0g
市购酵母抽提物	0.5g
市购胎牛血清	200ml；

经过下列方法：

将市购的 Grace 培养基干粉 45 克溶解在适量纯净水中；依次加入 3g 市售的海藻糖 Glucose 及 0.5g 市售的酵母抽提物 TC-Yeastolate；用 1N 的 NaOH 调节 pH 值至 6.1，加入 200ml 市售的胎牛血清，加入纯净水补足 1000 ml，按常规过滤、灭菌，得适于不同目的多种昆虫细胞生长的培养基。

[0015] 实施例 2

按 1000 毫升培养基的量进行下列备料：

纯净水	850ml
市购 Grace 培养基	50g
市购海藻糖	0.5g
市购酵母抽提物	3.0g
市购胎牛血清	150ml；

经过下列方法：

将市购的 Grace 培养基干粉 50 克溶解在适量纯净水中；依次加入 0.5g 市售的海藻糖 Glucose 及 3g 市售的酵母抽提物 TC-Yeastolate；用 1N 的 HCl 调节 pH 值至 6.3，加入 150ml 市售的胎牛血清，加入纯净水补足 1000ml，按常规过滤、灭菌，得适于不同目的多种昆虫细胞生长的培养基。

[0016] 实施例 3

按 1000 毫升培养基的量进行下列备料：

纯净水	900ml
市购 Grace 培养基	50g
市购海藻糖	2.0g
市购酵母抽提物	2.0g
市购胎牛血清	100ml；

经过下列方法：

将市购的 Grace 培养基干粉 50 克溶解在适量纯净水中；依次加入 2g 市售的海藻糖 Glucose 及 2g 市售的酵母抽提物 TC-Yeastolate；用 1N 的 NaOH 调节 pH 值至 6.2，加入 100ml 市售的胎牛血清，加入纯净水补足 1000ml，按常规过滤、灭菌，得适于不同目的多种昆虫细胞生长的培养基。

[0017] 实施例 4

按 1000 毫升培养基的量进行下列备料：

纯净水	820ml
市购 Grace 培养基	48g
市购海藻糖	2.5g
市购酵母抽提物	1.5g
市购胎牛血清	180ml；

经过下列方法：

将市购的 Grace 培养基干粉 48 克溶解在适量纯净水中；依次加入 2.5g 市售的海藻糖 Glucose 及 1.5g 市售的酵母抽提物 TC-Yeastolate；用 1N 的 NaOH 调节 pH 值至 6.2，加入 180ml 市售的胎牛血清，加入纯净水补足 1000ml，按常规过滤、灭菌，得适于不同目的多种昆虫细胞生长的培养基。

[0018] 实施例 5

按 1000 毫升培养基的量进行下列备料：

纯净水	880ml
市购 Grace 培养基	45.7g
市购海藻糖	1.9g
市购酵母抽提物	2.5g
市购胎牛血清	120ml；

经过下列方法：

将市购的 Grace 培养基干粉 45.7 克溶解在适量纯净水中；依次加入 1.9g 市售的海藻糖 Glucose 及 2.5g 市售的酵母抽提物 TC-Yeastolate；用 1N 的 HCl 调节 pH 值至 6.1，加入 120ml 市售的胎牛血清，加入纯净水补足 1000ml，按常规过滤、灭菌，得适于不同目的多种昆虫细胞生长的培养基。

[0019] 实施例 6

按 1000 毫升培养基的量进行下列备料：

纯净水	840ml
-----	-------

市购 Grace 培养基	45g
市购海藻糖	3g
市购酵母抽提物	3g
市购胎牛血清	160ml ;

经过下列方法：

将市购的 Grace 培养基干粉 45 克溶解在适量纯净水中；依次加入 3g 市售的海藻糖 Glucose 及 3g 市售的酵母抽提物 TC-Yeastolate；用 1N 的 HCl 调节 pH 值至 6.3，加入 160ml 市售的胎牛血清，加入纯净水补足 1000ml，按常规过滤、灭菌，得适于不同目的多种昆虫细胞生长的培养基。

[0020] 为表明本发明的技术效果，下面通过具体试验例加以验证。

[0021] 试验用培养基：Schneider、TC-100、Grace 和本发明实施例的培养基。

[0022] 培养过程：按常规将各昆虫细胞分别用上述不同的四种培养基进行培养。结果如下：

1. 短翅鸣螽胚胎细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 1 的培养基共四种，分别对短翅鸣螽胚胎细胞进行培养，结果显示：在本发明实施例 1 的培养基及 Schneider 培养基中生长的短翅鸣螽胚胎细胞长势较好，培养初期细胞形态多样，贴壁生长状态，细胞透亮、有光圈，细胞在培养一段时间后增殖，并进行了传代。成功建立短翅鸣螽胚胎细胞系 3 个，均为 RIRI 改良 Grace 培养基培养。结果见表 1。

[0023] 表 1

培养基	培养效果
Schneider	培养初期细胞形态多样,细胞贴壁生长,细胞有增殖现象,传代。
TC-100	细胞不易从组织块上脱离,细胞圆形,个体较小,细胞无增殖。
Grace	细胞形态多样,细胞悬浮生长,个别细胞贴壁生长,但贴壁不紧,易摇落。
本发明实施例 1 的培养基	培养初期细胞形态多样,细胞贴壁生长,细胞有增殖现象,传代超过 100 代,成功建立无限细胞系 3 个。

2. 东亚飞蝗胚胎细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 1 的培养基共四种,对东亚飞蝗胚胎细胞进行培养,结果显示:在本发明实施例 1 的培养基中生长的东亚飞蝗胚胎细胞长势较好,细胞形态多样,有圆形、椭圆形、梭形、多边形等,细胞个体较大,呈悬浮生长状态。结果见表 2。

[0024] 表 2

培养基	培养效果
Schneider	细胞多为圆形,成絮状聚齐生长,个体较小,细胞无增殖。
TC-100	细胞多为圆形、悬浮居中生长,细胞无增殖。
Grace	细胞多为圆形,成絮状聚齐生长,细胞个体较小,细胞无增殖。
本发明实施例 1 的培养基	细胞形态多样,悬浮生长,个别细胞贴壁生长,细胞有增殖现象。

3. 柑橘凤蝶胚胎细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 2 的培养基共四种,对柑橘凤蝶胚胎细胞进行培养,结果显示:在本发明实施例 2 的培养基中生长的柑橘凤蝶胚胎细胞长势较好,培养初期,细胞形态多样,有圆形、椭圆形、梭形、多边形等,细胞个体较大,呈贴壁生长状态,细胞透亮、有光圈,培养后细胞有增殖现象。结果见表 3。

[0025] 表 3

培养基	培养效果
Schneider	细胞多为圆形、悬浮居中生长,个别梭形细胞贴壁生长,细胞无增殖。
TC-100	细胞多为圆形,成絮状聚齐生长,个体较小,个别细胞贴壁生长,细胞无增殖。
Grace	细胞形态多样,个悬浮、贴壁生长,有结晶体形成。
本发明实施例 2 的培养基	细胞形态多样,贴壁生长,细胞有增殖现象。

4. 柑橘凤蝶新孵幼虫细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 2 的培养基共四种,对柑橘凤蝶新孵幼虫细胞进行培养,结果显示:柑橘凤蝶新孵幼虫细胞在 Grace 及本发明实施例 2 的培养基中生长较好,细胞贴壁并拉网长满瓶底,表现出良好的代谢状况,且组织块上容易脱落细胞有增殖现象。其中在本发明实施例 2 的培养基中培养的柑橘凤蝶新孵幼虫细胞传代超过 100 代,成功建立无限细胞系 1 个。结果见表 4。

[0026] 表 4

培养基	培养效果
Schneider	细胞多为圆形、悬浮居中生长,个别梭形细胞贴壁生长,细胞无增殖。
TC-100	细胞多为圆形,个体较小,悬浮居中生长细胞无增殖,有结晶体形成。
Grace	细胞形态多样,个别悬浮生长,贴壁生长的占大多数,细胞有增殖现象。
本发明实施例 2 的培养基	细胞形态多样,贴壁并拉网长满瓶底,细胞有增殖现象。

5. 柑橘凤蝶蛹血淋巴细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 2 的培养基共四种,对柑橘凤蝶蛹血淋巴细胞进行培养,结果显示:柑橘凤蝶蛹血淋巴细胞在本发明实施例 2 的培养基中生长较好,贴壁生长,生长维持的时间较长,目前在本发明实施例 2 的培养基培养的柑橘凤蝶蛹血淋巴细胞已存活两年,而在另外 3 种培养基中培养的柑橘凤蝶蛹血淋巴细胞在培养半年后几乎就已破裂死亡,或长出大量结晶体。结果见表 5。

[0027] 表 5

培养基	培养效果
Schneider	巨型细胞为主,成片状贴壁,培养 30 天左右贴壁细胞开始悬浮生长,细胞数量逐渐变少,结晶体产生。
TC-100	巨型细胞为主,成片状贴壁,培养 20 天左右贴壁细胞开始悬浮生长,细胞数量逐渐变少,结晶体产生。
Grace	巨型细胞为主,成片状贴壁,培养 50 天左右贴壁细胞开始悬浮生长,细胞数量逐渐变少。
本发明实施例 2 的培养基	细胞形态多样,除巨型外,还有一些梭形及圆形细胞,始终维持贴壁生长。

6. 柑橘凤蝶蛹脂肪体细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 2 的培养基共四种,对柑橘凤蝶脂肪体细胞进行培养,结果显示:在本发明实施例 2 的培养基下细胞长势较好,少数细胞能贴壁生长,生长维持的时间较长,而在其余培养基中生长的状态类似,均为培养基外观浓稠,显微镜下不易观看清楚。无贴壁细胞,随着培养时间的增加,结晶体逐渐增多。结果见表 6。

[0028] 表 6

培养基	培养效果
Schneider	絮状细胞为主,培养液浑浊,结晶体产生。
TC-100	絮状细胞为主,培养液浑浊,结晶体产生。
Grace	絮状细胞为主,油滴状物质较多,培养液浑浊,结晶体产生。
本发明实施例 2 的培养基	部分小型圆细胞居中悬浮生长,部分细胞贴壁生长,细胞内空泡较多,存活时间较久。

7. 金斑蝶胚胎细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 3 的培养基共四种,对金斑蝶胚胎细胞进行培养,结果显示:在本发明实施例 3 的培养基和常规 Grace 培养基中生长的金斑蝶胚胎细胞长势较好,培养初期,细胞透亮、有光圈,少数细胞能贴壁生长并能增殖。结果见表 7。

[0029] 表 7

培养基	培养效果
Schneider	细胞多为圆形,成絮状聚齐生长,个体较小,个别细胞贴壁生长,细胞无增殖。
TC-100	细胞多为圆形、悬浮居中生长,个别梭形细胞贴壁生长,细胞无增殖。
Grace	细胞形态多样,大部分细胞贴壁生长,细胞有增殖现象。
本发明实施例 3 的培养基	细胞形态多样,悬浮、贴壁生长。

8. 金斑蝶新孵幼虫细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 3 的培养基四种,对金斑蝶新孵幼虫细胞进行培养,结果显示:在本发明实施例 3 的培养基和常规 Grace 培养基中生长的金斑蝶新孵幼虫细胞长势较好,细胞透亮有光圈,部分细胞能贴壁生长并能增殖。结果见表 8。

[0030] 表 8

培养基	培养效果
Schneider	细胞多为圆形,组织块上不易脱离单细胞,细胞无增殖。
TC-100	细胞多为圆形、悬浮居中生长,细胞无增殖。
Grace	细胞形态多样,大部分细胞贴壁生长,细胞有增殖现象。
本发明实施例 3 的培养基	细胞形态多样,悬浮、贴壁生长。

9. 金斑蝶蛹血淋巴细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 4 的培养基共四种,对金斑蝶蛹血淋巴细胞进行培养,结果显示:金斑蝶蛹血淋巴细胞在本发明实施例 4 的培养基中生长较好,贴壁生长,生长维持的时间较长,目前在本发明实施例 4 的培养基培养的金斑蝶蛹血淋巴细胞已存活两年,并已进行传代。而在另外 3 种培养基中培养的金斑蝶蛹血淋巴细胞在培养 1 年后几乎就已死亡,或长出大量结晶体。结果见表 9。

[0031] 表 9

培养基	培养效果
Schneider	巨型细胞为主,成片状贴壁,培养 20 天左右贴壁细胞开始悬浮生长,细胞数量逐渐变少,结晶体产生。
TC-100	巨型细胞为主,成片状贴壁,培养 20 天左右贴壁细胞开始悬浮生长,细胞数量逐渐变少,结晶体产生。
Grace	巨型细胞为主,成片状贴壁,培养 50 天左右贴壁细胞开始悬浮生长,细胞数量逐渐变少。
本发明实施例 4 的培养基	细胞形态多样,除巨型外,还有一些梭形及圆形细胞,始终维持贴壁生长,细胞出现增殖现象。

10. 金斑蝶蛹脂肪体细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 4 的培养基共四种,对金斑蝶脂肪体细胞进行培养,结果显示:在本发明实施例 4 的培养基下细胞长势较好,少数细胞能贴壁生长,生长维持的时间较长,而在其余培养基中生长的状态类似,均为培养基外观浑浊,显微镜下不易观看清楚。无贴壁细胞,随着培养时间的增加,结晶体逐渐增多。结果见表 10。

[0032] 表 10

培养基	培养效果
Schneider	絮状细胞为主, 培养液浑浊。
TC-100	絮状细胞为主, 培养液浑浊, 结晶体产生。
Grace	絮状细胞为主, 油滴状物质较多, 培养液浑浊。
本发明实施例 4 的培养基	部分小型圆细胞居中悬浮生长, 部分细胞贴壁生长, 细胞有增殖现象, 存活时间较长。

11. 枯叶蛱蝶胚胎细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 4 的培养基共四种, 对金斑蝶胚胎细胞进行培养, 结果显示: 在本发明实施例 4 的培养基中生长的枯叶蛱蝶细胞长势较好, 培养初期, 细胞透亮、有光圈, 少数细胞能贴壁生长并能增殖。结果见表 11。

[0033] 表 11

培养基	培养效果
Schneider	细胞多为圆形,成絮状聚齐生长,个体较小,全部悬浮居中生长,细胞无增殖,有结晶体形成。
TC-100	细胞多为圆形、悬浮居中生长,细胞无增殖,有结晶体形成。
Grace	细胞形态多样,悬浮、生长,有结晶体形成。
本发明实施例 4 的培养基	细胞形态多样,悬浮、贴壁生长,光圈透亮。

12. 枯叶蛱蝶新孵幼虫细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace、和本发明实施例 5 的培养基共四种,对枯叶蛱蝶新孵幼虫细胞进行培养,结果显示:在各种培养基中,枯叶蛱蝶新孵幼虫细胞均为悬浮生

长,培养基内多为组织块,单细胞较少,有结晶体产生。没有发现适宜于枯叶蛱蝶新孵幼虫细胞生长的培养基。结果见表 12。

[0034] 表 12

培养基	培养效果
Schneider	细胞多为圆形,组织块上不易脱离单细胞,细胞无增殖。
TC-100	细胞多为圆形、悬浮居中生长,细胞无增殖,有结晶体形成。
Grace	细胞多为圆形,组织块上不易脱离单细胞,细胞无增殖。
本发明实施例 5 的培养基	细胞多为圆形,组织块上不易脱离单细胞,细胞无增殖。

13. 喙尾琵琶甲胚胎细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace 和本发明实施例 5 的培养基共四种,对喙尾琵琶甲胚胎细胞进行培养,结果显示:在本发明实施例 5 的培养基中生长的喙尾琵琶甲胚胎细胞长势较好,细胞形态多样,有圆形、椭圆形、梭形、多边形等,细胞个体较大,呈悬浮、贴壁生长状态,细胞透亮、有光圈。结果见表 13。

[0035] 表 13

培养基	培养效果
Schneider	细胞多为圆形,成絮状聚齐生长,个体较小,个别细胞贴壁生长,细胞无增殖。
TC-100	细胞多为圆形、悬浮居中生长,个别梭形细胞贴壁生长,细胞无增殖,有结晶体形成。
Grace	细胞形态多样,大部分细胞贴壁生长,细胞有增殖现象。
本发明实施例 5 的培养基	细胞形态多样,悬浮、贴壁生长。

14. 喙尾琵琶甲新孵幼虫细胞

试验采用 Schneider、TC-100、Grace 和本发明实施例 6 的培养基共四种,对枯叶蛱蝶新孵幼虫细胞进行培养,结果显示:喙尾琵琶甲新孵幼虫细胞在本发明实施例 6 的培养基及 Schneider 培养基中生长较好,在这 2 种培养基内生长的形态多样,细胞贴壁生长,并拉网长满瓶底,细胞表现出良好的代谢状况,且组织块上容易脱落细胞。目前在本发明实施例

6 的培养基培养的喙尾琵琶甲新孵幼虫细胞已存活三年, 并已进行传代。结果见表 14。

[0036] 表 14

培养基	培养效果
Schneider	细胞形态多样, 细胞贴壁生长, 且贴壁较紧不易摇落, 贴壁细胞拉网生长结满瓶底, 组织块上较易脱落细胞, 有增殖现象。
TC-100	细胞多为圆形、悬浮居中生长, 个别细胞贴壁生长, 细胞无增殖。
Grace	细胞多为圆形, 组织块上不易脱离单细胞, 细胞无增殖。
本发明实施例 6 的培养基	细胞形态多样, 细胞贴壁生长, 且贴壁较紧不易摇落, 贴壁细胞拉网生长结满瓶底, 组织块上较易脱落细胞, 有增殖现象, 传代。