

细胞固定化的方法及应用

严小军

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

传统的悬浮法细胞培养成本昂贵,效率较低,已不能满足 DNA 体外重组与基因克隆技术发展的需要;固

定化酶技术则由于酶本身作为蛋白质容易变性,限制了进行生物化学的研究。细胞固定化技术是细胞悬浮培养

技术和固定化酶技术结合的革新,自 70 年代末以乙醇发酵及藻类细胞固定培养为先导,得到分子生物学家和生物化学家的广泛重视,并已发展成为一种得到广泛应用的生物技术。近年来,细胞代谢途径及次生代谢产物生产、藻类细胞壁多糖作为固定化基质、基因重组后的细胞固定培养已成为细胞固定化技术研究的三大热点。

下面将对细胞固定化的方法及上述三个方向的应用研究作一简要的综述。

1 固定化方法的分类与特征

1.1 细胞固定化的分类

Radovich^[5] 将细胞固定化技术按细胞与载体的相互作用关系分为 4 种:

1.1.1 无载体固定化 通过絮凝剂如阳离子、阴离子聚电解质、矿物质胶体等的作用使细胞聚集。严格地说,这种方法不能称为固定化技术。

1.1.2 共价偶合 通过交联剂的作用,使细胞连接到交联接基上。

1.1.3 吸附 通常是表面多孔性惰性载体引起细胞的附着。

1.1.4 包埋 以水凝胶或膜作为半透性惰性物质能允许底物的流动而限制了细胞的流动性,利用多孔性纤维质如纤维素可以使细胞渗透进入孔隙内部,也能达到固定化目的,这是包埋的一种特殊形式。

Scot, C. D.^[6] 认为,以上 4 种固定化方式可以归纳为两大类:附着与包埋。划分的标准是附着细胞直接与底物接触,受到外界环境影响较大,而包埋使细胞受到了更大的空间限制。

图 1 是固定化方法分类示意^[5]。

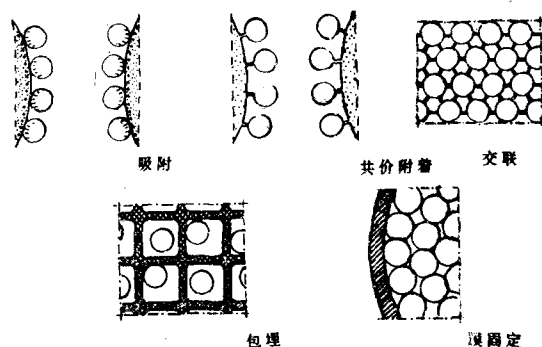


图 1 固定化方法分类示意

1.2 细胞固定化的机理研究

细胞附着不是简单的热力学吸附,故不能用 Langmuir 等温式来描述。Durand^[1] 的研究结果表明:细胞的附着能力与细胞培养的年龄及细胞表面的 τ 电位有关。某些生物有机体必须与其他的有机体发生共生作用才能附着,或者需要通过离子间引力或化学键作用改变其表面的物理化学性质才能产生附着的效应。

包埋是目前使用的最广泛的细胞固定化方法,按照固定化基质材料不同可以分为 3 类:凝胶、膜和多孔纤维。固定化机理研究有以下几方面:

1.2.1 生物膜动力学 根据 Donnan 平衡原理,半透膜使细胞与大量溶液分离。这些被包埋在膜内的细胞分泌的粘多糖类聚合物起到了胶水的作用,使细胞对膜表面产生吸引,从而使细胞牢固地吸附。继续分泌产生的物质与膜表面的相互作用形成生物膜。Suga, K.^[7] 应用旋转盘接触器得出了最佳膜厚度模型。

1.2.2 质量转移研究 包埋载体的孔径应大于底物和产物的直径而小于细胞直径。这样才能保证底物、产物的自由扩散而防止细胞的流失。Iborra, J. L.^[3] 通过酶动力学方程的微积分推导表明:影响固定化细胞效率的决定因素是扩散速度和底物浓度。Damkohler 和 Thiele 模型为选择合适的固定化载体提供了数学理论基础。

1.2.3 细胞形态与物理化学环境因子的研究 细胞形态是细胞生存和生长的状态指数,反映了固定化细胞的生产效率。运用光电显微镜可以监测细胞的浓度。细胞在凝胶珠孔穴内繁殖,特别是靠近凝胶珠表面处,直到充满整个网络间隙。物理化学环境因子是指光照、温度、盐度、pH 值、 P_{O_2}/P_{CO_2} 、水活度、营养盐浓度等。这些因素不仅影响细胞的发育生长,而且会引起细胞主要代谢途径的改变。

1.3 细胞固定化的特征及固定化基质的选择

细胞固定化的重要特征是提高了细胞的密度。为细胞生长提供了单一稳定的环境,并且保持了活性细胞的酶活性。附着固定技术容易造成细胞流失,虽然加入 Al^{3+} 改变细胞表面电荷或加入戊二醛转化为共价交联可以使其性能得到改进,但是,包埋法拥有更大的 S/V , 并且由于水凝胶脱水收缩过程中引起细胞浓度相对提高,使细胞活性提高,因此,选择固定化基质进行合适有效的包埋成为问题的关键。

目前,包埋基质主要是包囊材料,如聚芳胺、环氧树脂,甲壳质、聚丙烯酰亚胺以及海藻多糖类。Kennedy, J. F.^[4] 认为:褐藻酸钙凝胶不仅价格低廉、无毒性、机械强度较高,而且它为微生物细胞提供了类似于天然细胞壁多糖的环境,有助于细胞的稳定化。

海藻多糖主要是琼胶、卡拉胶、褐藻胶。这些多糖随来源、季节、种类的变化,其结构组成均有变化,从而其理化性质和生理功能有很大变化。如凝胶强度、生物配伍性等。Guisselet, K. B. [2]已有综述,这里不再赘述。

1.4 固定化细胞效率的检测

Tyo, M. A. [9]指出:只有当细胞生长充满整个限制空间时,细胞不再生长或者在溶解与分裂之间达到了动态平衡。此时,细胞数保持稳定并能生产终产物。细胞的特定生产率与细胞生长速度成反比。所以,通过检测细胞浓度及产物浓度可以推出固定化细胞的效率。

产物浓度的测定方法主要是色谱分析,如薄层色谱、高效液相色谱和气相色谱。放射免疫与酶免疫分析也能提供灵敏、专一的分析结果。另外有色物质的比色分析也十分简便 Whiggins, S. P. M. [10]认为,水的活性在细胞内复杂生化反应过程中起着重要的作用,蛋白质和水的相互作用引起蛋白质聚集状态的变化,当细胞内部水环境发生改变后,内部溶质聚集状态的变化会引起代谢途径的变化。因此水的活性也是固定化细胞效率的重要参数。

2 细胞固定化的应用、意义及前景

2.1 分子生物学应用

细胞固定化培养的理想结果是高体积生产率、高产物浓度、高选择性及低的原料消耗。分子生物学的DNA体外重组与基因克隆技术依赖于细胞培养,尔后才能优化杂交细胞,制作基因图。

原核细胞的克隆以质粒或噬菌体为载体,将外源基因片段与载体组成的重组DNA分子转入受体细胞,通过密集培养方式来增殖和表达。主要的受体细胞是大肠杆菌。Zabriskie, D. W. [11]的研究结果表明:质粒的拷贝数主要由质粒的遗传性决定,其生长条件受宿主细菌的遗传性影响,质粒的拷贝数影响重组蛋白质的生产和质粒的稳定性。

真核细胞不携带相当于质粒的附加体DNA,因此需要来自DNA病毒或RNA病毒的基因作载体。但是,许多产物的生物合成途径极其复杂,需要许多基因同时进入变体细胞,相应的基因表达调节机制也有许多障碍。所以,通常采用真核细胞的直接培养。如果改变物理化学环境因素,如营养盐的胁迫条件、紫外光照、诱变剂等,能导致主要代谢途径的改变,然后筛选出能获得高产量的次级代谢产物的后基因突变体;用CsCl梯度密度离心法或热失活的方法加以鉴别,已用于研究细胞的染色体重排机制。对某些缺少原始分生组织的愈伤组织

的培养也可用来生产特定的次级代谢产物。

2.2 生物化学应用

固定化细胞具有固定化酶的功能,其原理是以整个细胞代替酶蛋白作为某一生物合成的催化剂。其主要的产物和用途有:

2.2.1 生物医药物质 主要是次级代谢产物,如甾类化合物、生物碱、类黄酮、类胡萝卜素及芳香族化合物。例如:胡萝巴碱、蛇根碱、莽草酸、紫草宁、异喹啉等。

2.2.2 生物传感器 膜包埋法固定化细胞可以作为电化学分析的生物传感器。可以说是对酶电极应用的一种自然扩展。

2.2.3 废物处理 膜包埋法固定化细胞形成的生物膜可用于废水的硝化或脱硝。无氧过程处理有机污染物形成的甲烷可以作为再生能源,还能用于吸附去除的溶解重金属。这不仅可以保护生态环境,而且为能源的节约开辟了新的道路。

2.2.4 化工商品的生产 目前主要用于乙醇生产。将酵母、乳清、葡萄糖、木糖、半乳糖等发酵,能得到乙醇及少量的丁醇、异丙醇混合物。如果能对酶的催化活性保持时间加以延长,底物的利用率就能得到提高,将会进行大规模工业化生产。蛋白质和多肽的生产具有很大的潜力,这些物质大多具有酶的功能,如纤维素裂解酶、 β -乳糖酶等,有很高的经济价值,这些物质的生产还为生化合成机理的探讨提供了有说服力的实证。

2.3 固定化细胞技术现存的问题

在分子生物学方面,固定化细胞技术尚处于起步阶段,如何延长杂交细胞的寿命,如何得到稳定的重组基因遗传,如何有目的地进行细胞培养及优化都是尚待解决的问题。如果在固定化细胞培养的寿命问题上有所突破,那么许多用于人类分子病治疗的药物将能大大降低成本,如胰岛素。另外对癌细胞的培养和研究也能起到促进作用。

在生物化学方面,面临的主要问题是如何进行大规模工业生产。固定化细胞具有独特的理化性质,固定化细胞的稳定性与载体及细胞的电荷相互作用有关,其米氏常数与细胞固定化过程中蛋白质侧链的构象改变有关,其最适pH、最佳使用温度及专一性与酶活力和生物内部微环境、生物能的改变有关。在固定化细胞酶动力学的研究基础之上, Sweere, A. P. J. [8]对速率限制因子加以分析,选择合适的生物反应器系统,如流动床系统,固定床系统等,为固定化细胞的工业化生产提供了理论模型。

2.4 细胞固定化的意义及前景

综上所述,细胞固定化技术是细胞生物学、分子生物学和生物化学研究的有力工具。在细胞生物学、分子生物学的研究中,它与 DNA 基因克隆技术相辅相成,为基因图的制定及杂交细胞的优化提供了为数众多可供选择的细胞群落。在生物化学研究中,它使酶动力学研究趋向深入,对生物合成代谢途径的认识提供了支持和证明。并且可能推广到商品化工业生产,提供价廉质优的生物制品,还可能成为生态环境保护及废物处理的有力手段。

细胞固定化技术的广泛应用前景决定了研究细胞固定化方法的深刻意义。特别是对载体的物理化学性质研究和质量转移速率限制因子的研究将对固定化细胞效率的提高提供理论指导,从而有效地选择高效的固定化载体,或者有效地对现有载体的物理化学性质加以改良。可以说,这项技术的产生与发展推动了多学科交叉和深入研究。并为这些学科的进一步发展提供有力的工具。

参考文献

- [1] Durand, N., 1981. *Sci. Aliment.* 1, 529-540.
- [2] Guiseley, K. B., 1989. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 706-716.
- [3] Iborra, J. L., 1986. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 1-5.
- [4] Kennedy, J. F., 1982. *Nature* 299, 777-778.
- [5] Radovich, J. M., 1985. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 2-10.
- [6] Scot, C. D., 1987. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 66-73.
- [7] Suga, K., 1984. *Chem. Eng. Sci.* 319, 767-773.
- [8] Sweere, A. P. J., 1987. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 386-398.
- [9] Tto, M. A., 1987. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 514-520.
- [10] Whiggins, P. M., 1990. *Microb. Rev.* 54, 432-449.
- [11] Zabriskie, D. W., 1986. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 706-717.