

文章编号: 1003-9015(2007)06-0989-08

微胶囊固定化培养重组盘基网柄菌提高人类可溶性 Fas 配体的表达

徐宝多¹, 徐志南², 何宁¹, 王颖¹, 陈杰², 李清彪^{1,3}, 卢英华^{1,3}

(1. 厦门大学 化学工程与生物工程系, 福建 厦门 361005; 2. 浙江大学 化学工程与生物工程系, 浙江 杭州 310027; 3. 厦门大学 福建省化学生物学重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 首先研究了应用于液芯羧甲基纤维素钠-海藻酸钙(CMC-ALG)微胶囊制备中的各种化学组分对重组盘基网柄菌生长的影响, 然后考察不同组分浓度制备而成的各种 CMC-ALG 微胶囊内重组盘基网柄菌的生长情况, 从而得到较适的微胶囊制备的组分配比(CMC 12 g·L⁻¹, SA 8 g·L⁻¹, CaCl₂ 100 g·L⁻¹)。结果表明, 在以上较适条件下制备的微胶囊内重组盘基网柄菌的生长得到了极大的改善, 最大的细胞密度比游离培养时提高了 4 倍, 达到了 8.0×10⁷ mL⁻¹; 相应的人类可溶性 Fas 配体(FasL)的表达水平也提高了 1.5 倍, 达到了 315 μg·L⁻¹。最后, 开展了微胶囊化重组盘基网柄菌的二次重复发酵 FasL 的研究, 结果表明, 经过二次重复批次培养, 最大细胞密度可达到 1.24×10⁸ mL⁻¹, 为游离培养的 8~10 倍, 而且 FasL 的表达水平还能维持高水平(280 μg·L⁻¹), 为游离培养时的 2 倍。

关键词: CMC-ALG 微胶囊; 微囊化培养; 盘基网柄菌; 人类可溶性 Fas 配体

中图分类号: TQ 920.4; Q343.6

文献标识码: A

Improving the Expression Level of Soluble Human Fas Ligand by Cultivating Recombinant *Dictyostelium discoideum* in CMC-ALG Microcapsules

XU Bao-duo¹, XU Zhi-nan², HE Ning¹, WANG Ying¹, CHEN Jie², LI Qing-biao^{1,3}, LU Ying-hua^{1,3*}(1. Department of Chemical and Biochemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;
3. Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The biocompatibility between the growth of *Dictyostelium discoideum* AX3-pLu8 and chemical components used for the preparation of carboxy methyl cellulose-alginate (CMC-ALG) microcapsules was evaluated at first, and then the effects of the concentrations of each component forming the capsule on the growth behaviors of *D. discoideum* cultivated in it were studied. For microencapsulated cultivating *D. discoideum*, it was found that the most suitable capsule components are 12 g·L⁻¹ of CMC, 8 g·L⁻¹ of sodium alginate (SA) and 100 g·L⁻¹ of CaCl₂. Using the microcapsules with mentioned composition, the cell density in it can reach 8.0×10⁷ mL⁻¹, this value is about 5 times that could be observed in suspension culture, and correspondently, in the capsules a high concentration (315 μg·L⁻¹) of soluble human Fas ligand (shFasL) was detected, which is about 2.5 times higher than that obtained in suspension culture under the same culture condition. In addition, the immobilized cells could be used effectively for repeated batch cultivation and in the second repeated batch cultivation, a very high cell density (up to 1.24×10⁸ mL⁻¹) and still a high expression of FasL (280 μg·L⁻¹) could be obtained.

Key words: CMC-ALG microcapsule; microencapsulated cultivation; *Dictyostelium discoideum*; soluble human Fas ligand

收稿日期: 2006-01-09; 修订日期: 2006-06-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助(20306025, 30370039).

作者简介: 徐宝多(1982-), 男, 辽宁彰武人, 厦门大学化工系硕士。通讯联系人: 卢英华, E-mail: ylu@xmu.edu.cn

1 引言

生物微胶囊是一种新兴的细胞固定化技术^[1], 它能将酶、蛋白质或活细胞封装在构成微胶囊的亲水半透膜内, 生物大分子和细胞被微胶囊的膜阻隔开来, 培养基中的营养成分和细胞分泌的产物等小分子物质可以自由出入半透膜, 从而达到催化、培养、浓缩目标产物或免疫隔离的目的^[2]。目前用于生物物质固定化的生物微胶囊体系主要有海藻酸钠类、壳聚糖类、聚丙烯酰胺类和琼脂类以及由硫酸纤维素钠(NaCS)和聚二丙烯基二甲基氯化铵(PDADMAC)构成的生物微胶囊^[1,3]。

近年来, 在悬浮培养中单细胞生长的盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)阿米巴变形虫已发展成为一个前景广阔的重组蛋白真核表达系统^[4]。但在无菌(液体)复杂培养基中培养盘基网柄菌时, 低生长速度(代时为8~10 h)和低细胞密度($\leq 2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$)严重限制了其应用^[4]。目前对高密度培养盘基网柄菌的研究工作主要是从两方面着手, 一是改进培养基组成, 设计适合其生长的培养基^[5-8]; 二是通过微过滤截留细胞或是利用多孔玻璃、浮石、多孔陶瓷等无机多孔载体固定化培养盘基网柄菌^[9-12]。

人类 Fas 配体(human Fas ligand, hFasL)是分子量为 3.7×10^4 的同源三聚体 II 型跨膜糖蛋白^[13], 是一种细胞凋亡因子, 属于肿瘤坏死因子家族成员^[14,15]。FasL 通过与细胞表面的 Fas 受体结合可引起 Fas 表达阳性的细胞凋亡或程序性细胞死亡, 从而杀死病变细胞^[16]。FasL 也可以可溶性形式存在。可溶性 FasL 同样具有生物活性, 可与它的膜结合形式竞争性调节细胞的凋亡。FasL 的凋亡作用在治疗肿瘤、AIDS、癌症、关节炎等慢性疾病方面有着极其重要的作用。

本研究采用液芯羧甲基纤维素钠-海藻酸钙(CMC-ALG)体系^[17]固定化培养盘基网柄菌, 该体系的制备过程是将CMC和CaCl₂的混合液滴入到海藻酸钠溶液中, Ca²⁺由液滴向外扩散与海藻酸钠反应形成一层凝胶薄膜, 从而得到中间为液芯的球形微囊。这种方法制成的微胶囊具有良好的生物相容性、制备简单、成本低廉、机械强度高、传质性能好、后处理方便等优点, 是比海藻酸钙实心胶珠更具有潜力的固定化体系^[17]。本文对该微胶囊的生物相容性进行了初步研究, 考察了用于制备生物微胶囊的材料羧甲基纤维素钠(CMC)、海藻酸钠(SA)以及CaCl₂对微胶囊固定化盘基网柄菌生长的影响, 并利用该微胶囊体系固定化培养重组盘基网柄菌AX3-Lu8表达人类可溶性Fas配体(shFasL)。

2 材料与方法

2.1 药品

酵母粉购自Oxoid, 细菌用胰蛋白胍购自Difco, 酪蛋白胍购自Merck。二氢链霉素硫酸盐由Sigma提供, 遗传霉素(G-418)从Serva获得, 胰蛋白胍购于北京双旋微生物制品厂, 羧甲基纤维素钠(CMC)购于国药集团上海化学试剂公司, 海藻酸钠(SA)购于广东西陇化工厂, 其余试剂均为市售分析纯。

2.2 重组盘基网柄菌

将编码了可溶性人Fas配体(AA141-128)的基因pCESFL95和hCG- β 信号肽基因克隆到质粒pMB74中, 然后导入盘基网柄菌AX3细胞中, 得到重组盘基网柄菌AX3-pLu8^[18]。该克隆菌在强启动子actin15的作用下可分泌表达hFasL蛋白。

2.3 培养基与缓冲液

本实验所用的培养基为Reymond^[19]提出的复杂HL-5C培养基, 每升HL-5C培养基中含有10 g D-葡萄糖、5 g酵母粉、5 g蛋白胍、2.5 g细菌用胰蛋白胍、2.5 g酪蛋白胍、1.2 g KH₂PO₄和0.35 g Na₂HPO₄。用2 mol·L⁻¹ NaOH 或10% H₃PO₄调节培养基pH至6.5, 在121 °C下高压灭菌20 min。葡萄糖溶液灭菌时与其它培养基成分分开, 灭菌后再混合。

2.4 实验方法

2.4.1 盘基网柄菌的悬浮培养

在250 mL摇瓶中加入30 mL HL-5C培养基, 接种处于对数生长期的细胞, 并使初始细胞密度为 $(0.5 \sim 1) \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 22~23 °C, 150 min⁻¹摇床振荡培养。培养过程中加入10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 遗传霉素G418(下同)。

2.4.2 重组盘基网柄菌的微胶囊化与培养

如图1所示,将所有制囊溶液灭菌,一定浓度的CaCl₂与CMC溶液按1:4(v/v)混合构成阳离子溶液,再将预先培养好的菌悬液加入到CaCl₂和CMC的混合液中,采用带6#针头的半自动微胶囊制备装置^[20]逐滴滴入由磁力搅拌的SA溶液中,10 min后将微胶囊过滤并用灭菌的去离子水清洗,转移到0.2 mol·L⁻¹ CaCl₂溶液中进一步强化10 min,收集微胶囊,然后用无菌0.9%生理盐水反复清洗3次。将制备好的微胶囊化盘基网柄菌接入HL-5C培养基中,22~23 ℃,170 min⁻¹摇床振荡培养,定期取样分析。培养基与微胶囊的体积比控制在10:1到10:4之间。

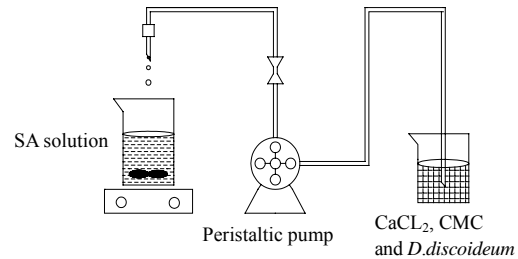


图1 半自动制备微胶囊示意图

Fig.1 Schematic diagram of microcapsule preparation equipment

2.5 分析方法

细胞密度(N):通过机械破碎微胶囊获得囊内发酵液,在显微镜下用Neubauer chamber血球板计数。

葡萄糖浓度:通过DNS法测定。

铵离子和氨浓度:利用Bumenteyer H和Stenner A提出的一种荧光分析新方法测定^[21]。

可溶性shFasL浓度:利用购自法国Diaclone公司的可溶性hFasL试剂盒通过酶联免疫分析方法(ELISA)测定^[10]。

3 结果和讨论

3.1 HL-5C培养基悬浮培养重组盘基网柄菌AX3-pLu8表达shFasL

重组盘基网柄菌在HL-5C培养基中悬浮培养的结果见图2。从图2中可以发现,细胞在HL-5C培养基中以世代时间8 h的速度生长,经过72 h的培养,最大细胞密度达到 1.8×10^7 mL⁻¹。葡萄糖在对数生长期消耗速度较快,稳定期后浓度继续下降,最终葡萄糖的消耗量为2 g·L⁻¹。培养过程中代谢产物氨的浓度一直在增加,最终可达0.57 g·L⁻¹。FasL的产量在稳定期后期达到最大,为126 μg·L⁻¹。

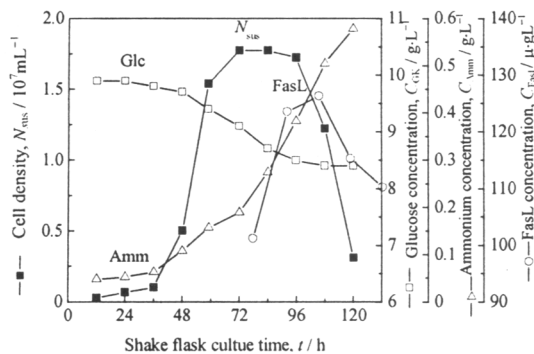


图2 重组盘基网柄菌在HL-5C培养基中的悬浮培养

Fig.2 Shake flask cultivation of free *D. discoideum* AX3-pLu8 cells in the complex medium HL-5C

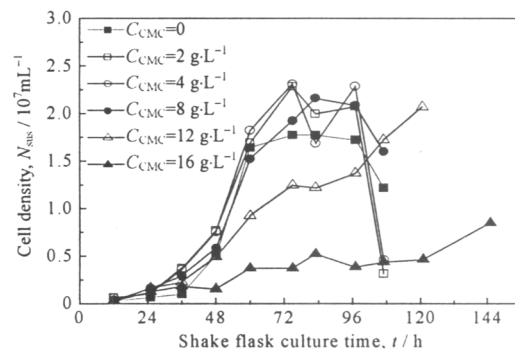


图3 不同浓度CMC对HL-5C培养基中盘基网柄菌生长的影响

Fig.3 Effect of CMC on the growth of *D. discoideum* in HL-5C medium

3.2 CMC-ALG微胶囊对盘基网柄菌的生物相容性

3.2.1 CMC对盘基网柄菌生长的影响

实验中将浓度分别为2.0、4.0、8.0、12.0和16.0 g·L⁻¹的CMC直接溶于HL-5C培养基中,灭菌后接入盘基网柄菌细胞,摇床培养,测定不同CMC浓度下盘基网柄菌的生长曲线,如图3。从图3可以看出培养基中加入CMC后,盘基网柄菌的生长情况与对照培养($C_{CMC}=0$)基本相似,这说明CMC对盘基网柄菌细胞的生长基本没有毒害作用。当CMC浓度在2、4和8 g·L⁻¹时,盘基网柄菌最大细胞密度分别达到 2.3×10^7 mL⁻¹、 2.2×10^7 mL⁻¹和 2.2×10^7 mL⁻¹,均高于对照培养所达到的最大细胞密度 1.8×10^7 mL⁻¹。

可见 CMC 对盘基网柄菌的细胞生长还有一定的促进作用。仅当 CMC 浓度大于 $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 由于培养基黏度增加, 溶氧量下降, 对数生长期延长, 生长速率降低, 最大细胞密度降低到了 $1.0\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 以下。

3.2.2 海藻酸钠对盘基网柄菌生长的影响

按 1.0 、 2.5 、 5.0 、 10.0 和 $15.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度将海藻酸钠(SA)直接溶于 HL-5C 培养基中, 按 3.2.1 节同样的方法, 进行盘基网柄菌的培养, 考察不同浓度的 SA 对盘基网柄菌细胞生长的影响(图 4)。从图 4 可见, 加入 SA 后, 盘基网柄菌的生长速率降低, 说明 SA 对细胞的生长具有一定的毒害作用, 且随 SA 浓度逐渐增加, 其对细胞生长的影响越大。当 SA 的浓度大于 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 严重抑制了细胞的生长, 表明其在实验范围内对盘基网柄菌的生长并不具有良好的生物相容性。在 CMC-ALG 微胶囊的制备过程中, 由于 SA 与 Ca^{2+} 在液滴表面迅速发生凝胶反应, 并不能渗入到微胶囊内, 并且胶囊制备结束后, 可通过反复清洗除去微胶囊表面残留的 SA 溶液, 因此不会对微胶囊内的盘基网柄菌产生不良影响。

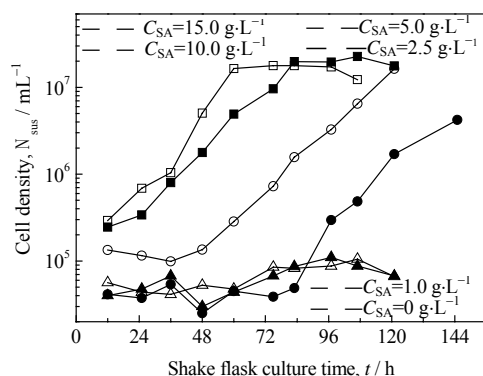


图 4 不同浓度海藻酸钠对 HL-5C 培养基中盘基网柄菌生长的影响

Fig.4 Effect of sodium alginate on the growth of *D. discoideum* in HL-5C medium

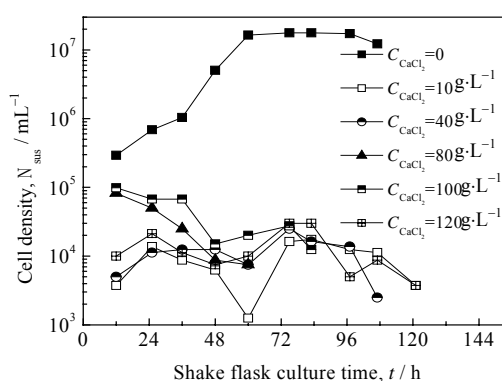


图 5 不同浓度 CaCl_2 对 HL-5C 培养基中盘基网柄菌生长的影响

Fig.5 Effect of CaCl_2 on the growth of *D. discoideum* in HL-5C medium

3.2.3 CaCl_2 对盘基网柄菌生长的影响

不同浓度的 CaCl_2 对盘基网柄菌生长的影响见图 5。从图 5 中可见, 高浓度的 CaCl_2 对盘基网柄菌生长有较为严重的抑制作用。考虑到制囊过程中, CMC 和 Ca^{2+} 混合液滴中的 Ca^{2+} 几乎全部与 SA 发生界面反应形成凝胶薄膜, 微胶囊内 Ca^{2+} 浓度很低, 因此不会对盘基网柄菌的生长造成明显影响。

3.3 CMC-ALG 微胶囊制备条件的优化

3.3.1 制备液中 CMC 浓度的影响

固定 SA 浓度为 $8.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 CaCl_2 浓度为 $100.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 配制不同浓度的 CMC 溶液, 按 2.4.2 节描述的方法制备微胶囊化盘基网柄菌, 考察不同制备浓度的 CMC 对微胶囊化盘基网柄菌密度的影响, 结果见图 6。从图中可见, 制备液 CMC 的浓度对盘基网柄菌的细胞生长具有一定的影响。当 CMC 的浓度为 $12.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 经过 144 h 培养, 微囊内细胞密度可达 $1.0\times 10^8 \text{ mL}^{-1}$; 当 CMC 浓度增大到 $15.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $18.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 微胶囊内最大细胞密度分别下降到 $8.4\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 和 $7.1\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。而当 CMC 浓度为 $9.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 由于滴制过程中液滴未能形成很好的球形, 制备出的微胶囊机械强度降低, 在培养过程中破裂现象较为严重, 最大细胞密度严重降低, 仅为 $3.9\times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 左右, 可见 CMC 浓度不能过低。由此可知 较为适宜的 CMC 浓度在 $11\sim 13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, 以 $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜。

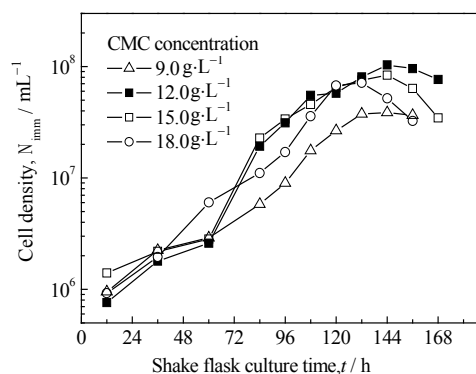


图 6 制备液中 CMC 浓度对重组盘基网柄菌生长的影响

Fig.6 Growth of *Dictyostelium discoideum* at different concentrations of CMC in the preparation.

3.3.2 制备液中海藻酸钠 SA 浓度的影响

选取 CMC 为 $12.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 CaCl_2 为 $100.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 改变微胶囊制备液 SA 的浓度, 考察其对微胶囊化盘基网柄菌密度的影响(图 7)。从图 7 可见, 当 SA 的浓度为 $8.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 微胶囊内的细胞密度达到最大为 $1.0 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 。当 SA 浓度较低($\leq 6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)时, 滴加入 SA 溶液的阳离子液滴周围单位体积内能与 Ca^{2+} 结合的 SA 位点数相应降低, 造成微胶囊膜致密度下降, 厚度增加, 结构松散, 容易破裂; 当 SA 浓度较高($8 \sim 12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)时, 能与 Ca^{2+} 结合的 SA 位点数增加, 形成膜厚和直径较小, 机械强度较大的微胶囊; 而当 SA 浓度高于 $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 溶液粘度过大, 不利于搅拌和制备。

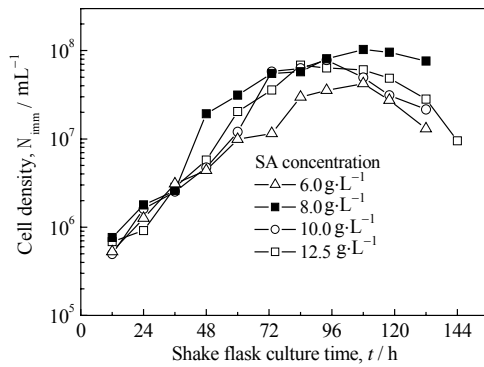


图 7 制备液中 SA 浓度对重组盘基网柄菌生长的影响

Fig.7 Growth of *Dictyostelium discoideum* at different concentrations of SA in the preparation

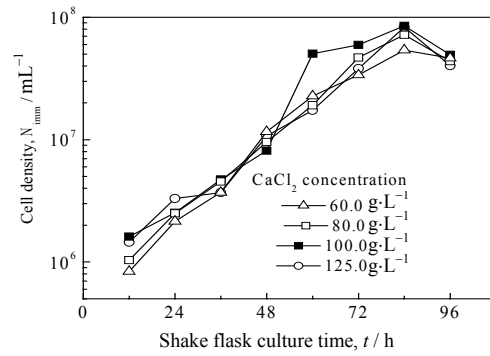


图 8 制备液中不同 CaCl_2 浓度对重组盘基网柄菌生长的影响

Fig.8 Growth of *Dictyostelium discoideum* at different concentration of CaCl_2 in the preparation

3.3.3 制备液中 CaCl_2 浓度的影响

图 8 为当 CMC 为 $12.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 SA 为 $8.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 制备液中不同 CaCl_2 的浓度对微胶囊内盘基网柄菌密度的影响。从图中可见, 尽管在考察浓度范围内, CaCl_2 对细胞的生长速度影响较小, 但对所能达到的最大细胞密度还是有一定的影响。当 CaCl_2 的浓度为 $100.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 最大固定化细胞密度可达 $8.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 为几组中最高; 而当 CaCl_2 的浓度为 $60.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 微胶囊内最大细胞密度只达到 $5.4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 为几组中最低。造成这种情况的原因是当 CaCl_2 的浓度较低时, 培养后期微胶囊破裂现象较为严重; 当 CaCl_2 的浓度从 $60.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $100.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 由于滴加到 SA 溶液中的阳离子液滴与 SA 结合的位点增加, 微胶囊的机械强度有较大增强; 但如果 CaCl_2 溶液浓度过高, 则会对所固定化的细胞, 酶等生物物质的活性产生较大的影响。因此, 较为合适的 CaCl_2 的浓度应为 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。

由此可以得出, 盘基网柄菌的 CMC-ALG 微胶囊固定化最合适的配比为, CMC $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, SA $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, CaCl_2 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这一最适配比与前面的单独组分对盘基网柄菌生长影响的结论有不一致的地方, 这说明微胶囊中的很多制备组分较小地分散到液体中, 从而减少了对盘基网柄菌生长的抑制作用。

3.3.4 培养基与微胶囊体积比 $V_m:V_{imm}$ 对固定化细胞密度的影响

考察培养基与微胶囊体积比对囊内细胞密度的影响, 以确定合适的生物微胶囊接种量。图 9 为不同培养基与盘基网柄菌微胶囊体积比对微胶囊内细胞生长的影响以及对应的培养基中葡萄糖浓度的变化。从图 9 可以看出, 不同的培养基与微胶囊体积比对盘基网柄菌生长速率的影响不大, 微胶囊内的细胞均在 72 h 后达到稳定期,

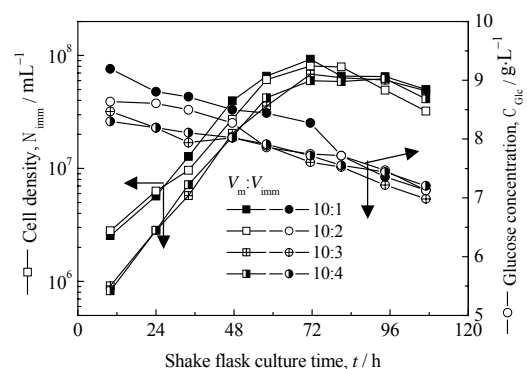


图 9 不同培养基与微胶囊体积比条件下重组盘基网柄菌的生长和葡萄糖消耗情况

Fig.9 Growth of encapsulated *Dictyostelium discoideum* in microcapsule and change of glucose concentration in medium under different volumetric ratios of medium and microcapsules

但是所能达到的最大细胞密度不同。总的趋势是随着培养基与微胶囊的体积比增大时,微胶囊内的细胞密度随之增加,当培养基与微胶囊的体积比从10:4增大到10:1时,最大细胞密度从 $6.3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 增加到 $9.3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。各体积比下的葡萄糖消耗速率基本相同,均接近正比例关系,不像游离培养过程中,对数生长期的消耗速率明显高于培养过程的其它时期;且初始葡萄糖浓度随着体积比的增大而增加。

从图9可以得出由于微胶囊的传质性能良好,微胶囊的加入对原培养基中的葡萄糖等营养物质具有一定的稀释作用,且随着体积比的逐渐增大,这种稀释作用减弱,有利于微胶囊内细胞的生长,从培养的角度看,较大的体积比(10:1左右)比较有利,但体积比过大会导致培养基的浪费。

3.4 CMC-ALG微胶囊固定化培养重组盘基网柄菌 AX3-Lu8表达shFasL

配制浓度为 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的CMC溶液、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 溶液以及 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的SA溶液,按2.4.2节描述的方法将重组盘基网柄菌AX3-Lu8微胶囊固定化,按培养基与微胶囊体积比为10:1将制备好的微胶囊化盘基网柄菌细胞接入HL-5C培养基中,置于 22°C , 170 min^{-1} 的摇床培养,定期取样分析。固定化细胞密度(N_{imm})、培养基中细胞密度(N_{m})以及微胶囊内shFasL浓度(C_{imm})和培养基中shFasL浓度(C_{m})的变化结果见图10。从图10中可见,盘基网柄菌的微胶囊固定化培养与游离培养的生长曲线具有相似的形状(图2),只是在微胶囊固定化时盘基网柄菌的对数生长期略为延长,但培养108h以后,微胶囊内细胞密度达 $8.0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,明显高于悬浮培养的细胞密度($1.8 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$)。经过120h培养,培养基中的细胞密度 N_{m} 也可达到 $1.5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。由此可见,CMC-ALG体系对盘基网柄菌细胞的生长无明显的抑制作用,证明该体系与盘基网柄菌具有良好的生物相容性。经过108h培养,微胶囊内shFasL浓度达 $315 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,约为游离培养时($126 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的2.5倍;同时,培养基中FasL的浓度仅为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右,主要为培养过程中少量微胶囊破裂导致。可见囊膜对FasL分子的截留性能很好。因此,微胶囊化盘基网柄菌生产人类可溶性Fas配体,既可以提高表达产量,又有助于目标蛋白的浓缩和分离纯化。

培养过程中葡萄糖的消耗及氨的生成情况见图11。

经过120h,微胶囊外培养基中的葡萄糖浓度由原来的 $8.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低到 $7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,由于微胶囊本身对于培养基中营养物质的稀释作用以及高细胞密度,使微胶囊外培养基中葡萄糖的浓度低于游离培养时的浓度。培养过程中代谢产物氨的浓度一直在增加,最终可达 $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,低于游离培养时的 $0.57 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 NH_4^+ 对细胞生长有一定的抑制作用,而且 NH_4^+ 浓度越高,抑制作用就越强。在微胶囊化培养过程中,由于囊膜的传质性能较好,葡萄糖等营养物质通过囊膜不断进入囊内,同时,抑制细胞生长的 NH_4^+ 等小分子物质也从囊膜扩散到囊外培养基中,因此,获得了较高的细胞密度。可见,盘基网柄菌的微囊化培养提高了细胞密度,增加了营养物质葡萄糖的利用率且减少了代谢产物氨的生成。

3.5 微胶囊化盘基网柄菌的分批重复培养

与游离培养相比,微囊化培养的最大优势在于可以进行多批的重复培养,且培养结果会逐步改善^[2]。

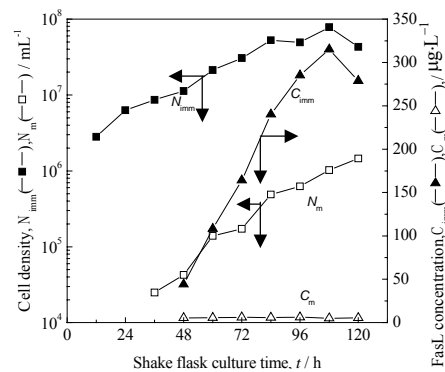


图10 微胶囊化重组盘基网柄菌在HL-5C培养基中表达shFasL

Fig.10 Shake flask cultivation of encapsulated *Dictyostelium discoideum* cells on HL-5C medium for the expression of shFasL

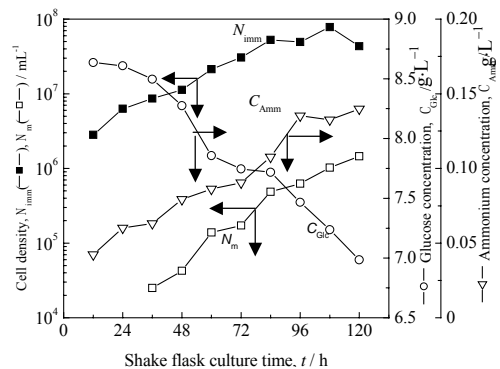


图11 微胶囊化重组盘基网柄菌在HL-5C培养基中培养时的葡萄糖消耗与氨生成曲线

Fig.11 Profiles of cell density in microcapsules (N_{imm}) and in medium (N_{m}), glucose and ammonium concentration during the shake flask cultivation of encapsulated *dictyostelium discoideum* cells on HL-5C medium

图 12 为盘基网柄菌连续两次分批培养的结果。从图中见,微囊化的盘基网柄菌在第一批培养 72 h 后,最大固定化细胞密度 N_{imm} 达到 $9.1 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$, 经过 96 h 培养后,微胶囊内细胞密度虽然下降到 $6.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,但同时囊外培养基中的细胞密度 N_m 达到了 $8.9 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,葡萄糖的浓度由初始时的 $9.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低到 $7.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,FasL 的产量上升到 $310 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4^+ 浓度升为 $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,此时更换新鲜培养基;再培养 24 h,囊内的最大细胞密度达到 $1.3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,即约为游离培养的 6~8 倍,FasL 的产量略有下降,但仍维持在 $280 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右,为普通游离培养的两倍左右,此时 NH_4^+ 浓度略有升高,达到 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经过 168 h 培养以后,由于大部分微胶囊出现溶胀现象,因此,无法进行更多批次的连续培养。

4 结 论

研究表明,CMC-ALG 生物微胶囊对盘基网柄菌具有良好的生物相容性,可以用于盘基网柄菌的微胶囊固定化培养。盘基网柄菌的 CMC-ALG 微胶囊固定化较为合适的制备液配比为,CMC $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,SA $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当培养基与微胶囊的体积比为 10:1 时,更有利于微胶囊内细胞的高浓度累积;微胶囊化盘基网柄菌间歇培养时最大细胞密度可达到 $8.0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 以上,大大提高了盘基网柄菌的细胞密度。微胶囊内 shFasL 浓度可达 $315 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,约为游离培养时($126 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的 2.5 倍。囊膜对 FasL 具有较好的截留功能,有利于目标蛋白的分离纯化。连续两批培养时最大细胞密度可达 $1.3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,约为普通游离培养的 8~10 倍,FasL 产量也稳定 $280 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右,充分显示出其在生产高经济价值异源蛋白方面的优越性。从这些结果我们可以推测,在微囊化细胞培养中,微胶囊既能给细胞提供一个良好的液态环境,也能提供一个支持壁和保护体系,可以让细胞与培养环境之间较好地能量与质量交换。同时盘基网柄菌的阿米巴变形虫没有细胞壁,对剪切力十分敏感,由于胶囊膜的保护,可以防止由于剪切力的作用而使细胞破碎,由此也可增加细胞密度。

参考文献:

- [1] ZHANG Zi-ru(张子儒), ZHENG Qiao-dong(郑巧东), YAO Shan-jing(姚善泾). Cultivation of encapsulated *Monascus purpureus* in NaCS-PDMDAAC capsules(红曲霉菌微胶囊化培养) [J]. **Food and Fermentation Industries(食品与发酵工业)**, 2003, 29(11): 1-4.
- [2] YE Zi-jian(叶子坚), YAO Shan-jing(姚善泾). Cultivation of lactobacillus in microcapsule(乳杆菌微胶囊化培养的研究) [J]. **Acta Microbiologica Sinica(微生物学报)**, 2002, 40(5): 507-512.
- [3] YANG Yi(杨毅), WANG Ting-jie(王亭杰), PEI Guang-ling(裴广玲) *et al.* Direct preparation process of microcapsules by *in situ* polymerization of urea-tormaldehyde(一步法制备脲醛树脂微胶囊过程的研究) [J]. **J Chem Eng of Chinese Univ(高校化学工程学报)**, 2005, 19(3): 338-343.
- [4] Lu Ying-hua, Wu Xiao-xia, Xu Zhi-nan *et al.* Advances in *Dictyostelium discoideum* as an expression system [J]. **Chemical Journal on Internet**, 2004, 6(9): 58.
- [5] Franke J, Kessin R. A defined minimal medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum* [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1977, 74(5): 2157-2161.
- [6] Han S I, Friehs K, Flaschel E. Improvement of a synthetic medium for *Dictyostelium discoideum* [J]. **Proc Biochem**, 2004, 39(8): 925-930.
- [7] Han S I, Friehs K, Flaschel E. Cultivation of *Dictyostelium discoideum* on an improved synthetic medium in a conventional bioreactor [J]. **Proc Biochem**, 2004, 65(5): 547-552.
- [8] Stephan M, Beshay U, Friehs K *et al.* Influence of medium composition on growth behaviour of *Dictyostelium discoideum* for cultivation on axenic media [J]. **Proc Biochem**, 2003, 39(3): 333-343.
- [9] Beshay U, Friehs K, Flaschel E. Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in immobilized form by colonization of porous supports [J].

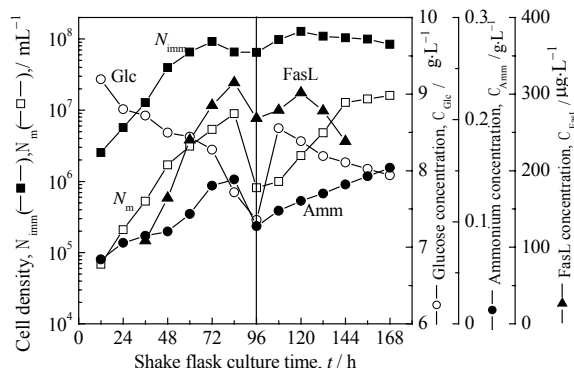


图 12 CMC-ALG 微胶囊化重组盘基网柄菌的分批重复培养

Fig.12 Repeated batch cultivation of immobilized *D. discoideum* in CMC-ALG microcapsules

- Proc Biochem**, 2003, 38(11): 1521-1529.
- [10] Lu Y, Knol J C, Linskens M H K *et al.* Production of the soluble human Fas ligand by means of *Dictyostelium discoideum* cultivated on a synthetic medium [J]. **J Biotechnol**, 2004, 108(3): 243-251.
- [11] Beshay U, Friehs K, Azzam A E M *et al.* Analysis of the behaviour of *Dictyostelium discoideum* in immobilised state by means of continuous cultivation [J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2003, 26(2): 117-122.
- [12] Lu Y, Beshay U, Friehs K, Flaschel E. Mass production of *Dictyostelium discoideum* in homogeneous and heterogeneous cultivation systems [J]. **Proc Biochem**, 2004, 39(12): 1859-1870.
- [13] Tanaka M, Suda T, Takahashi T *et al.* Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes [J]. **EMBO J**, 1995, 14(6): 1129-1135
- [14] Nagata S. Apoptosis by death factor [J], **Cell**, 1997, 88(3):355-365.
- [15] Seino K, Iwabuchi K, Kayagaki N *et al.* Cutting edge: chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes [J]. **J Immunol**, 1998, 161(9): 4484-4488.
- [16] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor [J], **Science**, 1995, 267(5203): 1449-1456.
- [17] CHAI Yi(柴燧), MEI Le-he(梅乐和), YAO Shan-jing(姚善泾). Preparation, diffusivity and basic application of liquid core CMC - ALG microcapsule(液芯CMC-ALG微胶囊的制备、扩散性能及初步应用研究) [J]. **Membrane Science and Technology(膜科学与技术)**, 2004, 24(3): 10-14.
- [18] WU Xiao-xia(吴小霞), LU Ying-hua(卢英华), LI Qing-biao(李清彪) *et al.* Expression of the soluble human Fas ligand in *Dictyostelium discoideum*(利用盘基网柄菌表达可溶性人 Fas 配体) [J]. **Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)**, 2005, 21(3): 380-384.
- [19] Reymond C D, Beghdadi-Rais C, Roggero M *et al.* Anchoring of an immunogenic *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein on the surface of *Dictyostelium discoideum* [J]. **J Biol Chem**, 1995, 270(21): 12941-12947.
- [20] CHAI Yi(柴燧). Characters of Intra-hollow CMC-ALG Microcapsule and Cultivation of *Bacillus Subtilis* in CMC-ALG Microcapsule for the Production of Nattokinase(中空海藻酸钙微胶囊的性质及其固定化枯草杆菌生产纳豆激酶的研究) [D]. Hangzhou(杭州): Zhejiang University(浙江大学), 2004.
- [21] Lu Y. Technische Massnahmen zur Verbesserung der Zuechtung von *Dictyostelium discoideum* [D]. Germany: Faculty of Technology, University of Bielefeld, 2002.