

反相高效液相色谱法分析盘基网柄菌 对氨基酸的利用

黄霄红¹, 王颖², 叶美玲², 罗臻², 宋娟³, 凌雪萍^{2*}

(1. 厦门大学医学院, 2. 厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005;

3. 吉林华康药业股份有限公司, 吉林 敦化 133700)

摘要: 为观察盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)在 SIH 培养基上对氨基酸的利用情况, 以 2,4-二硝基氯苯为衍生化试剂, 研究了用反相高效液相色谱(RP-HPLC)测定氨基酸的方法. 在 60 min 内 16 种氨基酸达到基线分离, 峰面积与氨基酸浓度的线性相关系数为 0.992~0.999. 对发酵液样品的分析结果表明, 盘基网柄菌对赖氨酸的利用最为彻底, 发酵后期赖氨酸已被消耗完全. 蛋氨酸、色氨酸、精氨酸、组氨酸也较易被盘基网柄菌利用, 而对天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、缬氨酸的需求不大. 这一代谢特点为改进盘基网柄菌培养基组成提供依据.

关键词: 盘基网柄菌; 反相高效液相色谱法; 氨基酸; 2,4-二硝基氯苯

中图分类号: Q 815

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2012)04-0734-06

近年来, 粘霉菌属盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)已经发展成为一个前景广阔的表达复杂药物蛋白的真核生物表达系统^[1-3]. 但从高密度培养工程角度来看, 在复杂培养基和半合成培养基中盘基网柄菌的低生长速度(代时为 8~12 h)和低最大细胞密度($1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$)^[4-7], 严重限制了该表达系统的应用. Franke 和 Kessin^[8]在 1977 年首次设计了 FM 合成培养基, 以多种氨基酸和维生素分别取代复合培养基中的蛋白胨和酵母粉, 最终细胞密度达到 $2 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$.

盘基网柄菌的营养需求相当复杂, 尽管 Franke 和 Kessin 提出了 FM 合成培养基, 但对生长必需的一些成分仍很难确定^[9]. Han 等^[10]用邻苯二甲醛(OPA)为衍生化试剂, 分析了盘基网柄菌在 FM 合成培养基上氨基酸的消耗情况, 进而改进其氨基酸组成, 得到了一种适合盘基网柄菌生长的新型合成培养基, 命名为 SIH. 在该改良培养基中盘基网柄菌以代时 8~10 h 的速度生长, 其最大细胞密度可达到 $3 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. 然而 OPA 不能与二级氨基酸直接反应^[11], Han 等未能检测出 FM 合成培养基所含的全部氨基酸, 而仅能对所检测出的氨基酸进行优化. 本文选用 2,4-二硝基氯苯(CDNB)为柱前衍生化试剂, 在碱性

条件下定量地与氨基酸缩合成 N-二硝基苯基氨基酸(DNP-氨基酸), 能较理想地实现 16 种待测氨基酸的基线分离, 重现性好, 衍生条件简便. 以 SIH 培养基为研究起点, 在盘基网柄菌培养过程中连续取样分析, 确定菌种生长所必需的氨基酸种类, 为全面优化该合成培养基提供了可靠资料.

1 材料与amp;方法

1.1 盘基网柄菌培养

1.1.1 菌株

重组盘基网柄菌 AX3-pLu8 为本实验室保存菌种, 该克隆菌可分泌表达 FasL 蛋白^[12-13].

1.1.2 培养基

复合 HL-5C 培养基^[6], 每升 HL-5C 培养基中含有 10 g D-葡萄糖、5 g 酵母粉、5 g 胰蛋白胨、2.5 g 细菌用胰蛋白胨、2.5 g 酪蛋白胨、1.2 g KH_2PO_4 和 0.35 g Na_2HPO_4 . 用 2 mol/L NaOH 或质量分数为 10% 的 H_3PO_4 将 pH 调至 6.5 后在 $1 \times 10^5 \text{ Pa}$ 下灭菌 20 min. 葡萄糖要配成质量分数为 10% 的溶液单独高压或膜过滤灭菌, 然后再加到其他灭完菌的培养基组分中.

SIH 培养基^[10]是由氨基酸、维生素、无机盐、微量元素以及葡萄糖、磷酸盐、链霉素硫酸盐组成. 氨基酸、维生素、无机盐、微量元素事先配成浓缩溶液, 在一 20

收稿日期: 2012-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070296)

* 通信作者: xpling@xmu.edu.cn

℃下保存,临用前置于室温使其融化. SIH 培养基的组成和浓度见表 1.

1.1.3 培养条件

盘基网柄菌细胞不能直接在合成培养基上生长. 为了预培养盘基网柄菌,在 300 mL 摇瓶中装入 30 mL 复合 HL-5C 培养基,接入对数生长期的细胞,使其初始浓度为 $0.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,在 21~22 ℃、摇床培养(150 r/min)4~5 d 后细胞密度通常可以达到 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. 此后在培养基中逐渐增加 SIH 培养基的比例,完成盘基网柄菌对 SIH 培养基的适应过程^[12]. 这一适应过程一般持续 3~4 周. 所有实验培养基中均加入 10 μg/mL 遗传菌素 G418 以保证质粒的高拷贝数^[12].

1.2 氨基酸检测方法^[14-15]

1.2.1 仪器及其工作条件

Agilent 1100 高效液相色谱仪,配有 G1322A 在线脱气仪;G1311A 四元泵系统;G1314A 可变波长紫外检测器;G1328B 手动进样器. HC-C18 柱色

柱,4.6 mm×250 mm,粒径 5 μm,柱温 30 ℃,检测波长 360 nm. 流动相 A:0.05 mol/L 乙酸钠缓冲溶液(含 10 mol/L N,N-二甲基甲酰胺,用 1 mol/L HCl 调 pH 为 6.5);流动相 B:乙腈-水(体积比为 1:1)溶液. 线性梯度洗脱程序:0~8 min,16%B;8~30 min,25%B;35~50 min,60%~85%B;52~55 min,16%B;55~65 min,100%B;65~72 min,16%B. 流动相流速为 1.0 mL/min.

1.2.2 材料与试剂

标准品:L-精氨酸(Arg),L-天冬酰胺·H₂O(Asn),L-天冬氨酸(Asp),L-半胱氨酸·HCl(Cys-HCl),L-谷氨酸(Glu),甘氨酸(Gly),L-组氨酸(His),L-异亮氨酸(Ile),L-亮氨酸(Leu),L-赖氨酸·HCl(Lys-HCl),L-蛋氨酸(Met),L-苯丙氨酸(Phe),L-脯氨酸(Pro),L-苏氨酸(Thr),L-色氨酸(Trp),L-缬氨酸(Val),均为日本味之素公司产品.

试剂:CDNB 为分析纯,德国 ABCR 公司产品;乙腈为色谱纯,中国医药集团上海化学试剂公司产品;NaHCO₃、KH₂PO₄、HCl、NaOH 均为分析纯,中国医

表 1 培养盘基网柄菌用 SIH 培养基配方

Tab. 1 Composition of the SIH medium for *D. discoideum*

氨基酸	浓度/ (mmol· L ⁻¹)	维生素	质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	痕量元素	浓度/ (μmol· L ⁻¹)	无机盐	浓度/ (mmol· L ⁻¹)	碳源	浓度/ (mmol· L ⁻¹)
L-精氨酸	3.3	生物素	0.020	Na ₂ EDTA	13	NaHCO ₃	0.2	葡萄糖	56
L-天冬酰胺	2.3	维生素 B12	0.005	H ₃ BO ₃	1.8	NH ₄ Cl	1.0		
L-天冬氨酸	1.1	叶酸	0.20	CoCl ₂	0.7	CaCl ₂	0.02		
L-半胱氨酸	1.5	硫辛酸	0.4	CuSO ₄	0.6	FeCl ₃	0.10		
甘氨酸	12.0	核黄素	0.5	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.08	MgCl ₂	0.40		
L-谷氨酸	3.7	硫胺素	0.6	MnCl ₂	2.6				
L-组氨酸	1.4			ZnSO ₄	8				
L-异亮氨酸	4.6								
L-亮氨酸	6.9								
L-赖氨酸	8.5								
L-蛋氨酸	2.3								
L-苯丙氨酸	3.3								
L-脯氨酸	7.0								
L-苏氨酸	4.2								
L-色氨酸	1.7								
L-缬氨酸	6.0								

药集团上海化学试剂公司产品;水为二次重蒸水。

1.2.3 16种氨基酸混合标准溶液配制

准确称取 Lys 200 mg, Gly、Leu、Pro、Val 各 100 mg, 其余 11 种标准品各 60 mg 溶解后于 100 mL 容量瓶中定容至刻度。

1.2.4 样品处理

样品于 10 000 r/min 离心 10 min, 80% (体积分数) 的乙醇沉淀去蛋白后取上清液 1 mL 用于衍生和分析。

1.2.5 标准氨基酸和样品的衍生化

精确量取混合标准溶液或样品 1 mL, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 加入 0.5 mol/L NaHCO₃ 3.0 mL, 加入 1 mL 20% CDNB(乙腈稀释), 摇匀。置 80 °C 恒温水浴中, 暗处反应 2 h, 迅速冷却至室温。加入 1 mol/L HCl 150 μL, 用 0.01 mol/L KH₂PO₄ 缓冲液(用 1 mol/L NaOH 调至 pH=7.0) 稀释至刻度, 摇匀。经 0.45 μm 滤膜过滤后进样 10 μL 测定。以保留时间定性, 峰面积外标法定量分析。

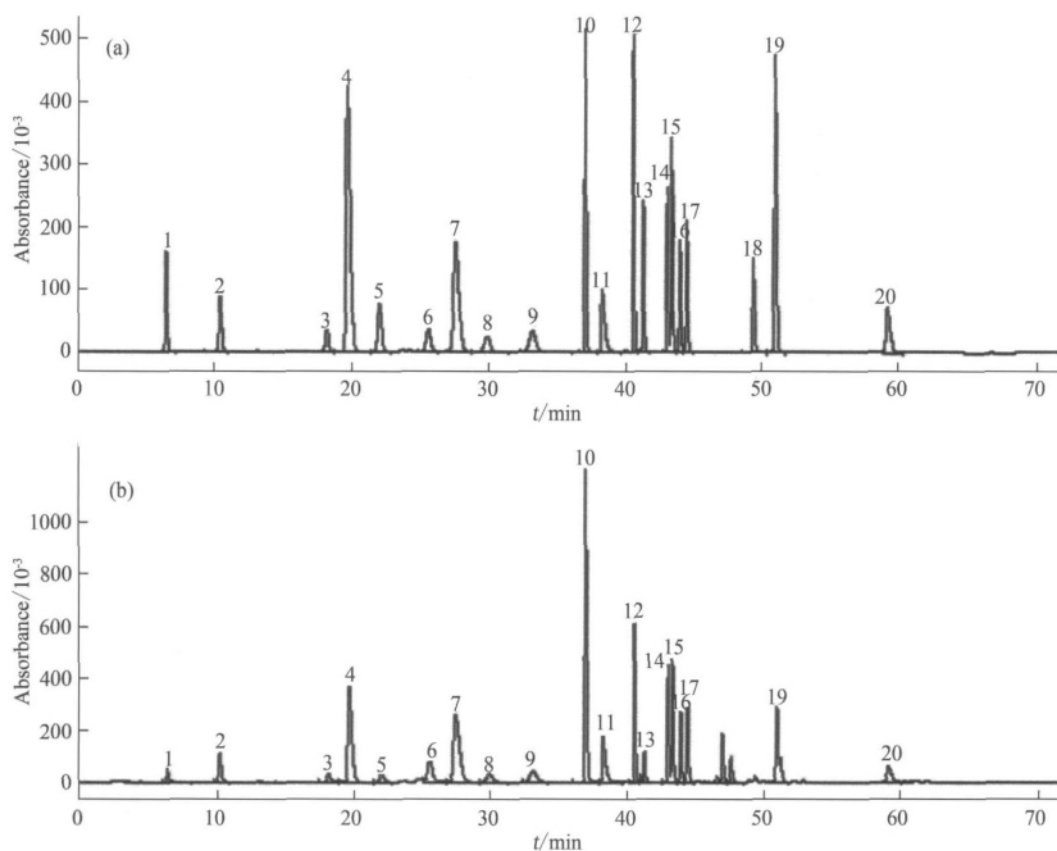
2 结果与讨论

2.1 混合标准溶液浓度的确定

待测 SIH 培养基中各游离氨基酸的含量差别很大, 如果采用等浓度混合标准溶液所作的校正曲线其线性范围不能涵盖所有的氨基酸, 故根据 SIH 培养基中各氨基酸的含量配制不同浓度的混合标准溶液来做校正曲线。

2.2 混合标准溶液和实际样品的分离结果

由图 1 可知, 混合标准溶液中的 16 种氨基酸全部达到基线分离, 细胞培养液样品中的游离氨基酸液也取得满意的分离效果。其中 Lys 为二氨基氨基酸, 可与 CDNB 衍生成 3 种产物, 第 3 种衍生产物混杂在未知峰内。这一结果与聂小春等^[16]的研究相吻合。在样品测定时, 可选用任一种衍生物峰定量。在整个培养过程及空白 SIH 培养基中都未能检测出游离的 Cys(空



1. Asp; 2. Glu; 3. Asn; 4. DNP-OH; 5. His; 6. Lys 第 1 个峰; 7. Gly; 8. Arg; 9. Thr; 10. Pro; 11. Lys 第 2 个峰; 12. Val; 13. Met; 14. Ile; 15. Leu; 16. Trp; 17. Phe; 18. Cys; 19. 未知峰; 20. 未知峰。

图 1 16 种氨基酸混合标准溶液(a)和培养 10 h 的培养基中氨基酸(b)的 HPLC 图

Fig. 1 Chromatograms of 16 amino acids standard solution (a) and amino acids in medium for culturing 10 h (b)

白培养基衍生化数据未给出),但 Cys 的确是盘基网柄菌生长所必需的氨基酸. Franke 和 Kessin^[8]证实若培养基中缺少 Cys 或胱氨酸,细胞生长速度和产率均降低,最大细胞密度只有 $3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 左右. 对比图 1 (a)和(b)可见,样品在 Phe 和 Cys 的位置中间出现了 2 个峰,推测 Cys 可能与培养基中的其他组分生成络合物而未能以游离状态存在. 这一结论与 Han 等^[10]的研究一致,他们采用 OPA 衍生法在 FM 及 SIH 合成培养基中也未能检测出游离 Cys 存在.

2.3 标准曲线和精密度实验

分别取 1. 2. 3 中所述混合标准氨基酸溶液 0. 01, 0. 02, 0. 1, 0. 2, 0. 4, 0. 5, 0. 8, 1. 0 mL, 按前述衍生化方法制得 DNP-氨基酸, 并按色谱条件测定. 以 DNP-氨基酸峰面积为纵坐标 Y, 氨基酸质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标 X, 对测得数据进行线性回归. 结果表明, 在此浓度范围内, 衍生化反应生成的 DNP-氨基酸峰面积与氨基酸浓度具有良好的线性相关性, 16 种氨基酸的线性相关系数在 0. 992~0. 999 之间. 对同一样品重复测定 6 次, 求测定结果的相对标准偏差 (RSD). 标准曲线及测定结果的 RSD 见表 2.

2.4 盘基网柄菌对 SIH 培养基中氨基酸的利用情况

在盘基网柄菌培养过程中定时取样分析培养液中氨基酸含量, 15 种氨基酸的利用情况见图 2. 所有氨基酸都能被盘基网柄菌所利用, 但每种氨基酸利用的程度有所不同. 其中 Lys 的利用最为彻底, 在培养 7 d 时就被完全消耗, 这与 Han 等^[10]得出的结论一致. 图 3 进一步对比了发酵前后培养液中各氨基酸含量的变化, 图上数字标明了发酵末期剩余氨基酸与初始 SIH 培养基中氨基酸含量的比值. 除 Lys 外, 盘基网柄菌对 Met、Trp、Arg、His 的利用也较为充分, 在发酵末期这 4 种氨基酸的含量都降到初始含量的 15% 以下, 而对 Asp、Glu、Gly、Thr、Pro、Val 的需求不大, 末期含量仍接近或高于初始含量的 50%.

3 结论与展望

本研究中采用的 CDNB 柱前衍生反相高效液相色谱法, 可以对 16 种氨基酸进行分离检测及定量分析, 衍生化后供试品溶液至少可以稳定 72 h 以上, 重

表 2 16 种氨基酸的线性关系测定结果

Tab. 2 Results of linear relation of 16 amino acids

氨基酸	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性回归方程	相关系数	RSD/%
Asp	6~600	$Y=1.418 \times 10^2 + 4.179X$	0.993	1.465
Glu	6~600	$Y=1.220 \times 10^2 + 3.654X$	0.993	1.688
Asn	6~600	$Y=6.101 \times 10^1 + 1.706X$	0.992	8.004
His	6~600	$Y=1.404 \times 10^2 + 5.438X$	0.995	1.609
Gly	10~1000	$Y=4.284 \times 10^2 + 10.288X$	0.995	1.450
Arg	6~600	$Y=7.206 \times 10^1 + 2.338X$	0.993	1.948
Thr	6~600	$Y=1.074 \times 10^2 + 3.378X$	0.993	1.377
Pro	10~1000	$Y=5.091 \times 10^1 + 14.841X$	0.999	1.695
Lys	20~2000	$Y=1.082 \times 10^2 + 3.075X$	0.999	1.865
Val	10~1000	$Y=3.198 \times 10^2 + 7.253X$	0.995	1.721
Met	6~600	$Y=1.552 \times 10^2 + 5.678X$	0.995	1.681
Ile	6~600	$Y=1.908 \times 10^2 + 7.547X$	0.996	1.764
Leu	10~1000	$Y=2.702 \times 10^2 + 5.810X$	0.995	1.795
Trp	6~600	$Y=6.259 \times 10^1 + 8.289X$	0.999	1.856
Phe	6~600	$Y=1.599 \times 10^2 + 6.650X$	0.996	1.856
Cys	6~600	$Y=-3.603 \times 10^1 + 10.718X$	0.996	1.955

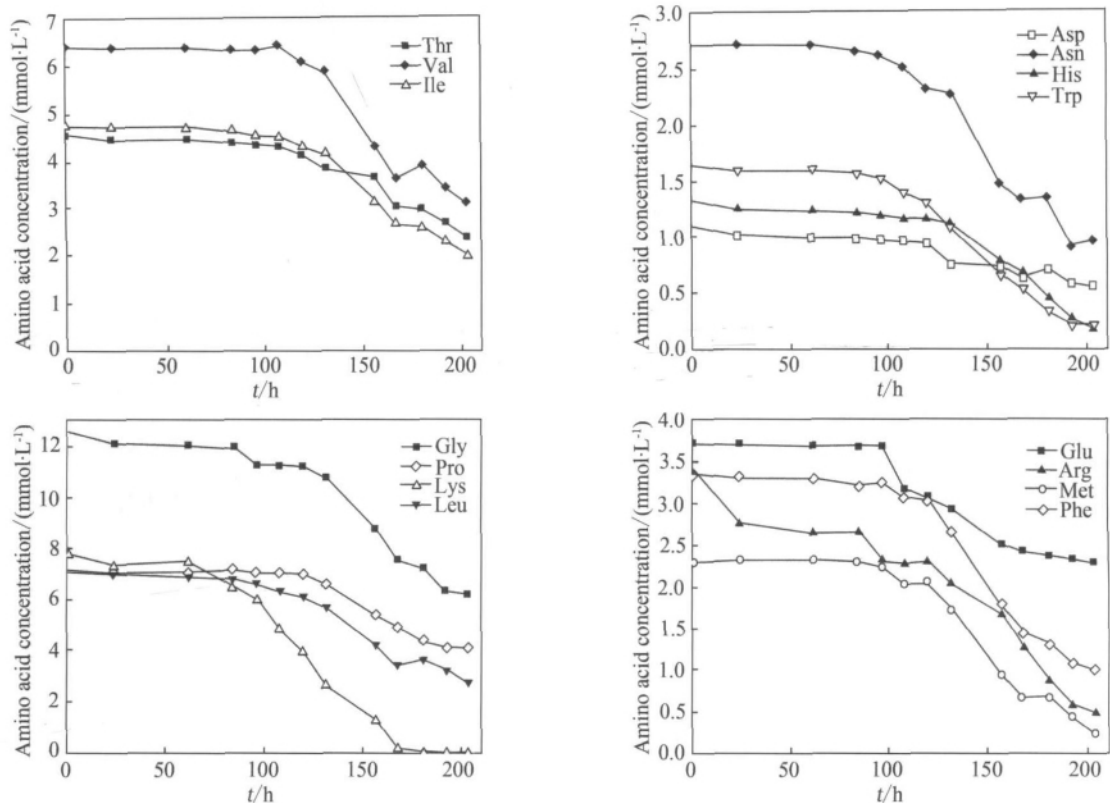


图 2 SIH 培养基培养过程中盘基网柄菌细胞对各氨基酸的利用情况

Fig. 2 Profiles of amino acids consumed by *D. discoideum* cells cultivated in SIH medium

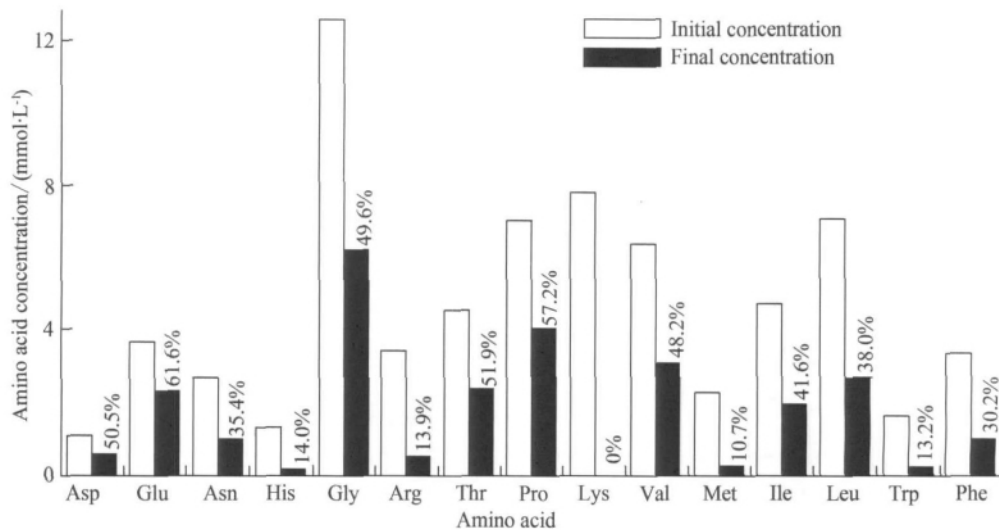


图 3 盘基网柄菌发酵液中氨基酸含量的首尾对比

Fig. 3 Initial and final concentration of amino acids in fermentation broth of *D. discoideum*

现性好, 衍生条件简便; Cys 在培养液中不以游离态存在, 可能是 Cys 的巯基被培养基中 Fe³⁺ 氧化而以络合物形式存在, 可通过单因素实验确定盘基网柄菌生长对 Cys 的需求。

培养液氨基酸分析显示 Lys、Met、Trp、Arg、His 较易被盘基网柄菌利用, 可对这 5 种氨基酸的添加量做进一步的研究, 设计适合盘基网柄菌高密度生长所

需的培养基配方。

参考文献:

[1] Glenn D, Williams K L. *Dictyostelium discoideum*: its future in biotechnology[J]. Austr J Biotech, 1988, 1(4): 46-51.
 [2] 吴小霞, 卢英华, 李清彪, 等. 利用盘基网柄菌表达可溶性

- 人 Fas 配体[J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 380-384.
- [3] Arya R, Aslam S, Gupta S, et al. Production and characterization of pharmacologically active recombinant human phosphodiesterase 4B in *Dictyostelium discoideum* [J]. Biotechnol J, 2008, 3(7): 938-947.
- [4] Sussmann R R, Sussmann M. Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1967, 29(1): 53-55.
- [5] Watta D J, Ashworth J M. Growth of myxamoebae of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* in axenic culture[J]. Biochem J, 1970, 119(2): 171-174.
- [6] 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.
- [7] Marin F T. Regulation of development in *Dictyostelium discoideum*; I. initiation of the growth to development transition by amino acid starvation[J]. Dev Biol, 1976, 48(1): 110-117.
- [8] Frank J, Kessin R. A defined minimal medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74(5): 2157-2161.
- [9] 陈杰, 徐志南, 卢英华, 等. 新型重组糖蛋白表达载体——盘基网柄菌[J]. 工业微生物, 2006, 36(4): 50-55.
- [10] Han S I, Friehs K, Flaschel E. Improvement of a synthetic medium for *Dictyostelium discoideum* [J]. Process Biochem, 2004, 39(8): 925-930.
- [11] 蒋新宇, 周春山. 氨基酸的柱前衍生高效液相色谱分析述评[J]. 湖南化工, 1999, 29(2): 9-11.
- [12] Lu Y H, Beshay U, Friehs K, et al. Mass production of *Dictyostelium discoideum* in homogeneous and heterogeneous cultivation systems[J]. Process Biochem, 2004, 39(12): 1859-1870.
- [13] 王颖. 重组盘基网柄菌高密度发酵合成培养基的优化研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [14] 朱影恬, 曾雯瑜, 张中伟, 等. 柱前衍生高效液相色谱测定小儿复方氨基酸注射液中氨基酸[J]. 分析科学学报, 2009, 25(6): 685-688.
- [15] Gheshlaghi R, Scharer J M, Moo Young M, et al. Application of statistical design for the optimization of amino acid separation by reverse-phase HPLC [J]. Anal Biochem, 2008, 383(1): 93-102.
- [16] 聂小春, 程岚, 付丽娟, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定复方氨基酸制剂的应用研究[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(5): 295-298.

Analysis of Amino Acid Consumption During the Cultivation of *Dictyostelium discoideum* by Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography

HUANG Xiao-hong¹, WANG Ying², YE Mei-ling², LUO Zhen²,
SONG Juan³, LING Xue-ping^{2*}

(1. Medical College of Xiamen University, 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Jilin Huakang Pharmaceutical Co., Ltd., Dunhua 133700, China)

Abstract: In order to observe amino acid consumption during cultivation of *Dictyostelium discoideum* on synthetic SIH medium, a method for determination of amino acids by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with 2,4-dinitrochlorobenzene derivatization was investigated. 16 amino acids could be well separated in 60 min, and a good linear relationship between peak area and concentration of amino acids was established with the correlation coefficients in the range of 0.992-0.999. Analysis results of samples of *D. discoideum* on SIH medium indicated that lysine was completely consumed after 7 d of cultivation. Methionine, tryptophan, arginine and histidine were also utilized considerably while aspartic acid, glutamic acid, glycine, threonine, proline and valine did not show significant demand during the cell growth. This metabolic characteristic would supply reliable data to design a more reasonable synthetic medium for *D. discoideum*.

Key words: *Dictyostelium discoideum*; reversed-phase high performance liquid chromatography; amino acid; 2,4-dinitrochlorobenzene