

细胞生长测定方法与研究进展*

郝冬霞 刘本发 吴兆亮**

(河北工业大学生物工程系 天津 300130)

摘要: 准确、迅速和在线测量细胞培养过程中培养液的细胞量是深入研究细胞代谢控制的基础, 无论是对科学研究, 还是对工业化生产都有重要的意义。在简要阐述细胞生长不同测定方法的基础上, 系统综述和评价了细胞测定方法的研究进展, 提出了细胞测定方法进一步研究的几点建议。

关键词: 细胞生长, 生物量, 细胞浓度, 测定方法

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0082-04

在细胞培养过程中, 细胞生长和产物合成的关系无论是相关型、非相关型还是部分相关型, 细胞生长的控制都是重要的环节^[1]。因此选择和研究培养液中生物量(或细胞浓度)的测定方法是及时确定细胞培养过程中细胞生长变化规律和深入研究细胞代谢调控的基础。

虽然有许多方法可用来测定细胞生长, 但由于在培养过程中, 一方面细胞的生理和生化特性极其复杂; 另一方面生物环境具有多变性, 使得在测定过程中还存在许多问题, 至于在线测量, 至今没有开发出合适的方法及传感器用于测定^[1]。为了促进细胞生长测定方法的研究, 本文在系统简要综述和评价这些方法的基础上, 介绍了细胞生长测定方法研究进展, 并就进一步的研究方向提出几点建议。

1 细胞生长测定方法

细胞的群体生长通常以两种方式进行, 个体生长和个体繁殖, 前者是细胞质量和组成的变化, 后者是细胞数目的增加。其数量变化集中反映了细胞的生理生化特性, 是细胞内外各种环境因素综合作用的结果。在已开发出的测试手段中, 从测试对象上可分为对生物量的测量和对繁殖数的测量。

1.1 测生物量 个体生长即原生质的增加, 我们将其定义为生物量, 通常以湿细胞和干细胞的重量浓度表示, 简称为细胞的湿重和干重, 单位为 g/L。

1.1.1 直接法: 用离心法或过滤法直接测定细胞重量, 具体操作如下: (1) 离心法: 将试样离心洗涤 1~5 次后干燥称重, 可选用的干燥方法有: 105℃热烘干、红外线烘干和低温(80℃或 40℃)真空干燥; (2) 过滤法: 过滤时大直径细胞如丝状真菌选用滤纸, 小细胞选用醋酸纤维膜等滤膜, 然后干燥称重^[1]。

直接法是目前最常用的方法^[3~7], 是其它间接法标定的基础。其原理和操作虽然简单, 但是要离线测量耗费时间长, 并且当培养液中含有其它固体组分时, 离心和过滤都无法将细胞单独分离出来, 直接法就不再适用。

* 河北省教委博士基金和河北省自然科学基金资助项目 (No. 201010)

** 通讯联系人

收稿日期: 2000-11-02, 修回日期: 2001-01-21

1.1.2 电导率法:研究发现,细胞生长与培养液电导率呈相反的镜像关系^[8]。当细胞干重逐渐增加时,电导率随之相应降低。Hahlrock^[9]等发现电导率的降低主要是因为培养液中硝酸盐的吸收,Taya 等^[10]认为培养液 pH 值的变化(4.5~7.0)以及糖浓度的变化(0~1%)对电导率影响甚微,因此,当培养基组分确定时,可以由细胞干重和电导率之间的关联式求出细胞的生物量。该法已经在一些植物细胞培养中得到应用^[11,12]。

该法测量时,只需将电导电极插入反应器中,通过纪录曲线,随时监测细胞生长情况,快速简便,无需离线取样,因此,特别适于大规模培养的在线测量。但本文作者在小单孢丝状菌发酵过程中还没有得出确切的细胞干重和电导率之间的关系。因此这种方法是否对其它细胞具普遍适用性,仍有待研究。

1.1.3 动力学估算法:通过建立菌体生长动力学的数学表达式,揭示细胞的生长规律。该数学表达式可以选用 MONOD 方程或逻辑定律中的模型参数进行修正,来拟合特定环境中菌体的生长和代谢,其不足之处在于:工艺条件、操作方式的变化会影响参数的稳定性,而这些变化又难以定量表示。因此,施源等人^[13]根据物质守恒和化学热力学原理建立菌体代谢的化学计量方程矩阵,进行线性变换,找出独立变量,令菌体生长量的变化直接反映在这些变量中,同时采用增广 KALMAN 滤波,可以有效的消除操作条件的干扰。在菌浓度无法用一般方法测量的情况下,如抗生素工业生产中培养液含不溶固体无法直接测定菌浓度,而独立变量如糖利用率、氧消耗速率等较易测量时,该法具有一定优越性,但将单变量转换成多变量的测量,使设备要求提高,操作过程复杂化,误差易被放大,因此尚未得到推广。

1.1.4 粘度法:大部分培养液的液相粘度很低,悬浮细胞就成为构成粘度的主要因素。当粘度与细胞浓度的关联式明确时,可以通过测量培养液粘度来确定细胞浓度。培养液为牛顿流型时,可由 Einstein 公式计算^[14]: $\mu_s = \mu_L (1 + vvc + \kappa v^2 c^2 + \dots)$ 其中 μ_s 为培养液粘度, μ_L 为培养液中纯液相粘度, v , κ 为一次项、二次项 Einstein 因子, v 为偏比体积, c 为细胞浓度。 v 、 κ 由细胞形状决定。细胞呈球状或近似球状时, $v = 2.5$, $\kappa = 7.35$; 细胞呈长圆形或扁圆形时, v 是其轴比函数。若细胞浓度极低(溶液浓度条件小于 10 体积%),可忽略二次及以上的高次项。培养液为非牛顿流型时,以往的研究发现,非牛顿的丝状或球状微生物悬浮液的表现粘度 μ 与细胞浓度有如下关系: $\mu \propto c^m$ 。研究已发现霉菌菌丝体悬浮液的表现粘度基本与菌丝体浓度的平方成正比。粘度法具有很多优越性,首先测量对细胞理化性质没有特殊要求,具有普遍适用性,其次不需要价格昂贵的特殊药品(如荧光染色剂)辅助测量,第三,所需设备简单,容易实现在线测量。但是迄今为止,国内外多停留于流变特性及其影响因素的研究上,以粘度反映细胞生长情况的研究尚未报导。

1.2 测繁殖数 对于单细胞状态的生物可用繁殖数,即细胞计数进行测定,用细胞密度 cells/mL 表征。

1.2.1 血球计数法:也称显微镜直接计数法,将适当稀释过的细胞悬浮液放在血球计数板载玻片与盖玻片之间的计数室中,显微镜下计数,计数室容积一定,因此观察到的细胞数目可以换算成单位体积内的细胞总数目。该法测得的是活细胞与死细胞的总和,所以又称为总菌计数法。此法的优点是直观、快速,因此是目前常用的方法^[15,16]。在测定过程中,需根据菌液不同调节稀释度,并且要严格清洗计数板,直至镜检合格为

止。显然,若悬浮液中除细胞外还含有其它沉淀物,则会对计数造成较大偏差。为使测量更加准确,可以在悬浮液中加入一些染色剂,以避免一定干扰,如选用含 0.1% 结晶紫的 0.1mol/L 柠檬酸溶液染色,在显微镜下计数被染成深紫色的细胞核。此外选用台盼蓝染色液,可使死细胞染为蓝色,活细胞不被染色,可同时测出活菌数^[17,18]。

在此基础上开发的快速方法有吖啶橙染色直接计数法(AODO法),吖啶橙是一种专一性荧光染料,可以与细胞中的核酸物质特异结合。试样经聚碳酸酯膜过滤后,染色,在落射光荧光显微镜下观察计数,活细胞呈橙色荧光,死细胞呈绿色荧光。该法适于细胞体积微小数目较少的测量环境,因此多用于水生细菌的计数。

另外,有些藻类细胞具有鞭毛,其游动性给计数带来不便,可加 3% 甲醛溶液固定。

1.2.2 平板菌落计数法:将一定体积的菌液与固体培养基在凝固前混合或涂布于凝固后的培养基平板上,培养一段时间,即可从平板上数出菌落数,因此也称为活菌计数法。

该法是测定活细胞的标准方法,是其它测量方法标定的基础,但这种方法操作和取得数据均颇费时间并且常受各种因素的影响。文献报道已经研究出一些方法来提高效率。如皿膜系统^[19],皿膜系统采用含脱水营养基质膜,液态样品(1mL)直接接种到薄膜上,经适宜条件下培养后计数,即用膜系统将样品注入盛有液体培养基的试样中,混匀后倒入装有胶质的特殊培养皿中,培养后计菌落数。

1.2.3 比浊法:细胞是不透光的,光束通过细胞悬浮液,由于散射或被吸收而降低透过率,因此悬浮液细胞密度同光密度 OD 成正比,同透光率成反比。测量前,将样品适当稀释或加酸处理,在 450~660nm 处测光密度。有时直接以 OD 值代替细胞密度,有时需预先用已知密度的悬浮液测出吸光度——细胞密度的标准曲线,再根据所测 OD,从标准曲线上查出细胞密度值。比浊法也是目前常用的方法^[12]。

该法可用于在线测量,但应用中存在如下问题,高密度时,散射增强,OD 值与细胞量呈非线性关系;菌体易附着于传感器壁;色素对测量有干扰作用;要求培养液不含固形营养成分,否则将造成正偏差。

1.2.4 微量量热法:细胞在代谢过程中会伴随一定的热效应,设细胞总发热功率与细胞数目成正比,用微量量热计连续测定代谢过程中的热量变化,得到热谱曲线^[13],即可反映出细胞生长的变化。该法假设细胞在营养供应充足、环境完全满足需要、无代谢产物抑制的情况下生长,而实际上热谱曲线是在恒容恒温、营养有限、存在产物抑制时测出的,如何修正这些误差,有待进一步研究。

1.2.5 生物电极法:以生物电极与细胞之间的电子传递为原理测定细胞密度。Matsunaga^[14]等人曾开发过非染料耦合微生物电极燃料电池型微生物电极,因直接进行电子传递的能力较弱,其检测范围仅局限在 $10^7 \sim 10^9$ cell/mL 之间,以吩嗪为电子传递媒介,检测低限为 10^6 cell/mL^[15],杨茂余等^[16]研制出以硫堇为媒介的燃料电池型微生物电极,将检测低限降至 10^5 cell/mL,其基本原理是硫堇在厌氧条件下被微生物还原,还原态在阳极上氧化,造成电流的上升速率与微生物的密度成正比。显然该法仅适于能还原硫堇的微生物。由此可见,电极法对测量对象的种类有严格要求,并且染料浓度、温度、微生物的活性等都会对测量造成一定的误差。

1.2.6 荧光法:活细胞中普遍存在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的还原形式 NADH,该物质具

有荧光性质,在吸收某种波长光后,可激发另一种波长的光,在细胞生长的一定时期内,NADH的产生量是固定的,因此,利用荧光探测就可测出细胞密度^[1]。该法可实现在线测量,其装置以低压水银蒸气灯为光源,经一滤波片,用光导纤维将光速引入发酵罐,并用一光学装置确保最佳辐射条件,产生的荧光被光导纤维捕获后,经滤光片由监测器得相应的峰最大值,测量信号被处理后所显示的毫伏数既表明细胞密度的相对值。

这种方法选择性较好,灵敏度高于比浊法,但荧光效应常受到温度和pH值的影响,而且低溶氧会造成NADH的积累,碳源限制又会使NADH消耗殆尽。因此,需要严格控制培养条件。

2 研究方向

2.1 测量方法的定量化和精确化 前文提及的间接方法如粘度法、电导率等都是相对表示细胞生长规律,并没有直接定量测出细胞浓度或密度,目前定量化的方法有两种,一是测出标准曲线,二是用数学公式拟和,两种方法都存在培养环境的显著影响。因此如何精确定量,有待研究。

2.2 在线测量及传感器开发 由于多变性和复杂性是细胞培养自身的特点,因此细胞培养过程往往较化工过程的自动化水平低,这常造成其生产不稳定,效率低,大规模生产困难。因此将细胞测试手段在线化就显得格外重要,今后的研究应着眼于开发合适的在线测量方法和传感器,把与细胞浓度有较好相关性的参数由非电量转化为电信号,直接送入电子计算机进行分析处理,为实现计算机控制奠定基础。

2.3 细胞生长与其它生理生化特性参数的关系 工业生产中,能做到在线测量的参数很少,许多生理生化特性参数仍然需要离线取样,如果能找到细胞生长与这些重要参数之间的相互关系,通过细胞浓度或密度的在线测量,反映其它参数变化规律,不仅有助于操作条件的优化,而且有助于生化过程的放大与设计。

参 考 文 献

- [1] 周德庆. 微生物教程. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- [2] Xavier A M R B, Goncalves L M D, Moreira J L, *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1995, **45**: 320~327.
- [3] 鲍时翔, 朱法科, 林伟铁, 等. *化工学报*, 1997, **48** (3): 300~303.
- [4] 郑美英, 堵国成, 陈 坚, 等. *生物工程学报*, 2000, **16** (6): 756~762.
- [5] Haijaj H, Balnc P, Groussal E, *et al.* *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **27** (8): 619~625.
- [6] Suidan Van J C, Metz B. *Biotechnol Bioeng*, 1981, **23**: 111~148.
- [7] 余 斐, 张 姝, 刘 凌, 等. *华中理工大学学报*, 2000, **28** (10): 108~112.
- [8] 施 源, 李友荣, 陈敏恒, 等. *生物工程学报*, 1986, **2** (4): 61~66.
- [9] 程传雄. *生物物理化学*. 北京: 科学技术文献出版社, 1998.
- [10] 谢东明, 刘德华, 张 岩, 等. *生物工程学报*, 2000, **16** (3): 384~386.
- [11] 叶子坚, 姚善经. *微生物学报*, 2000, **40** (5): 507~512.
- [12] 赵 佼, 戴 琥, 谭文松. *生物工程学报*, 2000, **16** (6): 755~758.
- [13] Ginn R, Barnee B A. *Anal Chem*, 1986, **66**: 527~571.
- [14] Pettipher G L, Rodrigues. *J. Appl Environ Microbiol*, 1980, **39**: 423~429.
- [15] Turner A P F, Ramsay G, Higgins I J. *Biochem. Soc Trans*, 1983, **11**: 445~448.
- [16] 杨茂余, 杨 璋. *生物工程学报*, 1988, **4** (3): 199~205.