

应用流式细胞术检测毕赤酵母的细胞活性

肖安凤 周祥山 周 利 张元兴*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘要: 选取两种细胞活性染色试剂二乙酸荧光素 (fluorescein diacetate, FDA) 和碘化丙锭 (propidium iodide, PI), 应用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测毕赤酵母细胞活性。比较 FDA/PI 双染色与 PI 单染色的 FCM 图谱, 后者能够很好地将死活细胞区分开来并得到正确的比例。利用 PI 单染色检测发酵过程细胞活性的变化, 甘油补料阶段几乎没有细胞死亡, 进入甲醇补料阶段后, 随着细胞密度的增加, 细胞的活性不断降低, 发酵 88 h 时细胞活性仅为 73.8%。

关键词: 流式细胞术, 检测, 毕赤酵母, 细胞活性

中图分类号: Q2-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0022-05

Application of Flow Cytometry in Viability Detection of *Pichia pastoris* Cells

XIAO An-Feng ZHOU Xiang-Shan ZHOU Li ZHANG Yuan-Xing*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract: Cell viability of *Pichia pastoris* was detected by flow cytometry (FCM) with two reagents fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI). Compared with FDA/PI double-stained dot plots and PI single-stained dot plots, the latter could divide dead and living cells into two separate zones, and get the correct proportion. Then PI single-stained method was used to detect the change of cell viability in *Pichia pastoris* fermentation. At glycerol batch and fed-batch phase, little dead cells were detected. At methanol fed-batch phase, cell viability decreased when cell weight increased, and was only 73.8% at 88 h.

Key words: Flow cytometry, Detection, *Pichia pastoris*, Cell viability

毕赤酵母作为一种优秀的真核表达系统, 得到了广泛的应用^[1]。然而, 温度、pH、饥饿等多种压力因素会使酵母细胞的活性降低甚至自溶^[2], 影响外源蛋白的产量, 因此, 建立简便、快速的细胞活性检测方法对毕赤酵母发酵生产具有实际意义。

目前检测酵母细胞活性的常规方法有菌落计数法^[3]、美蓝染色法^[4]、比氧消耗速率检测法^[5]等, 这些方法均具有操作复杂、检测灵敏度差和耗时等缺点。近年来, 流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 作为一种有效的且有价值的方法常常用来替代常规方法检测微生物活性^[6]。流式细胞仪可以一次性检测细胞群体中的几千个细胞, 使研究人员建立个体细胞在群体中的多维表象, 自动化程度高, 每次检测能获得非常大的信息量。流式细胞技术在动物细胞的周期分析中得到了大量的应用, 然而, 该技术在毕赤酵母细胞检测方面的报道还比较少, 处于研究阶段。

本文选取了 FDA 和 PI 两种荧光染料, 利用流式细胞仪检测酵母的细胞活性, 将其与美蓝染色法进行比较, 最后利用流式细胞仪对毕赤酵母发酵过程的细胞活性进行检测。

* 通讯作者 Tel: 021-64253025, E-mail: yxzhang@ecust.edu.cn

收稿日期: 2006-01-15, 修回日期: 2006-03-22

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

表达重组水蛭素 (rHV2-Lys47) 的毕赤酵母基因工程菌^[7], 由山东东阿阿胶股份有限公司提供。种子培养基、发酵培养基和补料培养基见文献[7]。

1.2 仪器与试剂

FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

碘化丙锭 (PI) 溶液: 1 mg PI 溶于 1 mL 去离子水中, 4℃ 避光保存。

二乙酸荧光素 (FDA) 溶液: 5 mg FDA 溶于 1 mL 丙酮中, 4℃ 避光保存。

美蓝染色液: 美蓝 0.1 g/L, 柠檬酸钠 20 g/L。

1.3 细胞培养

种子培养: 2 L 三角瓶中装入 500 mL 种子培养基, 1×10^5 Pa 湿热灭菌 30 min, 接入单菌落, 30℃、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 6.0。

5 L 罐发酵: 发酵罐内装入 3 L 发酵培养基, 1×10^5 Pa 湿热灭菌 30 min, 再加入 4.4 mL/L PTM1, 1: 10 接种, 28℃, 溶解氧 >40% 培养 22 h, 然后以补料培养基限制性补料至菌体湿重 200 g/L, 再以甲醇为唯一碳源进行限制性流加培养^[8]。

1.4 样品采集

取酵母培养液, 13, 200 × g 离心 10 min, 沉淀重悬于同体积 PBS 溶液中, 20 kHz 超声 10 s 以获得单细胞, 然后用 PBS 溶液将其稀释为 1×10^7 cells/mL 的细胞悬液。

1.5 细胞染色

PI/FDA 双染色: 取上述悬液 1 mL, 加 2 μL FDA 和 5 μL PI, 避光反应 5 min。

PI 单染色: 添加 5 μL PI 于 1 mL 细胞悬液中, 避光反应 5 min。

1.6 FCM 检测

将染色好的样品放入流式细胞仪, 通过 530/30 nm 和 660/16 nm 带通滤片 (FL1 和 FL3) 检测荧光强度信号, 分别以 FL1-H 和 FL3-H 表示, 检测 1×10^4 个细胞, 得到 FCM 图谱。

2 结果与讨论

2.1 FDA/PI 双染色

二乙酸荧光素 (FDA) 能够进入酵母细胞, 但本身无荧光。在细胞的非特异性脂酶的催化下, FDA 生成荧光素, 后者经 480 nm 激光激发出波长 530 nm 左右的绿色荧光。死细胞的细胞膜不完整, 生成的荧光素很快扩散出细胞, 不能检测到带有绿色荧光的细胞^[9]。

碘化丙锭 (PI) 不能进入具有完整细胞膜的活细胞, 当酵母细胞死亡或细胞膜不完整时, PI 进入细胞, 与 DNA 相结合, 在 488 nm 的激光激发下, 在波长 660 nm 左右检测到红色荧光^[9]。因此, 通过 FDA/PI 双染色的方法, 利用死活细胞在经染色后会发出不同波长的荧光的特点, 即活细胞可检测到 FDA 产生的荧光信号, 而无 PI 产生的荧光信号, 死细胞则相反, 这样就可以将死活细胞区分开来。

选取发酵 20 h 的细胞样品做对照实验, 此时的细胞颗粒均匀, 不成团, 基本上没有死亡细胞存在。将细胞用 10% 醋酸处理 10 min, 得到死细胞, 按预处理方法得到死

细胞悬液。与相同浓度的活细胞悬液以不同比例混合，加入 FDA 和 PI，进行 FCM 检测，得到 FDA/PI 双染色图谱（图 1）。

为了区分死活细胞，在图谱设定一个特定的“十字门”。活细胞的双染色图谱有 99.02% 落在左上区（图 1A），死细胞 99.26% 落在右下区（图 1B），因此，通过“门”的设置，定义为落在左上区的细胞为活细胞，落在右下区的细胞为死细胞。当死活细胞以 1:1 混合时，细胞也清楚地集中在左上和右下两个区域，其它区域基本没有细胞存在（图 1C），然而，图中显示有 80.40% 的细胞位于左上区，右下区的细胞含量只有 17.80%，并不是 1:1 的关系。因此，用 FDA/PI 双染色测定毕赤酵母的细胞活性，无法得到准确的结果。

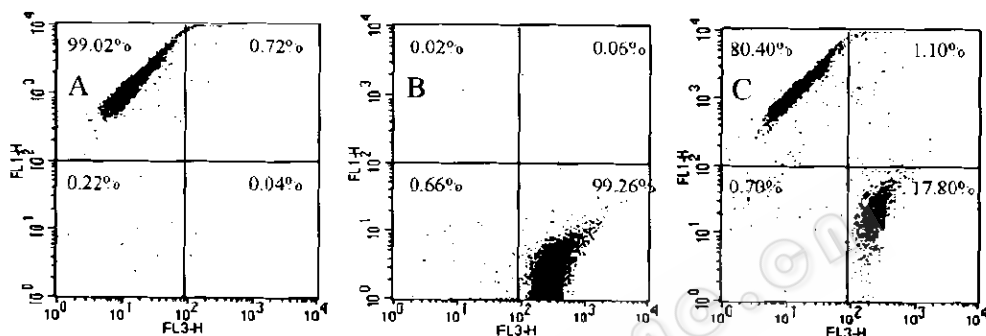


图 1 毕赤酵母细胞的 FDA/PI 双染色图谱

横坐标 FL1-H 表示 FDA 染色强度，纵坐标 FL3-H 表示 PI 染色强度

A 100% 活细胞 (100% living cells), B 0% 活细胞 (0% living cells), C 50% 活细胞 (50% living cells)

2.2 PI 单染色

由于酵母自身在激光激发下，能发出较弱的自发荧光，自发荧光波长在 530 nm 左右，因此，可以考虑用 PI 单染色的方法，被 PI 染色的死细胞在 660 nm 附近发出很强的红色荧光，而没有染色的活细胞只检测到较弱的自发荧光，通过在 FCM 图谱上比较荧光强度的差异，就可以将活细胞与死细胞区分开来。取发酵 20 h 的细胞样品制得细胞悬液，进行 PI 单染色，得到以下 FCM 图谱（图 2）。

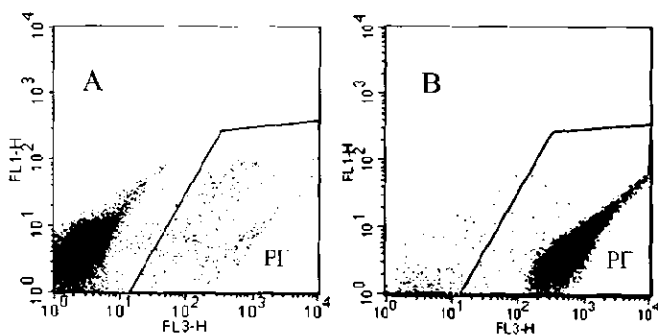


图 2 活细胞 (A) 与酸处理死细胞 (B) 的活性染色图谱 (PI⁺ 表示被 PI 染色的死细胞)

横坐标 FL3-H 表示 PI 染色强度，纵坐标 FL1-H 表示细胞自发荧光强度

根据死细胞和活细胞所处的位置，设定合适的“门”，将其分成活性区与非活性区。将死活细胞按不同比例进行混合，PI 单染色检测，得到相应的 FCM 图谱（图 3）。

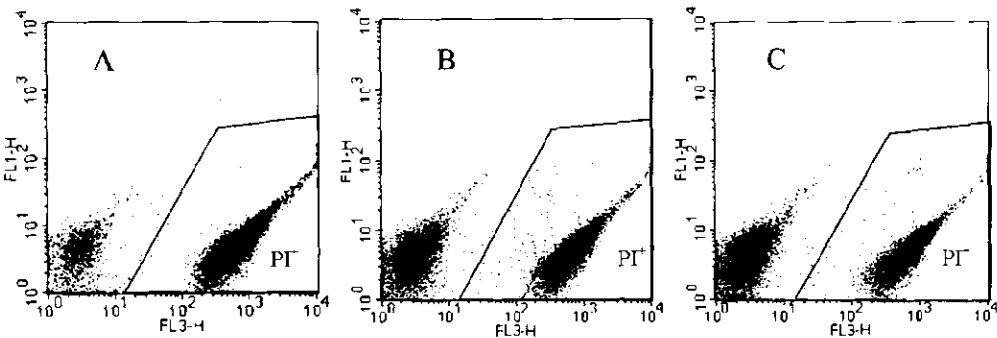


图 3 活细胞和死细胞按不同比例混合得到的活性染色图谱
横坐标 FL3-H 表示 PI 染色强度, 纵坐标 FL1-H 表示细胞自发荧光强度
A 13.3% 活细胞, B 50.0% 活细胞, C 66.7% 活细胞

同时, 采用美蓝染色法^[4]检测上述不同混合比例的酵母细胞的活性, 与图 2, 3 所得到的 PI 单染色结果一起进行比较 (表 1)。两种方法所得到的细胞活性与活细胞混合比率基本吻合。而且, PI 单染色结果的误差比美蓝染色结果的误差低一个数量级, 表明 PI 单染色方法具有更高的精确度, 适宜检测发酵过程的酵母细胞活性。

表 1 PI 单染色和美蓝染色法检测细胞活性的结果 (%)

混合细胞中活细胞含量	细胞活性	
	美蓝染色法	PI 单染色法
100	99.3 ± 0.7	97.30 ± 0.01
66.7	69.6 ± 2.8	60.80 ± 0.15
50.0	54.1 ± 2.9	45.16 ± 0.10
13.3	17.6 ± 1.2	14.04 ± 0.08
0	0	2.95 ± 0.04

2.3 酵母发酵过程的活性变化

在确定了 PI 单染色检测细胞活性的方法后, 将其应用于毕赤酵母发酵过程的活性检测上。图 4A ~ C 是不同发酵时间样品的 FCM 图谱。在发酵 24 h 时, 酵母的活性基本上为 100%, 没有死亡细胞存在, 这时的发酵环境有利于酵母的生长。发酵 55 h 时,

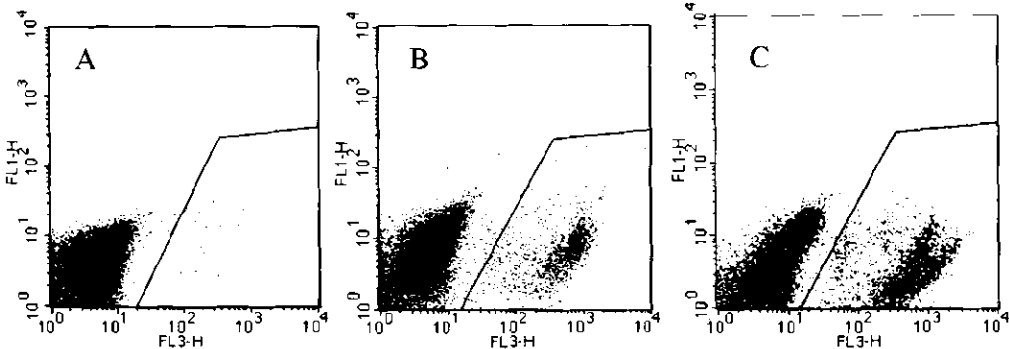


图 4 发酵过程毕赤酵母细胞活性染色图谱 (PI+ 代表被染色的死细胞)
横坐标 FL3-H 表示 PI 染色强度, 纵坐标 FL1-H 表示细胞自发荧光强度
A 24 h 样品, B 55 h 样品, C 88 h 样品

有 12.2% 的细胞被 PI 染色, 表明这部分细胞失去活性。到 88 h 时, 细胞的活性只剩下 73.8%, 大量细胞死亡。

发酵过程菌体浓度与细胞活性变化曲线见图 5。当酵母利用甘油进行分批和补料培养时, 其细胞活性都比较高, 而且甘油补料阶段的活性最高, 几乎没有死细胞存在, 这个时期细胞的生长状况良好。当发酵使用的碳源改为甲醇时, 酵母的细胞活性就开始呈现下降的趋势, 这说明酵母虽然能够利用甲醇作为碳源, 但甲醇以及其代谢产生的副产物对细胞的结构有损伤作用, 使得细胞的活性损失。

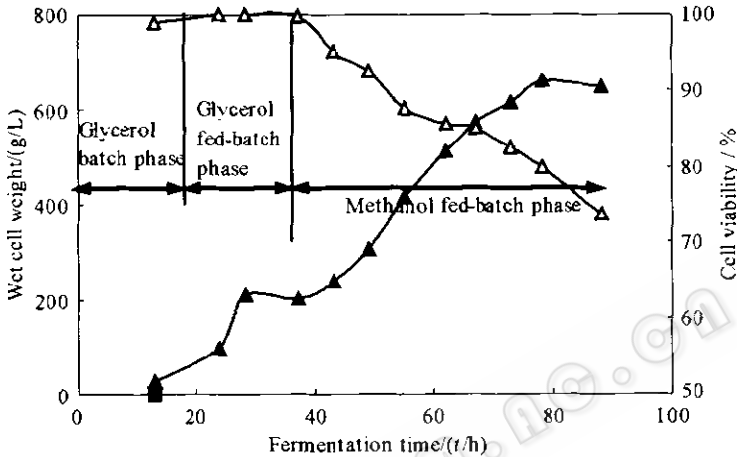


图 5 毕赤酵母发酵过程细胞生长 (▲) 和活性 (△) 曲线

3 结论

利用流式细胞仪, 采用 FDA/PI 双染色和 PI 单染色两种活性染色方法进行毕赤酵母细胞的活性检测。通过设定特定的“门”, 采用 PI 单染色的方法能够将死活细胞在 FCM 图谱上清楚地区分开来, 并且能够正确地反映其比例关系, 很好地满足检测毕赤酵母细胞活性的需要。利用 PI 单染色法对毕赤酵母高密度发酵过程的细胞活性进行检测, 甘油补料阶段的酵母细胞的活性接近 100%。当酵母以甲醇作为碳源后, 随着发酵的进行, 细胞活性持续下降, 发酵 88 h 的细胞活性仅有 73.8%。

参考文献

- [1] Cereghino J L, Cregg J M. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**: 45 ~ 66.
- [2] Sinha J, Plantz B A, Inan M, *et al*. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **89** (1): 102 ~ 112.
- [3] Jones R P. *Process Biochem*, 1987, **22**: 118 ~ 128.
- [4] Martinez de Maran I, Chaudanson N, Joly N, *et al*. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **65** (2): 176 ~ 181.
- [5] O'Riordan T C, Buckley D, Ogurtsov V, *et al*. *Anal Biochem*, 2000, **278**: 221 ~ 227.
- [6] Davey H M. *Methods Cell Sci*, 2002, **24**: 91 ~ 97.
- [7] Zhou X S, Zhang Y X. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**: 1449 ~ 1453.
- [8] 杨继忠, 周祥山, 解锡军, 等. *微生物学通报*, 2004, **31** (5): 24 ~ 27.
- [9] Prudêncio C, Filipe S, Côrte-Real M. *Cytometry*, 1998, **31**: 307 ~ 313.