

微囊形成的理化条件和影响因素

宁国伯 郭明珠

(第二军医大学369研究室, 上海)

目前国内外研制的杂交瘤细胞繁多, 但单抗仍然供不应求, 以致影响到它的深入研究和广泛应用。因此, 解决大量生产单抗的技术途径是细胞工程的重要环节之一。国内外一些机构十分重视, 开展了多种研究途径^[1-5], 其中以微包裹技术(以下简称微囊)效果较好, 产量高, 成本低。有关技术途径, 美国Damon Biotech公司有专利。目前国内未见报告, 我们根据Lim^[6]微包裹细胞的专利介绍和M. F. A. Goosen^[7]的人工细胞膜工艺, 制备微囊。经研究表明, 在一系列反应中, 涉及到一些重要的理化条件和影响因素。微囊能否形成, 微囊强度及其渗透性如何, 在很大程度上取决于这些条件和因素。现将有关研究简报报告如下。

材料和方法

(一) 主要试剂和器材

海藻酸钠(国产); 聚-L-赖氨酸(PLL), 分子量40000—65000(SIGMA); 环己胺磺酸(CHES, 上海东风试剂厂); Dower 1×2阴离子交换树脂(SIGMA), 苯酚等常规试剂, 均是分析纯。

主要器材有细胞成囊装置XN₃型毛细管粘度计等。

(二) 方法

1. 微囊形成方法: 采用Lim^[6]和Goosen^[7]的方法。

2. 海藻酸钠M/G的测定方法: 参考文献[8]。

3. 海藻酸钠粘度测定方法: 海藻酸钠经一定温度处理后, 用毛细管粘度计测定; 有关粘度的测算等方法同常规。

(三) 数据处理

成珠率是指形成海藻酸钙微珠的百分比。在低倍镜观察, 凡圆形、表面光滑而无拖尾的球珠为合格者。

微囊率是指经PLL聚合反应后, 液化成完整空心微珠的百分比。

破损率是指完整空心微囊经处理后, 破损微囊的百分比。

结果与讨论

(一) 海藻酸钠受热温度对粘度的影响

海藻酸钠粘性对温度是敏感的, 但为了固定活细胞以进行培养, 又必须灭菌。为此, 我们用不同温度, 对同一批号的海藻酸钠, 隔水加热10min, 观察温度与粘度的关系。结果表明, 随着加热温度的提高, 海藻酸钠的相对粘度则下降。

表1 海藻酸钠受热温度与粘度的关系

加热温度(℃)	相对粘度
60.0	73.9±0.9
80.0	66.5±0.7
100.0	54.7±3.8
120.0	24.0±2.6

(二) 海藻酸钠受热时间对粘度的影响

把海藻酸钠制备成1.8%的浓度, 在100℃隔水加热不同时间, 测其粘度。从表2可知, 其他条件相同, 只是受热时间不同, 其相对粘度明显不同, 为确保成珠率并达到灭菌的目的, 在以后的实验中, 我们均采用100℃加热10min, 在培养

本文于1987年7月20日收到。

由国家自然科学基金资助。

过程中, 均未发现细菌生长。

表2 海藻酸钠经100℃加热不同时间的粘度与成珠率

受热时间 (min)	相对粘度	成珠率 (%)
5	81.1±10.5	100.0
10	77.0±10.0	100.0
15	67.3±8.8	69.9
20	60.8±7.9	12.8
25	50.2±4.3	1.6
30	48.0±6.4	0.0
35	46.0±6.0	0.0

(三) 不同批号海藻酸钠的成珠情况

鉴于海藻酸钠的胶体性质是它最重要的特性, 但粘度受多种因素影响, 如藻体生长季节、原料产地、贮藏条件、加工方法、纯度和温度、pH等。为此, 我们将5批不同厂家的产品, 配制为1.2%的浓度, 在120℃加热10min(有的批号粘度很高, 经100℃10min, 也难测定), 分别测定粘度, 制成微珠, 进行观察, 其结果表明, 不

表3 不同批次海藻酸钠的相对粘度和成珠率

海藻酸钠批次	相对粘度	成珠率 (%)
1	129.5±2.8	100.0
2	143.8±14.8	100.0
3	51.4±0.43	46.5
4	4.2±0.43	0.0
5	23.5±2.7	0.0

同批号的海藻酸钠, 相对粘度明显不同, 成珠率也相差十分显著。

海藻酸钠是一种单链聚合物, 其特性粘度不同, 其结构也不完全相同。为此, 我们测定了他们的M/G值。

(四) 海藻酸钠的M/G值测定

海藻酸钠是由甘露糖醛酸(M)和古罗糖醛酸(G)聚合而成的多糖, 由聚M块和聚G块嵌合而成。所以, M/G反映海藻酸钠的结构特性。我们对上述4批(除5号外)海藻酸钠的M/G值测定结果说明, G组分含量高, 表明凝胶性强, 相反, 4号胶M/G最大, 表明G组分含量低, 凝胶性差。

(五) 聚合反应时间对微囊强度的影响

海藻酸钙胶与聚赖氨酸的反应是荚膜形成的重要环节之一。它对微囊强度和微囊的通透性有

表4 4种海藻酸钠的M/G值和粘度的关系

海藻酸钠批号	M/G	特性粘度
1	2.67	7.3
2	2.17	8.7
3	3.78	6.5
4	4.46	3.5

重要作用。我们用2.0%的1号水溶液, 经100℃加热10min, 形成临时性荚膜后, 与PLL(分子量65000)反应不同时间后, 液化处理, 观察微囊的破损率。结果表明, 随着聚合反应时间的增长成珠率也相应增高。而且, 经一定处理后, 破损率也相应减少。但即使反应时间延长到30min, 破损率也不降到零。

表5 聚合反应时间对微囊强度的影响

反应时间 (min)	成珠率 (%)	微囊破损率 (%)	
		搅拌20min	1000rpm 10min
1	36.9±5.5	—	—
3	84.7±3.5	55.6	87.9
6	88.1±8.7	43.1	42.6
9	87.6±11.0	28.2	38.6
12	99.9±0.5	13.1	29.6
15	97.0±2.2	15.4	10.8
30	95.5±1.9	10.1	7.2

成珠率(%)和破损率(%)均为3次以上平均数

(六) 聚合反应温度对微囊强度的影响

与不少聚合反应一样, 海藻酸钙与PLL之间的反应, 也要求最佳温度范围。为此, 在一些主要条件, 如海藻酸钠批次, PLL分子量等参数相同的情况下, 使两者在不同温度进行反应, 并观察微囊强度的变化。结果表明, 海藻酸钠与PLL反应的温度, 也是形成良好微囊的重要条件。因此, 我们在室温条件反应6—9min, 获得较好效果。

表6 反应温度对微囊强度的影响

反应温度 (°C)	微囊完整率 (%)		
	离心前	2000rpm 10min	搅拌20min
35	98.5±1.8	81.9±7.8	93.2±6.8
15	94.8±4.6	81.8±13.2	79.6±14.2
10	55.9±30.2	极少	极少

除上述诸因素外, 有文献报告PLL质量和浓度也是形成稳定微囊的重要条件。

(七) 微囊的通透性观测

为了观察微囊对蛋白的通透性,我们把小鼠腹水单抗的粗提物(经50%饱和硫酸铵提取,透析备用),牛血清白蛋白(市售品)和医用胰岛素分别包在微囊中,每毫升海藻酸钠分别含蛋白1.3mg、4mg和胰岛素160u,将8ml海藻酸钠形成的微囊放在30mlPBS中,按规定时间,每次取3mlPBS,测定 A_{280} 值,尔后,再加3mlPBS,以补充到30ml,用不同时间测定的 A_{280} 与时间作图,得图1。结果表明,在24h,单抗样品(粗提物内含一些小分子物质)的A值略有升高,其后,在120h内,不再升高。所有样品,都用ELISA法检测,全为阴性;而对照组为强阳性。

结果指出,免疫球蛋白大分子不能透过微囊膜,相反,牛血清白蛋白和胰岛素中的小分子能通过薄膜,因此,在相应时间内,测到的A值比单抗组高,尤其是在24h,更明显。

在Lim和Goosen等工作的基础上,我们观测了形成微囊的一些理化条件和影响因素,获得较好强度的微囊,微囊经2000rpm离心20min,每天再搅拌12h,连续搅拌12天,碰撞机率达100%(根据囊内物质经离心后搅拌所发生的变化确定),但微囊破损甚少,表明其强度较高。经通透性观察,对单抗有屏障能力,对小分子有通透性。我们的工作表明,海藻酸钠质量和组成成分,PLL的质量和条件,对获得较好的微囊与强度是重要的。

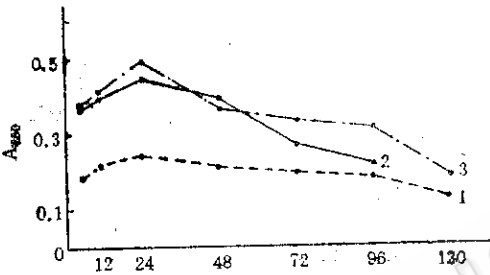


图1 微囊壁通透性观察

1. 单抗粗提物 2. 牛血清白蛋白 3. 人医用胰岛素

参考文献

- [1] Birch, J. R. et al.: *Biochemical. Soc. Trans.*, 13(1):10-12, 1985.
- [2] Celltech公司的内部资料, 1984.
- [3] Tharakan, J. P. et al.: *Biotechnol. 1. Bioeng.*, 28(3):329, 1984.
- [4] *In Vitro*, 21(3 I). (22, 23, 24, 25, 26), 1984.
- [5] 魏林娜: 国外医学(预防、诊断、治疗用生物制品分册)(1):1-4, 1986
- [6] Lim, F. U. S. Patent, 4, 352, 883, 1982
- [7] Goosen, M. F. A. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 27(2):146, 1985.
- [8] 纪明候等: 海洋与湖泊, 12(3):240-247, 1981.

PHYSICAL AND CHEMICAL CONDITIONS AND AFFECTING FACTORS OF MICROENCAPSUL FORMATION

Ning Guobo Guo Minzu

(Department of Radiation Medicine Second Military Medical College, Shanghai)

The strength of the microencapsul is one of the important parameters on large scale production of monoclonal antibody with the microencapsul method. Physical and chemical conditions for microencapsul formation and effecting factors were studied. We got the high microencapsul strength. The microencapsuls were not rupture after centrifuging at 2000rpm for 20 min and agitating 12 hours every day for 12 days. The microencapsul has ability to prevent large moleculs like antibodies passing through it, but not for small moleculs. Our work show that sodium alginate mass and constitute compenent and PLL crosslinked conditions are important for better microencapsul and strength.

Key words

Strength of microencapsul; sodium alginate mass and constitute component, PLL crosslink condition