

细胞培养用“胰蛋白酶”还是“胶原蛋白酶”

谢宏妮 李雪峰*

(华南师范大学生命科学学院 广东广州 510631)

摘 要 主要从胰蛋白酶和胶原蛋白酶的作用特点、使用方法等方面考虑,阐明细胞的传代培养一般只选用胰蛋白酶的原因,为一线教师教学提供参考。
关键词 胰蛋白酶 胶原蛋白酶 原代培养 传代培养
中图分类号 Q-49 **文献标志码** E

2021 年广东省普通高中学业水平选择考适应性测试(生物学)中第 22 题(选修 3: 现代生物科技专题)的第 4 小题的第二个填空,有关贴壁细胞的传代培养常用什么酶进行消化处理一问,超过 30% 的学生填写了“胶原蛋白酶”,与答案不符。

事实上,在人教版高中生物学新旧两版教材《选择性必修 3·生物技术与工程》《选修 3·现代生物科技专题》中,对于细胞培养用“胰蛋白酶”还是“胶原蛋白酶”这一问题均有直接阐述,但没有说明二者区别并辨析相关原因。例如,在《选择性必修 3·生物技术与工程》中,表述为“在进行细胞培养时,首先要对新鲜取材的动物组织等进行处理,或用机械的方法,或用胰蛋白酶、胶原蛋白酶等处理一段时间,将组织分散成单个细胞”“在进行传代培养时,贴壁细胞需要重新用胰蛋白酶等处理,使之分散成单个的细胞”。从学生对相关问题的作答情况来看,他们明显混淆了“胰蛋白酶”和“胶原蛋白酶”的作用特点及情况。这可能是教师与学生教材相关描述的误解所导致。

尽管胰蛋白酶和胶原蛋白酶都是细胞培养中常用于将体积较小的组织块分散成细胞团或单细胞的消化液,但它们的作用机制及适用情况并不相同。下面旨在通过胰蛋白酶和胶原蛋白酶的作用特点、使用方法等,阐明两种酶的区别与细胞培养中的使用情况。

1 胰蛋白酶和胶原蛋白酶的作用特点

1.1 胰蛋白酶的作用特点

胰蛋白酶分离自牛、猪等动物的胰,作用于与赖氨酸或精氨酸相连接的肽链,除去细胞间黏蛋白及

糖蛋白,从而使细胞分离,是应用广泛的消化物,适于消化细胞间质较少的软组织,如胚胎组织、羊膜、上皮组织、肝、肾等软组织以及传代细胞等。胰蛋白酶的消化作用与酶的浓度、pH、温度、组织块的大小以及组织的硬度都有关系。胰蛋白酶浓度过大或消化时间太长,会导致细胞被消化;但反之消化不充分也达不到分散细胞的目的。此外,血清明显抑制胰蛋白酶的活性,Ca²⁺和 Mg²⁺对胰蛋白酶的活性有一定抑制作用。

1.2 胶原蛋白酶的作用特点

胶原蛋白酶是能在一定的 pH 和温度下切割胶原蛋白主体螺旋多肽链的酶类,主要用于水解结缔组织中的胶原蛋白,适于消化纤维性组织、上皮组织以及癌组织等。当拟消化的组织较硬,内含较多的结缔组织或胶原成分时,用胰蛋白酶解离细胞效果较差,可采用胶原酶解离细胞法。钙、镁离子以及血清不会影响胶原酶的消化作用,其消化作用缓和,且无需机械振荡(表 1)。

表 1 胰蛋白酶和胶原蛋白酶生物活性的差别

项目	胰蛋白酶	胶原蛋白酶
消化特性	消化软组织	纤维多的组织
浓度	0.01%~0.5%	0.1~0.3 mg/mL(200 U/mL)
消化时间	0.5~2 h(小块)	1~12 h
pH	8~9	6.5~7.0
作用强度	强烈	缓和
细胞影响	时间过长有影响	无大影响
血清抑活	有	无
Ca ²⁺ 和 Mg ²⁺	有影响	无影响

与胰蛋白酶不同的是许多动物的组织细胞和

*为通讯作者

酶和 ATP 教学中常见问题释疑

祝远超

(湖北省天门市岳口高级中学 湖北天门 431702)

“降低化学反应活化能的酶”和“细胞的能量‘货币’ATP”分别是人教 2019 版教材《必修 1·分子与细胞》中第五章的内容。学生在学习该部分内容时经常遇到各种问题。那么,常见的问题有哪些?又该如何解答呢?

1 pH 影响酶促反应速度的原理

酶促反应介质的 pH 既可影响酶分子的结构,特别是活性部位内必需基团的解离程度和催化基团中质子供体或质子受体所需的离子化状态,也可影响底物和辅酶的解离程度,从而影响酶与底物的结合。只有在特定的 pH 条件下,酶、底物和辅酶的解离状态,最适宜于它们相互结合,并发生催化作用,使酶促反

应速度达到最大值。

2 酶的最适温度和最适 pH 是否是固定值

酶促反应速度最大时的温度或 pH 称为酶的最适温度或最适 pH。酶的最适温度和最适 pH 均不是酶的特征性常数,二者不是固定值。前者与反应所需的时间有关。酶可以在短时间内耐受较高的温度,相反,延长反应时间其最适温度便降低。后者受底物浓度、缓冲液的种类和浓度以及酶的纯度等因素的影响。

3 底物浓度与酶促反应速度的关系

酶促反应速度与底物浓度的关系可用米氏方程表示: $V = V_{\max} [S] / (K_m + [S])$ (其中 $V_{\max}$ 为最大反应速度;

微生物都是它的来源,其中细菌是微生物胶原蛋白的主要来源,已发现 40 多种。目前商业化提供的细菌胶原酶主要根据胶原酶活性的差异,分为 4 种类型:

(1) 胶原酶 I 型: 含有比较均匀的各种酶活力(包括胶原酶、酪蛋白酶、梭菌蛋白酶、胰蛋白酶活性),通常用作上皮细胞、肝、肺、脂肪和肾上腺组织细胞的制备。

(2) 胶原酶 II 型: 含有更高的梭菌蛋白酶活性,通常用于心脏、骨、肌肉、胸腺和软骨等组织来源细胞的制备。

(3) 胶原酶 III 型: 含有较低的蛋白酶活性,常用于乳腺细胞的制备。

(4) 胶原酶 IV 型: 含有低胰酶活性,通常用于胰岛细胞的制备,或者需要维持受体完整性的细胞制备实验。

2 两种蛋白酶在细胞培养中的应用

2.1 原代培养

原代培养是从供体获取组织或细胞进行的首次培养,也叫初代培养。由于取得的组织和细胞刚刚

离体,生物性状尚未发生较大变化,具有二倍体遗传性状,在供体来源充分、条件稳定的情况下(年龄、性别),能在一定程度上反映体内状态。原代培养的组织通常由多种细胞成分组成,较为复杂,即使培养较纯的单一类型的细胞,如上皮或成纤维细胞,也仍然存在着异质性。正因如此,胰蛋白酶和胶原酶均可在原代细胞培养中的酶消化培养法中使用,以便将组织块分散成细胞团或单个细胞,使细胞从培养液中摄取营养和排出代谢产物,从而达到细胞快速长成单层的目的。本法尤适用于培养大量组织,细胞产量高。

2.2 传代培养

当原代培养成功,细胞生长增殖形成单层细胞后,会进一步扩展汇合,占满一切空间。此时,就需要进行分离培养,这一操作即称为传代或再培养。传代培养一般选择细胞生长的对数期进行。对于贴壁生长细胞的传代培养而言,通常采用酶消化法,且一般选用胰蛋白酶。这是因为传代培养的过程其实就是细胞的分离稀释,此时细胞间质较少,且不含较多的结缔组织或胶原成分。