

基于微生物的可控生物制造

史续典, 王刚, 王大明, 余龙江, 杨光

华中科技大学生命科学与技术学院 国家纳米药物工程技术中心, 武汉 430074

摘要: 微生物种类丰富, 尺寸涵盖纳米与微米级, 是天然的可用于纳米、微米及多层次跨尺度加工的“基本单元”。目前的生物制造方法大多不适用于微生物活细胞, 无法发挥其整体的生物学功能及优势。本研究探索并建立了微流控和磁控的可用于微生物活体的微纳米生物制造新方法, 定位操纵和有序排列微生物活体。以微生物为微纳米机器人, 诱发其特有的生物学功能, 进行受控自组装等生物制造过程, 由此有望设计和创制一系列新型特殊功能材料和器件。

关键词: 微纳生物制造, 微流控技术, 磁控微生物, 细菌纤维素, 仿生矿化

Controllable bio-fabrication based on microbes

Xudian Shi, Gang Wang, Daming Wang, Longjiang Yu, and Guang Yang

National Engineering Research Center for Nano-Medicine, College of Life Science & Technology, Huazhong University of Science & Technology
Wuhan 430074, China

Abstract: Microorganisms in nature have rich variety, whose sizes are from nano scale to micro scale. Therefore, microbes can be used as natural “building blocks” in nano/micro multi-level fabrication processes. At present, most of the bio-manufacturing methods do not apply to direct control of living microbes. Their microbiological global functions and superiorities are not available. In this paper, two novel nano/micro bio-fabrication approaches, micro-fluidic control method and magnetic control method have been established. The living microbes could be manipulated to form micro-scaled patterns or to move orientedly. By these approaches, living microbes are taken as nano/micro robots. We could employ their specific biological functions and regulate their controllable self-assembly, which is expected to design and create a series of new special functional materials and devices.

Keywords: nano/micro bio-fabrication, micro-fluidic technique, magnetic controllable microbes, bacterial cellulose, biomimetic mineralization

生物制造是将生命科学、材料科学以及生物技术融入到制造学科中, 是微纳米制造技术和生命科学交叉产生的一门新兴学科。它包括仿生制造、生物质和生物体制造, 运用现代制造科学和生命科学的原理和方法, 通过细胞或微生物的受控三维加工和组装, 制造新材料、器件及生物系统。生物制造为微纳制造技术提供了一类全新的制造手段, 扩展

了传统制造领域的边界和范畴。

生物制造的本质是以生物作为完成制造过程的主体, 在微纳米尺度通过生物的受控自组装自装配构成各种微结构。主要包括对 DNA、蛋白质、多糖等生物大分子进行有序操纵; 对微生物定向诱导或有序排列, 利用其天然结构及功能开发新型功能材料; 以及通过细胞受控组装, 完成具有新陈代谢特

Received: March 27, 2009; Accepted: May 14, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20774033), Natural Science Foundation of Hubei Province for Distinguished Young Scholars (No. 2008CDB279).

Corresponding author: Guang Yang. E-mail: yang_sunny@yahoo.com

国家自然科学基金项目(No. 20774033), 湖北省自然科学基金(杰青)项目(No. 2008CDB279)资助。

征的生命体成型和制造。比如通过人工诱导 DNA 自组装形成各种立体结构^[1], 对 DNA 正四面体进行的化学修饰, 有望应用于制备新型化学反应模板^[2]。另外, 自组装多肽纳米纤维, 可作为组织工程或者生物矿化支架^[3]。使用基因改造过的病毒作为模板合成 Au、Co₃O₄ 纳米线, 具有作为锂离子电池电极材料的应用潜力^[4]。Yan YN 等报道了以高精度三维微定位系统对细胞及生物材料进行加工组装, 该方法有望用于加工人工组织器官^[5]。细菌纤维素是由木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)分泌的胞外产物, 是自然界中唯一的天然纳米纤维, 在伤口愈合材料、人造血管以及化妆品成分、食品添加剂等方面有广泛的应用^[6]。近藤首次报道了用有序高分子模板在室温下诱导木醋杆菌的生物合成过程, 可在纳米尺度上控制细菌纤维素纤维的排列, 并堆积成有序的三维结构材料^[7]。

微生物是地球上最古老的生命体, 包括细菌、真菌、病毒等, 种类繁多, 形态与生物学功能各异, 其个体大小从几十纳米到微米级, 具有极强的生命力和适应性, 能够以较低成本进行大批量培养, 在微纳米加工领域具有极大的应用潜力。另外, 利用微生物进行材料加工是低能耗、节约土地及自然资源、保护环境的绿色工艺过程, 还可定向培育新品种, 因此在促进科技进步和建设和谐社会方面具有积极推动作用, 具有极高的社会效益。以微生物为分子组装的机器, 以微纳米尺度的过程控制方法对其进行二维数字定位以及图案化排列或者三维微操纵, 由此可设计创制出具有特定功能的新材料。其关键是以合适的方法控制微生物群体的定向运动与有序排列, 进而才能够利用其天然生物学功能完成自装配、有序组装等过程。

目前能够用于生物制造过程控制的微纳米制造方法主要有机械作用喷射技术, 直写技术、电纺丝技术、分子模板诱导合成、化学方法表面镀镍、计算机辅助仿生建模与快速成型技术等^[7-12]。而这其中大多数方法不能应用于对微生物活细胞的控制, 主要是因为其控制条件不够温和, 不能保证在整个控制过程中微生物个体的存活以及生物学功能的完整, 这就限制了其应用领域。本研究探索并建立了微流控和磁控的 2 种可用于微生物活体定位操纵和有序排列的微纳米生物制造新方法。

微流控技术主要利用一些微米级的管道操纵和控

制极少量的水溶液进行生物分析。微流控技术在微生物领域具有广泛的应用前景, Whitesides GM 等指出微流控技术作为一种工具将可应用于微生物的单细胞操作, 控制胞外环境的瞬时转变, 以及对微生物生理及运动的研究等^[13]。Li Y 等报道了通过该技术和表面化学的耦合来调控多种动物细胞的定向生长^[14]。本研究将微流控技术应用于对木醋杆菌的控制, 通过导向微生物的定向运动来调控其胞外产物细菌纤维素的有序组装, 证实了通过微流控技术可以诱导细菌纤维素纤维在微米尺度上进行图案化有序自组装。

磁控方法则是源于对趋磁细菌的仿生。趋磁细菌(*Magnetotactic bacteria*)是一类能够沿着磁场方向运动的革兰氏阴性细菌。这类细菌体内都具有晶形独特的、由膜包裹的磁性纳米颗粒——磁小体, 磁小体尺寸一般为 30~140 nm^[15], 化学成分主要是 Fe₃O₄。细胞内的磁小体使趋磁细菌在磁场中可以作趋向性运动。通过对趋磁细菌进行仿生, 用化学方法合成磁性纳米颗粒, 再人工构建具有磁响应性的活性微生物细胞(以下简称磁控微生物), 可以使其他种类的微生物活细胞也具有磁可控性。本研究采用仿生矿化法^[16]对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞进行了表面修饰处理, 成功构建了磁控微生物, 观察到了磁控酵母菌的趋磁性运动。这为进一步建立磁场对磁控微生物的图案化排列奠定了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

木醋杆菌 *A. xylinum*, 中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)M 207163, 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 由本实验室保存。

1.1.2 培养基和培养条件

木醋杆菌的培养采用 Hestrine Schramm (HS)培养基^[17](g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 5, 蛋白胨 5, 柠檬酸 1.14, Na₂HPO₄·12H₂O 10.3。培养条件为 30°C 静置培养。

酿酒酵母的培养采用 YPD 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 10, 蛋白胨 20。

1.1.3 试剂

NaCl 7 g/L, 双蒸水配制。以下试剂使用 NaCl 溶液配制, CaCl₂ 1.11 g/L, Na₂HPO₄ 1.42 g/L, NaOH 0.4 g/L, 聚二烯丙基二甲基氯化铵 (Poly Diallyldimethylammonium Chloride, PDADMAC) 1

g/L(Sigma-Aldrich 公司生产), 聚丙烯酸钠(PolyAcrylic Acid, Sodium Salt, PAAS) 1 g/L (Sigma-Aldrich 公司生产), 以上均由分析纯试剂配制, 使用前灭菌。磁性纳米颗粒使用 γ - Fe_2O_3 , 平均粒径为 20~30 nm, 由上海师范大学沈鹤柏教授提供。

1.2 实验方法

1.2.1 微流控技术诱导纤维素图案化有序自组装

按照软蚀刻的一般制作工艺制备一个微流控芯片, 并且以添加 2%(W/W)琼脂糖的固体 HS 培养基为原料, 按此方法再制备具有图案化的培养基模块。用微流控芯片测试木醋杆菌在流体推动下的运动状况; 利用图案化培养基模块对木醋杆菌进行敞开体系的培养以制备微米级的图案化纤维。具体操作方法及条件等详见专利“一种通过微流控芯片制备图案化纤维素的方法”^[18]。

1.2.2 磁控微生物的制备

采用仿生矿化法^[16], 首先依靠正负电荷的相互作用在酵母细胞表面进行改性修饰, 依次以 PDADMAC 和 PAAS 进行交替组装, 共修饰了 4 层, 形成最外层为 PAAS 的多层高分子包裹的酵母菌。

再将处理后的酵母细胞转入已加入磁性纳米颗粒的 CaCl_2 溶液, 并缓慢滴加 Na_2HPO_4 , 以 NaOH 调节 pH 维持在 6.8, 制得表面搭载有磁性纳米颗粒的酵母细胞。具体操作方法及条件等详见专利“一种活体磁性微生物的制备方法”^[19]。

1.2.3 表征方法

用光学显微镜(Olympus IX71)观察木醋杆菌在微流控管道中的运动, 以及对磁控酵母菌的趋磁性运动进行荧光观察(以 0.05 g/L 盐酸四环素对酵母细胞表面 Ca^{2+} 荧光染色, 并在 360~370 nm 紫外光下观察)。用扫描电子显微镜(SEM, QUANTA200)观察图案化的纤维素与磁控酵母菌的表面形貌, 样品均经过冷冻干燥处理。用透射电子显微镜(TEM, FEI Tecnai G2 20 TWIN)观察磁控酵母细胞切面形貌, 采用戊二醛-锇酸双重固定法固定后进行超薄切片, 以醋酸铀和柠檬酸铅染色后观察。

2 结果与讨论

2.1 图案化细菌纤维素的形貌观察与微流控管道中木醋杆菌运动的观察

图 1 是用光学显微镜及 SEM 观察到的细菌纤维素纳米纤维, 该纤维素是通过图案化培养基模板对

木醋杆菌进行敞开体系的培养得到的, 虽然在纳米尺度上仍然呈现三维无规网络结构, 但在微米级已经实现了网格及线性的图案化控制。Onsager 曾指出, 在高浓度坚硬的杆状分子溶液中, 液晶相将呈趋向排列, 用来减少其占用的空间^[20]。若将木醋杆菌视为坚硬的杆状分子, 当减小沟槽的宽度时, 木醋杆菌为了利用沟槽中有限的空间, 以及沟槽中相对丰富的培养基, 将在沟槽中趋向于有序的平行排列, 而由细菌分泌的细菌纤维素, 在纳米尺度上也将随之取向排列。另外, 从图 2 中可以看出在微流控管道中对木醋杆菌进行动态体系的培养, 绝大部分的细菌将沿着液流的方向运动。这预示着有望通过调节沟槽的尺寸, 再结合对微流控管道中流体的控制, 以木醋杆菌为纳米机器人, 组装连续的有序纳米纤维, 从而实现对图案化纳米纤维素的多层次跨尺度的有序组装^[21]。

2.2 磁控微生物的形态结构

用 TEM 分别观察未经过处理的酵母菌、只经过仿生矿化处理但未加入磁性纳米颗粒的酵母菌与磁控酵母菌, 其细胞切面形态依次如图 3A、B、C 所示。天然的酵母菌细胞壁表面平整无褶皱。经过仿生矿化处理后的酵母菌表面(图 3B)有明显的“绒毛”状结构, 且细胞壁最外层部分厚度明显增加, 该部分结构分布连续, 较为均匀。 CaCl_2 、 Na_2HPO_4 与 NaOH 反应生成 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 沉淀, 酵母细胞表面最外层的 PAAS 所带的大量负电荷, 为 Ca^{2+} 提供了沉积位点, 可使反应生成的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 沉积在细胞表面形成“矿化壳”。图 3C 与图 3B 有较为类似的特点, 略有不同的是磁控酵母菌的表面结构呈“锯齿”状, 相比图 3B 更为规则, 推测这是由于加入的磁性纳米颗粒在仿生矿化处理的过程中留在了“矿化壳”中造成的, 这也是使细胞有趋磁性的原因。图 3D 显示出了 SEM 观察到的磁控酵母菌的整体形貌, 表面的“矿化壳”连续并有褶皱起伏。

2.3 磁控微生物的趋磁性运动

用小磁针测试菌液中的细胞是否具有趋磁性。结果显示加入小磁针后, 磁控酵母菌在小磁针附近大量聚集, 呈现明亮荧光效果(图 4b), 说明该酵母菌具有良好的趋磁性; 对照组结果显示了未加磁小体时, 只经过仿生矿化处理的酵母菌不会聚集于小磁针周围(图 4d)。两组实验结果可以说明磁小体成功搭载于酵母菌表面, 并可以驱使酵母菌进行趋磁性运动。

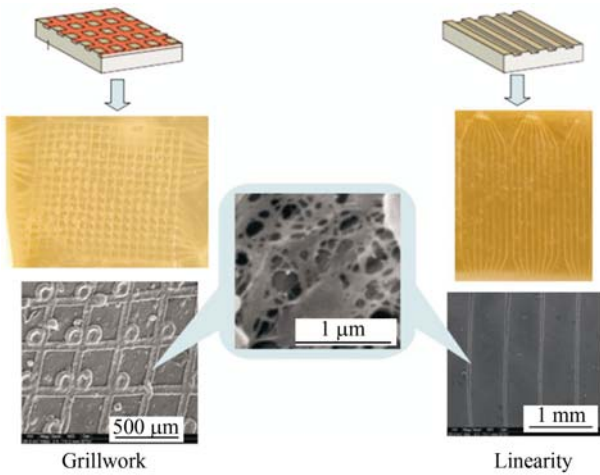


图1 图案化纳米纤维的光学显微照片与扫描电镜照片^[21]
Fig. 1 Optical micrographs and SEM of cellulose nano-fiber materials with specific patterns^[21].

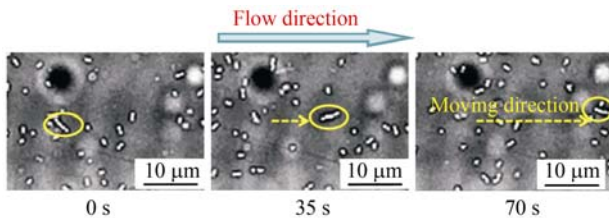


图2 木醋杆菌在微流控管道中的运动^[21]
Fig. 2 Movement of *A. xylinum* within the micro-fluidic channels at a dynamic system^[21].

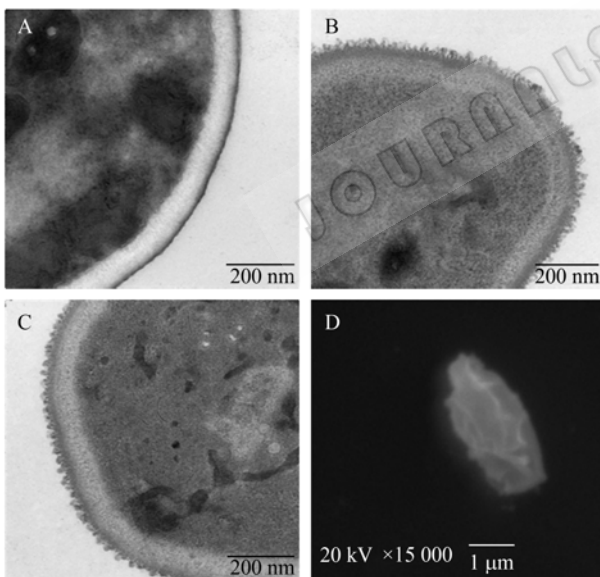


图3 磁控酵母菌的透射电镜及扫描电镜照片
Fig. 3 TEM and SEM of magnetic controllable yeast cells. (A) Control yeast cell. (B) Biomimetic mineralized yeast cell without magnetic nano particles. (C) TEM of magnetic controllable yeast cell. (D) SEM of magnetic controllable yeast cell.

3 总结与展望

本研究提出了两种新的基于微生物的可控微纳

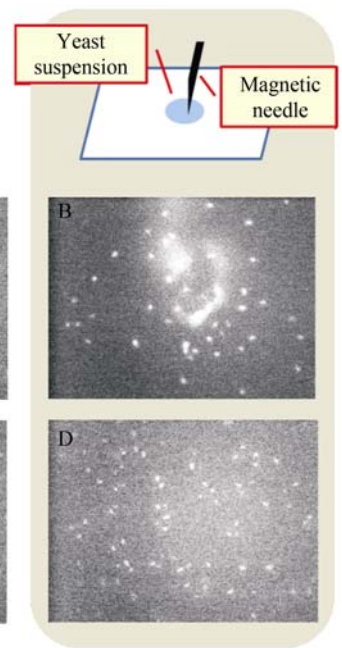


图4 荧光显微镜观察磁控酵母菌的趋磁性运动
Fig. 4 Fluorescent micrographs of the magnetotactic movement of magnetic controllable yeast cells. (A) Magnetic cells are randomly distributed in solution. (B) Cells are attracted by the magnetic needle. (C, D) Control cells are randomly distributed no matter whether the magnetic needle is used or not.

米生物制造方法，可用于定位操纵或有序排列活体微生物。利用微流控技术进行有序纤维素的生物制造，本研究已经论证了该方法可实现微米级的图案化组装，并有望向纳米尺度延伸，进行多层次跨尺度的纳米纤维的有序组装。

磁控的方法基于对磁控微生物的人工构建，采用仿生矿化原理构建磁控微生物，处理后的细胞不易增值，可以维持活力^[16]，并且该方法具有较好的普适性，这符合生物制造的基本需要。本研究证实了该方法可以用于制备磁控微生物。磁控的生物制造方法相比于其他过程控制方法除了有条件温和的明显优势外，还具有可操作性强，能进行定向或定域控制，可以进行动态控制以及容易与其它过程控制方法结合使用等优点。进一步研究将涉及到如何对磁控微生物进行微纳米图案化排列及定位操纵。

总之，通过建立微流控、磁控的微生物微纳米生物制造过程控制方法，以活性微生物为微纳米机器人，诱发其特有的生物学功能，进行受控自组装等生物制造过程，由此设计和创制一系列新型特殊功能材料和器件，将有望在化学、高分子、材料、物理、生物工程等领域有广泛应用(图5)。

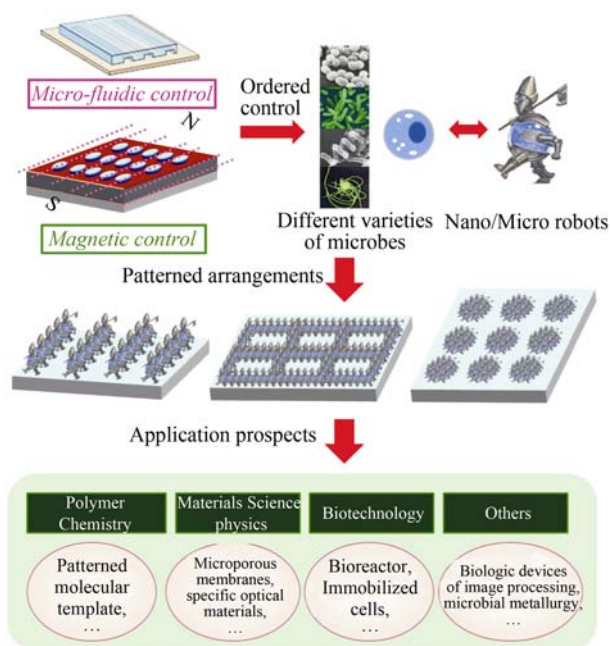


图 5 基于微生物的可控生物制造与应用前景示意图

Fig. 5 Controllable bio-fabrication based on microbes and its application prospects.

REFERENCES

- [1] Seeman NC. DNA in a material world. *Nature*, 2003, **421**: 427–431.
- [2] Mitchell N, Schlapak R, Kastner M, *et al.* A DNA nanostructure for the functional assembly of chemical groups with tunable stoichiometry and defined nanoscale geometry. *Angew Chem Int Ed*, 2009, **48**: 525–527.
- [3] Higashi N, Koga T. Self-assembled peptide nanofibers. *Self-assembled Nanomaterials I: Nanofibers*, 2008, **219**: 27–68.
- [4] Nam KT, Kim DW, Yoo PJ, *et al.* Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes. *Science*, 2006, **312**: 885–888.
- [5] Yan YN, Wang XH, Pan YQ, *et al.* Fabrication of viable tissue-engineered constructs with 3D cell-assembly technique. *Biomaterials*, 2005, **26**: 5864–5871.
- [6] Yang G, Kondo T. Bacterial cellulose: An eco-friendly nano-material. *Science (in Chinese)*, 2006, **58**(2): 14–17. 杨光, 近藤哲男. 细菌纤维素: 一种环境友好的纳米材料. *科学*, 2006, **58**(2): 14–17.
- [7] Kondo T, Nojiri M, Hishikawa Y, *et al.* Biodirected epitaxial nanodeposition of polymers on oriented macromolecular templates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 14008–14013.
- [8] Liu F, Wu RD, Zhang RJ, *et al.* Jet application techniques on bio-manufacture engineering. *Chin J Mech Eng*, 2006, **42**(12): 13–20. 刘丰, 吴任东, 张人佶, 等. 喷射技术在生物制造工程中的应用. *机械工程学报*, 2006, **42**(12): 13–20.
- [9] Hon KKB, Li L, Hutchings IM. Direct writing technology—advances and developments. *CIRP Ann Manuf Technol*, 2008, **57**: 601–620.
- [10] Li D, Xia YN. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel. *Adv Mater*, 2004, **16**(14): 1151–1170.
- [11] Zhang DY, Cai J, Zhang B, *et al.* Fundamental study of micro/nano biomanufacturing technology. *Mod Manuf Eng*, 2004, **12**: 4–6. 张德远, 蔡军, 张波, 等. 微纳米生物制造技术的基础研究. *现代制造工程*, 2004, **12**: 4–6.
- [12] Lin G, Xu JM, Ma L. Biological manufacturing—perfect combination of manufacturing technology with life sciences. *Machinery*, 2006, **44**: 46–48. 林岗, 许家民, 马莉. 生物制造——制造技术和生命科学的完美组合. *机械制造*, 2006, **44**: 46–48.
- [13] Weibel DB, DiLuzio WR, Whitesides GM. Microfabrication meets microbiology. *Nature*, 2007, **5**: 209–218.
- [14] Li Y, Yuan B, Ji H, *et al.* A method for patterning multiple types of cells by using electrochemical desorption of self-assembled monolayers within microfluidic channels. *Angew Chem Int Ed*, 2007, **46**: 1094–1096.
- [15] Lang C, Schuler D, Faivre D. Synthesis of magnetite nanoparticles for bio- and nanotechnology: Genetic engineering and biomimetics of bacterial magnetosomes. *Macromol Biosci*, 2007, **7**: 144–151.
- [16] Wang B, Liu P, Jiang WG, *et al.* Yeast cells with an artificial mineral shell: Protection and modification of living cells by biomimetic mineralization. *Angew Chem Int Ed*, 2008, **47**: 3560–3564.
- [17] Hestrin S, Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: Preparation of freeze dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J*, 1954, **58**: 345–352.
- [18] Yang G, Wang G, Liu BF, *et al.* An approach to fabricating patterned cellulose using micro-fluidic chips: China patent, CN200810047875.1.2008-05-30. 杨光, 王刚, 刘笔锋, 等. 一种通过微流控芯片制备图案化纤维素的方法: 中国专利 CN200810047875.1. 2008-05-30.
- [19] Wang DM, Yang G, Shi XD. Method for preparing living magnetic microbes: China patent, CN200910062428.8. 2009-06-08. 王大明, 杨光, 史续典. 一种活性磁体微生物的制备方法: 中国专利 CN200810062428.8.2009-06-08.
- [20] Onsager L. The effects of shape on the interaction of colloidal particles. *Ann NY Acad Sci*, 1949, **51**: 627–659.
- [21] Wang G, Chen XF, Shi XD, *et al.* Bio-fabrication of patterned cellulose nano-fibers. *Adv Mater Res*, 2008, **47–50**: 1359–1362.