

Efficient Expression of sTNFR II-gAD-Fc Fusion Protein in CHO Cell

Caihong Wang^{1*}, Ying Liu^{2*}, Qinzhen Cai¹, Hongmei Yang¹, Lisha Ma¹, Jimin Gao^{1#}

¹Zhejiang Provincial Key Laboratory for Technology & Application of Model Organisms, School of Laboratory Medicine, School of Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou Zhejiang

²Yantai Central Hospital of Longkou Mining, Yantai Shandong

Email: wch995041@163.com, jimingao64@163.com

Received: May 7th, 2015; accepted: May 23rd, 2015; published: May 27th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

In order to produce the soluble TNF receptor (sTNFR) II with good neutralizing activity against TNF α , we constructed the fusion gene sTNFR II-gAD-Fc, which encoded human sTNFR II, the globular domain of adiponectin (gAD) and IgG1 Fc, and efficiently expressed it through a "GC-rich" method for mammalian gene expression in CHO-S cells, and further established the process of serum-free suspension fed-batch culture. The fusion gene of sTNFR II-gAD-Fc was obtained by recombinant PCR, and then cloned into pMH3 expression plasmid with GC-rich motif. The plasmid was electrotransfected into CHO-S cells, which were selected by G418. sTNFR II-gAD-Fc fusion protein was analyzed by dot blot and Western blot. The TNF α -antagonizing activity of sTNFR II-gAD-Fc was determined through TNF α -induced L929 cytotoxicity assay. The suspension cultures of sTNFR II-gAD-Fc-expressing CHO-S cells were performed in a step-wise manner. We assessed the expression levels of sTNFR II-gAD-Fc in batch culture in shake flasks (500 mL), fed-batch culture in roller bottles (2 L), and the bioreactor (7.5 L) with inoculating concentration of 2×10^6 cells/ml of sTNFR II-gAD-Fc-expressing CHO-S cells, respectively. Having reached up to more than 4×10^6 cells/ml in fed-batch cultures, the cells were added semi-continuously with the feed medium to keep the glucose concentration at 2 g/L. Stable expression clones (75 μ g/mL) were obtained, and sTNFR II-gAD-Fc fusion protein was expressed as dimer and polymer forms in the supernatant, and displayed very strong TNF α -neutralizing activity. The yields of sTNFR II-gAD-Fc fusion protein were about 10.0 mg/L, 18.3 mg/L and 20.5 mg/L, respectively, in 60 mL batch culture, 200 mL and 3 L fed-batch cultures. Our efficient expression of sTNFR II-gAD-Fc fusion protein by CHO-S cells had laid a good basis for the development of pilot production process in the suspension fed-batch culture.

*第一作者。

#通讯作者。

Keywords

sTNFR_{II}-gAD, IgG1 Fc, TNF Antagonist, GC-Rich Expression System, Suspension Fed-Batch Culture

sTNFR_{II}-gAD-Fc融合蛋白在CHO细胞中的高效表达

王彩虹^{1*}, 柳英^{2*}, 蔡秦真¹, 杨红枚¹, 马丽莎¹, 高基民^{1#}

¹温州医科大学检验医学院、生命科学学院浙江省模式生物技术与应用重点实验室, 浙江 温州

²烟台市龙口矿务局中心医院ICU, 山东 烟台

Email: wch995041@163.com, [#jimingao64@163.com](mailto:jimingao64@163.com)

收稿日期: 2015年5月7日; 录用日期: 2015年5月23日; 发布日期: 2015年5月27日

摘要

构建了人肿瘤坏死因子受体II胞外区、人脂联素球部与人IgG1 Fc的融合基因sTNFR_{II}-gAD-Fc的真核表达载体, 在CHO-S细胞中快速高效表达, 探索了无血清悬浮流加培养工艺。应用重组PCR将人IgG1 Fc基因片段与sTNFR_{II}-gAD基因片段融合, 构建pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc表达载体, 电转染至CHO-S细胞, 挑选G418抗性的高表达单克隆, 斑点杂交半定量分析和Western blot分析sTNFR_{II}-gAD-Fc的表达, Protein A-Agarose纯化, 以及拮抗TNF α 的生物活性测定。最后在摇瓶、转瓶及生物反应器中进行了逐级放大的无血清悬浮批次及流加培养, 即: 2.0×10^6 cells/mL的接种密度, 当达到 4.0×10^6 cells/mL以上时开始流加培养并以每日葡萄糖的残余量2 g/L左右作为流加体积的控制参数。成功构建pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc表达载体, 检测到sTNFR_{II}-gAD-Fc在CHO-S细胞培养上清中以二聚体和多聚体形式表达, 获得了高表达(75 μ g/mL)单克隆细胞株, 且该蛋白具有显著抑制TNF α 杀伤L929细胞的活性。在摇瓶中无血清批次培养和转瓶及生物反应器中流加培养时产量分别为10.0 mg/L、18.3 mg/L和20.5 mg/L。利用CHO-S细胞系统成功实现了sTNFR_{II}-gAD-Fc 融合蛋白的快速高效表达, 为建立一套高密度、高效表达该融合蛋白的悬浮流加培养中试工艺打下了良好基础。

关键词

可溶性肿瘤坏死因子受体II-脂联素球部, 人免疫球蛋白G1 Fc, TNF拮抗剂, “富含GC”表达体系, 悬浮流加培养

1. 引言

TNF α 是一种多能性细胞因子, 参与许多重要的生理功能, 但其过表达则会破坏机体的免疫平衡, 导致自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎)的发生。中和体内过剩的 TNF α 或抑制 TNF α 活性是治疗这类疾病的有效措施。可溶性 TNFR_{II}(sTNFR_{II})单体是 TNF α 的天然拮抗剂[1], 但其与 TNF α 间的亲和力低, 且在血液循环中的半衰期很短, 故拮抗 TNF α 的能力非常有限。因二聚体化效应, sTNFR_{II}-Fc 融合蛋白(Etanercept)拮抗 TNF α 的能力是相应 sTNFR_{II} 单体的 50~1000 倍[2] [3]。借助脂联素球部(gAD)可自行形

成同源三聚体的特性[4]，本实验室构建了优于 sTNFR_{II}-Fc 融合蛋白、三聚体化的 sTNFR_{II}-gAD 融合蛋白[5]。然而，我们发现，sTNFR_{II}-gAD 在制备过程中仍大量以单体蛋白形式存在[6] [7]。因此，本研究拟借助人 IgG1 的 Fc 片段肽链间的二硫键能形成同源二聚体的特性，将 sTNFR_{II}-gAD 基因与 IgG1 Fc 基因相连，成功利用“富含 GC”的哺乳动物细胞 CHO-S 表达体系[8]，实现了 sTNFR_{II}-gAD-Fc 的快速高效表达，且以二聚体和多聚体的形式存在，从而避免了单体 sTNFR_{II} 的形成。同时，初步探索了无血清悬浮流加培养工艺，为建立一套高密度、高效表达融合蛋白的中试流加培养工艺奠定了基础。

2. 材料与方法

2.1. 质粒、菌种和细胞

pAAV2-sTNFR_{II}-gAD 由本实验室保存，pMH3 质粒，CHO-S 细胞由杭州安瑞普生物科技有限公司惠赠，CHO-S 细胞已经过无血清培养基 B001 悬浮驯化可悬浮生长，在含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中可贴壁生长；L929 细胞购自美国 ATCC，用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养。

2.2. 主要试剂和仪器

Platinum Pfx DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司；EcoR I 和 Not I 限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自宝生物公司(Takara Biotechnology Co., Ltd.)；质粒小提试剂盒购自 Qiagen 公司；Ficoll 试剂和 Trizol 试剂盒购自北京索来宝科技有限公司；G418 购自 Merck 公司；噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)购自 Amresco；放线菌素 D 购自 Fluka；鼠抗人脂联素单抗由本元正阳基因技术有限公司谭淑萍老师提供；鼠抗人 TNFR_{II} 单抗购自 Abcam 公司；蛋白 Marker，AP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体和 HRP 标记的羊抗鼠的 IgG 抗体，BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒，BeyoECL Plus (超敏 ECL 化学发光试剂盒)和 BCA 法蛋白含量测定试剂盒均购自碧云天生物技术研究；DMEM/F12 培养基、RPMI1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco；无血清培养基 B001 和流加培养基 F001 均购自杭州安瑞普生物科技有限公司。人 TNF α 国家标准品(3500 U/支)由中国药品生物制品检定所提供；hTNFR-Fc 阳性对照品由复旦张江生物医药公司提供。琼脂糖亲和介质 Protein A 购自国家生化工程技术研究中心(北京)。细胞转瓶培养器及 PY/PYC 系列恒温培养箱购自美国精骐有限公司。7.5LCelliGen310 生物反应器购自美国 NBS (New Brunswick Scientific)公司。

2.3. 重组质粒的构建

抽取 20 ml 健康人外周血于肝素抗凝管中，以 PBS 稀释 1 倍后用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC。按 Trizol 试剂盒操作说明提取总 RNA，取 1 μ g 进行逆转录，以逆转录后的 cDNA 为模板，设计 2 对引物(如表 1)，引物合成由 Invitrogen 公司完成，利用 F1 和 R1 一对引物 PCR 扩增得到目的基因 IgG1Fc。反应条件：95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；94 $^{\circ}$ C 15 s，58 $^{\circ}$ C 30 s，68 $^{\circ}$ C 45 s，28 个循环；68 $^{\circ}$ C 10 min。扩增得到目

Table 1. Oligonucleotide primers used for the amplification of human sTNFR_{II}-gAD and IgG1 Fc coding regions
表 1. 人 sTNFR_{II}-gAD 和 IgG1 Fc 编码区扩增的引物序列

Primer name	Primer sequence (5'-3')
F1	TGCTGTACCACGACACCAACGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
R1	ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG
F2	ACGGAATTCGCCACCATGCCCCCGTGGCCGT
R2	TTGTCACAAGATTTGGGCTCGTTGGTGTCTGGTACAGCAG

注释：限制性内切酶酶切位点侧翼序列已用下划线标出，EcoRI: GAATTC; Not I: GCGGCCGC。

的基因 IgG1 Fc 大小为 699 bp。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳，试剂盒回收目的片段。同时，以融合蛋白基因 pAAV2-sTNFR_{II}-gAD 为模板设计引物 F2 和 R2。PCR 扩增条件：95℃ 预变性 5 min；94℃ 15 s，60℃ 30 s，68℃ 75 s，28 个循环；68℃ 10 min，扩增得到目的基因 sTNFR_{II}-gAD 大小为 1183 bp。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳，试剂盒回收目的片段。然后，同时以胶回收的目的基因 sTNFR_{II}-gAD 和 IgG1Fc 为模板，以 F2 和 R1 为引物，进行重组 PCR，将这两段不相邻的基因片段连接扩增出融合基因 sTNFR_{II}-gAD-Fc 大小为 1887 bp。PCR 扩增条件为 95℃ 5 min；94℃ 15 s，60℃ 30 s，68℃ 2 min，28 个循环；68℃ 10 min。PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳，试剂盒回收目的片段，用 EcoR I 和 Not I 进行双酶切。同样用这两种酶切载体 pMH3。用 T4 DNA 连接酶将 sTNFR_{II}-gAD-Fc 目的片段与 pMH3 载体片段连接，转化至 DH5 α ，挑取氨苄抗性克隆进行酶切鉴定，并直接送上海华大基因测序鉴定，得到重组表达质粒 pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc。

2.4. 转染及稳定高表达单克隆细胞株的获得

采用电穿孔系统(Bio-Rad)进行转染，取 5×10^6 个 CHO-S 细胞，PBS 洗涤 2 遍，200 μ L PBS 重悬，将 25 μ g pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc 质粒及 10 μ g 鲑鱼精 DNA 混匀加入上述细胞悬液后转移到电转杯，冰浴 1 min，电转仪参数：电压 160 V、电击时间 15 ms，电击一次，取出，立即冰浴 1 min，同法再电击一次。将电转后的细胞悬液转入 2 个预先加好含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基的细胞培养皿中，轻轻摇晃使细胞分布均匀，37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后，换用含 G418 的选择培养基(G418 浓度为 1.5 mg/mL)，G418 持续加压筛选两周后，刮取法挑选单克隆，即待单个细胞长成集落斑点(克隆)后(50~100 个克隆集落/培养皿最佳)，弃去皿内培养基，加入 2~3 mL 培养基。根据镜面反光原理，用 10 μ L 枪头刮取单克隆细胞团于 96 孔板中，此时撤去 G418，37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。培养 5~7 天，待细胞长满后换无血清的 DMEM/F12，培养 24 h 后取上清，斑点杂交(dot blot)检测目的蛋白表达量。经半定量分析挑出高表达株，此单克隆记为一次克隆。为获取高纯度高表达单克隆，选取表达量前三的一次克隆，消化后计数，分别取 50~100 个单个细胞于 9 cm 细胞培养皿中培养，同法挑取二次、三次克隆。冻存表达量最高的三个克隆作为种子细胞。

2.5. 无血清悬浮批次培养和流加培养

2.5.1. 种子细胞的无血清悬浮驯化

选取稳定高表达量的种子细胞，用含 10% FBS 的 DMEM/F12 的培养基在 T75 方瓶中贴壁培养，待 3 个 T75 方瓶中的细胞汇合度达 90% 且状态良好时，胰酶消化后，弃除胰酶，用 30 mL 无血清培养基 B001 (添加了 100 μ M 次黄嘌呤、16 μ M 胸腺嘧啶核苷及胰岛素生长因子)重悬细胞，并吹打成单个细胞避免成团，接种到 250 mL 摇瓶中，初始密度至少约 2.0×10^6 cells/mL，置于 37℃ 恒温摇床，120 r/min 振荡培养。每天检测活细胞密度，台盼蓝染色检测细胞活力，直到细胞生长每天可以倍增，状态良好，dot blot 检测蛋白表达稳定，即得到悬浮驯化成功的工程细胞株。

2.5.2. 工程细胞株在摇瓶中无血清批次培养

以 2.0×10^6 cells/mL 初始密度接种到 500 mL 摇瓶中，初始工作体积为 60 mL，置于 37℃ 恒温摇床，120 r/min 振荡培养，进行无血清悬浮批次培养。每天取样观察计数并台盼蓝染色检测细胞活力，dot blot 检测蛋白的表达，当细胞活力降至 60% 时终止批次培养。

2.5.3. 工程细胞株在转瓶中无血清流加培养

在转瓶中进行无血清悬浮流加培养，以 2.0×10^6 cells/mL 初始密度接种到 2 L 摇瓶中，初始体积为

100 mL, 置于 37°C 恒温转瓶旋转机, 720 r/h 滚动培养, 扩种至 200 mL 时, 不再扩大培养体积。当细胞密度达 $4.0\sim 5.0 \times 10^6$ cells/mL 左右时开始间歇流加高糖流加培养基 F001, 流加体积以控制每天的葡萄糖残余量在 2 g/L 左右为准。每天取样观察计数并检测细胞活力, 测定葡萄糖, 当细胞活力降至 60% 时终止培养。

2.5.4. 工程细胞株在生物反应器中无血清流加培养

接种 2 L 密度为 2.0×10^6 cells/mL 的工程细胞株到 7.5 L CelliGen 310 生物反应器中, 进行全悬浮无血清培养, 扩种至 3.0 L, 不再扩大培养体积, 当细胞密度达 4.0×10^6 cells/mL 左右时开始间歇流加高糖流加培养基 F001, 流加体积以控制每天的葡萄糖残余量在 2 g/L 左右为参考。反应器操作条件: pH (7.08 ± 0.1), DO 为 50% 空气饱和度, 温度为 37°C, 搅拌速度为 60 r/min, 第 3 天搅拌速度下调至 40 r/min。培养过程中每隔约 24 h 取样, 观察计数并检测细胞活力, 测定葡萄糖。连续培养期间以 RPC 软件进行数据采集, 实现计算机在线控制, 维持细胞培养条件的稳定, 当细胞活力降至 60% 时终止培养。

2.6. Dot blot 检测和 Western blot 分析融合蛋白 sTNFRII-gAD-Fc

将每次收集的无血清培养 24 h 的上清各取 5 μ L, 分别点到 NC 膜上, 用封闭液(5% 脱脂牛奶, TBST 配制) 37°C 封闭 1 h。弃封闭液, TBST 洗涤 NC 膜 3 次后, 加入 1:2000 (用 TBST 稀释) 的鼠抗人 TNFR 单抗或鼠抗人脂联素单抗, 37°C 孵育 1 h。回收单克隆抗体, TBST 洗涤 NC 膜 3 次后, 加入 1:3000 (用 TBST 稀释) 的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体, 室温孵育 45 min, 用 TBST 洗膜 3 次, ECL 曝光, 观察结果。

取 20 μ L 无血清 DMEM/F12 培养 24 h 的上清, 加入 5 μ L 5 \times Loading buffer, 6% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳。然后用湿胶转移仪将蛋白转移至 PVDF 膜上, 取出 PVDF 膜, 用封闭液(5% 的脱脂奶粉)封闭 1 h。弃封闭液, TBST 洗膜 3 次后, 加入 1:2000 稀释的鼠抗人 TNFR 单抗或鼠抗人脂联素单抗(用 TBST 稀释), 室温孵育 1 h。回收单克隆抗体, 用 TBST 洗膜 3 次, 加入 1:3000 稀释的碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(用 TBST 稀释), 室温孵育 1 h; 用 TBST 洗膜 3 次。取出 PVDF 膜, 在膜上滴加显色液 BCIP/NBP, 避光显色 10~15 min, 用超纯水洗涤膜终止反应, 观察结果。

2.7. sTNFRII-gAD-Fc 融合蛋白的纯化

将收获的培养上清经 12,000 r/min, 4°C 离心 10 min 后, 用 0.22 μ m 滤膜过滤进行蛋白的粗分离, 然后用 Protein A-Agarose 亲和层析法分离纯化。将收集到的蛋白洗脱液峰进行 6% SDS-PAGE 电泳分析, 收集含有目标融合蛋白的峰获得的融合蛋白纯品。

2.8. sTNFRII-gAD-Fc 融合蛋白的生物活性测定

以 L929 为靶细胞, 检测融合蛋白 sTNFRII-gAD-Fc 拮抗 TNF α 杀伤 L929 细胞的中和活性[9]。取对数生长期的 L929 细胞, 胰酶消化计数, 调整细胞密度 1.5×10^5 cells/mL, 在 96 孔板中每孔加入 100 μ L 的细胞悬液, 37°C、5% CO₂ 培养箱培养过夜。第 2 天将无血清悬浮培养的 CHO-S/pMH3-sTNFRII-gAD-Fc 的上清用含 20 μ g/mL 放线菌素 D、20 U/mL TNF α 的 RPMI1640 培养基 4 倍比梯度稀释, 共 10 个梯度。弃去 96 孔板中 L929 细胞的上清, 加入前面稀释好的待测样品, 每孔 100 μ L, 每个梯度设 3 个复孔。同时未转染的 CHO-S 细胞无血清悬浮培养的上清用含 20 μ g/mL 放线菌素 D、20 U/mL TNF α 的 RPMI1640 培养基稀释作为阴性对照。继续 37°C、5% CO₂ 培养 24 h, 每孔加入 20 μ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 再培养 4 h。将 96 孔板中的液体轻轻弃去, 加入 100 μ L DMSO, 37°C 孵育 30 min, 检测各孔的 OD₅₇₀ 值。

3. 结果

3.1. 重组表达质粒 pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc 的结构

重组表达质粒 pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc 结构如图 1 所示。其中包括鸡 β -actin 启动子、sTNFR_{II}-gAD-Fc 融合基因、polyA 加尾信号、新霉素抗性的 *neo* 基因及三个非编码的富含 GC 的 DNA 片段。新霉素抗性的 *neo* 基因便于转染后 G418 筛选, 以得到稳定转染的细胞株。该载体最大的优势是在目的基因的 N' 和 C' 端分别加入一段非编码的富含 GC 的 DNA 片段, 另一非编码的富含 GC 的 DNA 片段位于 β -actin 启动子 N' 端, 这有利于大幅度提高目的蛋白在哺乳动物宿主细胞中的表达。

3.2. 酶切鉴定

用 EcoR I、Not I 双酶切重组质粒 pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc, 经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳可见酶切出的条带与 sTNFR_{II}-gAD-Fc 预期大小(1887 bp)一致(如图 2)。通过 DNA 直接测序, 在 IgG1 Fc 片段上存在 2 个点突变, 即其第 90 位的 GTC (缬氨酸) 突变为 ATC (异亮氨酸), 186 位的 GTC (缬氨酸) 突变为 GAC (天冬氨酸), 但后期蛋白的表达及活性测定分析均表明这两处的点突变并不影响蛋白的结构与生物活性。

3.3. 稳定高表达 sTNFR_{II}-gAD-Fc 的单克隆细胞株的获得

重组表达质粒 pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc 转染 CHO-S 细胞后, 瞬时转染 24 h 时, 分别用抗人脂联素单抗和抗 TNFR_{II} 单抗进行 dot blot 检测分析, 结果均可见转染后的 CHO-S 细胞的培养上清中有 sTNFR_{II}-gAD-Fc 的分泌表达(如图 3(a))。随后通过 G418 筛选及三次单克隆挑选, 利用 dot blot 半定量分析筛选出高效稳定表达 sTNFR_{II}-gAD-Fc 融合蛋白的单克隆细胞株 IIF12。用已知浓度的 sTNFR_{II}-Fc 融合蛋白作为标准品, 分别稀释成 100、75、50、25、12.5、6.25 μ g/mL, dot blot 半定量分析转染后的最高表达株, 96 孔板中最高表达的单克隆细胞培养 24 h 上清中 sTNFR_{II}-gAD-Fc 的含量约相当于 75 μ g/mL (如图 3(b))。

用免疫印迹法分析还原状态/非还原状态的 sTNFR_{II}-gAD-Fc 融合蛋白样品(图 3(c), 图 3(d))。对于还原状态的样品, 用抗人脂联素单抗检测在约 75 kDa 处有特异性条带, 比 sTNFR_{II}-gAD-Fc 预期的蛋白分子量 69 kDa 要大, 这可能是由于糖基化作用导致的; 而用抗人 sTNFR_{II} 单抗检测未见特异性条带。这正好与先前实验的结果抗 TNFR_{II} 单抗只能识别 sTNFR_{II} 的空间表位(而非线性表位), 而抗脂联素单抗可识别 gAD 线性表位一致[6]。然而, 对于非还原状态的样品, 用脂联素单抗及 TNFR_{II} 单抗检测培养上清在约 75 kDa 处均未见特异性条带, 在大约 170 kDa 处及远大于 250 kDa 处分别出现特异性条带, 提示 CHO-S 细胞表达分泌至上清中的 sTNFR_{II}-gAD-Fc 以二聚体和多聚体形式存在, 不存在单体蛋白。

3.4. 无血清悬浮批次和流加培养的比较及 sTNFR_{II}-gAD-Fc 融合蛋白的纯化

将最终选出的高效稳定的单克隆 CHO-S/pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc IIF12 成功驯化适应悬浮生长, 依次进行无血清悬浮批次及流加培养, 逐级放大悬浮培养规模以探索流加培养工艺, 培养时间平均在 6~8 d, 每天取样 dot blot 检测上清中 sTNFR_{II}-gAD-Fc 的表达(如图 4(a)), 可见工程细胞株在无血清悬浮培养过程中持续累积分泌 sTNFR_{II}-gAD-Fc 融合蛋白。比较批次与流加培养细胞生长状况及 sTNFR_{II}-gAD-Fc 蛋白产量(如表 2), 流加培养的培养时间较批次培养延长, 蛋白产量也明显增加。此外, 由转瓶中流加培养放大到生物反应器中时, 细胞活力及密度保持较好, sTNFR_{II}-gAD-Fc 融合蛋白的产量也较稳定且有所提高, 提示小规模悬浮流加培养可放大, 为后期更大规模的流加培养奠定基础。

经 Protein A-Agarose 亲和层析分离纯化收获的培养上清时出现一个洗脱峰, 收集该峰, 经 6% SDS-

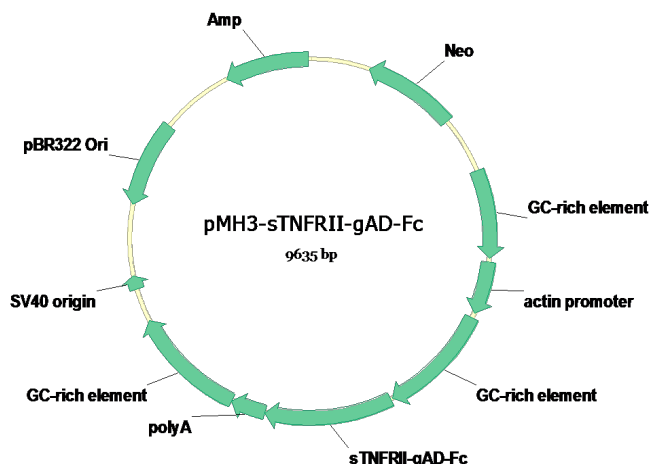


Figure 1. Diagrams of the recombinant plasmid pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc

图 1. pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc 质粒结构示意图

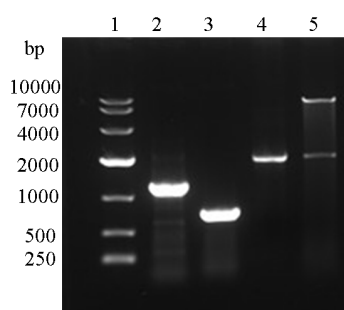


Figure 2. Identification of sTNFR_{II}-gAD-Fc and pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc by PCR and enzyme digestion. (Lane 1: DNA marker BM 10000; lane 2: sTNFR_{II}-gAD-Fc; lane 3: IgG1 Fc; lane 4: sTNFR_{II}-gAD-Fc; lane 5: pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc digested with EcoR I and Not I)

图 2. sTNFR_{II}-gAD-Fc 的 PCR 鉴定和 pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc 质粒的酶切鉴定

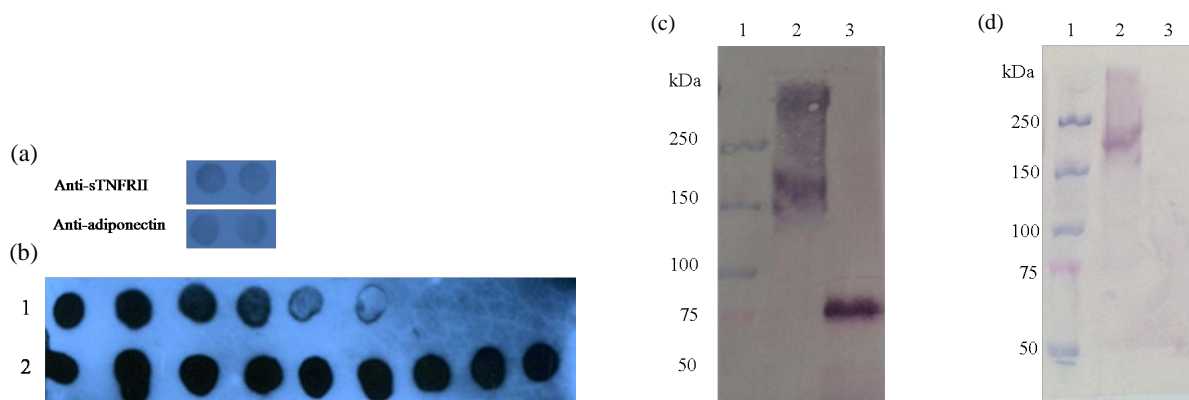


Figure 3. Dot blot and Western blot analysis of sTNFR_{II}-gAD-Fc fusion protein in the supernatants. (a) Confirmation of expression of sTNFR_{II}-gAD-Fc after transiently transfected for 24h by protein dot blot with monoclonal antibody against TNFR_{II} and adiponectin; (b) Semi-quantitative analysis of expression of sTNFR_{II}-gAD-Fc after clone selection by protein dot blot with monoclonal antibody against TNFR_{II}. Lanes 1: positive controls (sTNFR_{II}-Fc) at 5 μ L of 100 μ g/mL, 75 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12.5 μ g/mL and 6.25 μ g/mL; Lane 2: Supernatants from three of the 1st, 2nd, and 3rd hyper-expression clones after cultured for 24 h in 96-well plates. (c) and (d) Western blot analysis of sTNFR_{II}-gAD-Fc fusion protein with monoclonal antibody against adiponectin (c) and TNFR_{II} (d): Lane 1 molecular weight markers (kDa); lane 2 non-reduced sTNFR_{II}-gAD-Fc; lane 3 reduced sTNFR_{II}-gAD-Fc

图 3. 蛋白斑点杂交(a), (b)和免疫印迹分析(c), (d)鉴定培养上清中 sTNFR_{II}-gAD-Fc 融合蛋白的表达

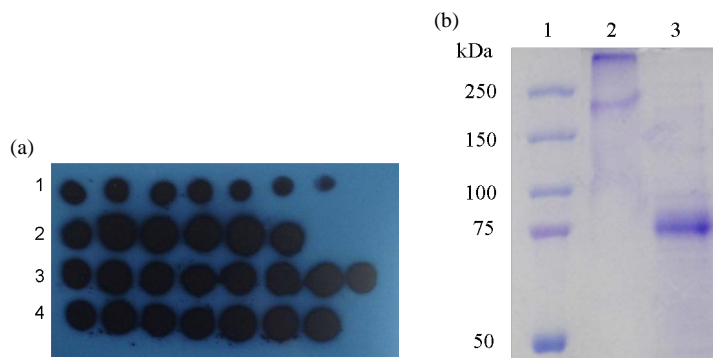


Figure 4. Confirmation of continuous expression of the fusion protein sTNFR_{II}-gAD-Fc by protein dot blot with monoclonal antibody against TNFR_{II} (a) and SDS-PAGE analysis of purified sTNFR_{II}-gAD-Fc (b). (a) Detection of sTNFR_{II}-gAD-Fc fusion protein in the supernatants of CHO-S/pMH3-sTNFR_{II}-gAD-Fc cells in batch and fed-batch cultures everyday. Lanes 1: positive controls (sTNFR_{II}-Fc) at 5 μ L of 100 μ g/mL, 75 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12.5 μ g/mL, 6.25 μ g/mL and 3.125 μ g/mL; lane 2: the supernatants of 60 mL batch culture; lane 3: the supernatants of 200 mL fed-batch culture; lane 4: the supernatants of 3 L fed-batch culture. (b) SDS-PAGE analysis of purified sTNFR_{II}-gAD-Fc. Lane 1, molecular weight markers (kDa); lane 2, nonreducing conditions; lane 3, reducing conditions

图 4. 蛋白斑点杂交分析验证融合蛋白的持续表达及 SDS-PAGE 分析

Table 2. Comparison of the growth and sTNFR_{II}-gAD fusion protein production of engineered cells in suspension batch and fed-batch cultures

表 2. 60 mL 批次培养和 200 mL 及 3 L 流加培养时工程细胞株生长情况及 sTNFR_{II}-gAD-Fc 蛋白产量比较

	60 mL batch culture	200 mL fed-batch culture	3 L fed-batch culture
Culture time (d)	6.00	8.00	7.00
Max cell density (cells/mL)	5.60	5.82	5.00
Collecting the supernatants (L)	0.06	0.22	3.30
Protein concentration (mg/L) ^a	10.00	18.30	20.50
Protein purity (%) ^b		95.00	

^aBCA 蛋白测定法检测, ^b用凝胶密度定量(数据未显示)。

PAGE 电泳分析, 结果与显示免疫印迹分析的条带位置一致(如图 4(b)), 说明该收集峰是 sTNFR_{II}-gAD-Fc 融合蛋白。

3.5. sTNFR_{II}-gAD-Fc 融合蛋白生物活性鉴定

体外检测了该融合蛋白对 TNF α 杀伤 L929 细胞的中和活性。结果表明 sTNFR_{II}-gAD-Fc 融合蛋白具有中和 TNF α 的活性(图 5), 且其抑制 TNF α 杀伤 L929 细胞的活性呈剂量依赖性($p < 0.05$)。

4. 讨论

TNF α 位于细胞因子免疫网络的中枢环节, 参与淋巴细胞的迁移、活化、增殖与分化以及淋巴组织的再生, 还可诱发细胞凋亡, 调节免疫反应, 促进慢性炎症的发生发展等。一旦组织中 TNF α 浓度过高或 TNF α 信号的持久激活, 将导致机体免疫环境和功能的紊乱, 诱发疾病如全身炎症反应综合征、风湿性关节炎、炎性肠病、糖尿病、癌症、同种异体移植排斥、多发硬化症等。TNF α 的生物学活性是通过细胞表面特异的受体传递信号的。因而, 用其受体中和过剩的 TNF α 是抗 TNF α 治疗最直接的策略。TNF α 受体分为 TNFR_I(p55) 和 TNFR_{II}(p75) 两种, 在自然状态下, TNF α 以同源三聚体的形式结合游离的或跨模型的 TNFR 从而激活胞内一系列信号转导途径引起相应的生物学效应。只有两个或两个以上的 TNFR 形成聚

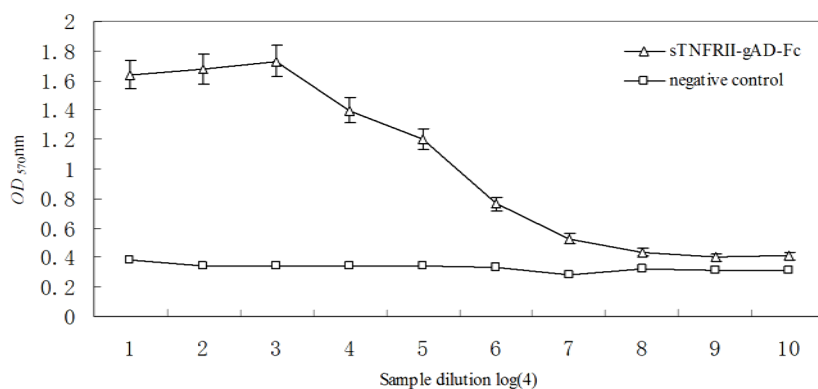


Figure 5. TNF α -neutralizing activity of sTNFRII-gAD-Fc fusion protein in the supernatant of serum-free cultures. All assays were performed in triplicate, with error bars representing the standard error of the mean of the samples ($p < 0.05$)

图 5. sTNFRII-gAD-Fc 融合蛋白对 TNF α 中和活性的检测

合体才能介导下游信号的传递，单个受体分子则不能传导信号。因此，为了使 TNFR 与 TNF α 更好地结合从而发挥拮抗 TNF α 的活性，我们模拟 TNF α 同源三聚体的复合物研发了 sTNFRII-gAD 融合蛋白，其在体内外均显示明显优于 sTNFRII-Fc 融合蛋白拮抗 TNF α 的活性[10]。但 sTNFRII-gAD 在制备过程中仍大量以单体蛋白形式存在，故本实验室借助 Fc 片段形成同源二聚体的效应对 sTNFRII-gAD 进行了改构，制备了 sTNFRII-gAD-Fc 融合蛋白，实现了 sTNFRII 的二聚体化及多聚体化。虽然没有出现预期的六聚体 sTNFRII，但却避免了低亲和力 sTNFRII 单体的形成。此外，IgG1 Fc 结构可延长该融合蛋白在血液循环中的半衰期。

近年来，已发展起来许多制备重组蛋白的表达系统，选择哪种表达系统取决于目的蛋白的天然性质及其用途。其中哺乳动物细胞用于表达外源蛋白越来越受重视，但是其存在着产量低，大规模细胞培养技术不成熟等缺陷。在此，利用富含 GC 的真核表达载体 pMH3 在可无血清悬浮生长的 CHO-S 细胞中表达 sTNFRII-gAD-Fc 融合蛋白，其优势是在结构基因和/或基因启动子的 5'和/或 3'端分别加入了一段非编码的富含 GC 的 DNA 片段(包括内含子)。一般染色体的开放性决定真核细胞基因表达水平，研究发现非编码的富含 GC 的 DNA 片段(包括内含子)是一种超级“打开染色质元件”[8]，参与哺乳动物细胞基因表达调控，有利于大幅度提高目的蛋白的表达量。在此，仅经过一轮的单克隆挑选(大约 1 个月)就通过斑点杂交(dot blot)方法半定量筛选出最高表达量相当于 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单克隆细胞株。随后进行第二、三轮的单克隆挑选筛选出更纯更稳定的高表达株。该方法避免了目前最常使用的、最成熟的哺乳动物细胞表达系统 CHO/dhfr 表达系统[11] [12]的不足，如通过大量的筛选及目的基因拷贝数的扩增来提高外源蛋白的表达水平，长期使用甲氨蝶呤(MTX)等筛选药物对细胞有一定的毒性且影响下游的蛋白纯化，大大缩短了生物制药的研发周期，减少了劳动力，降低了成本，因而具有更广阔的市场应用价值。

随着哺乳动物细胞培养技术的不断成熟，哺乳动物细胞大规模培养已成为生物制药行业最重要的技术之一，尤其是无血清悬浮培养技术。无血清培养基化学成分明确，杜绝了血清的外源性污染和对细胞的毒性作用，而且使产品易于纯化、回收率高、成本低。然而，当细胞从有血清的状态进入无血清环境时，由于存在代谢转换，会出现细胞生长缓慢甚至细胞死亡的现象，因此，细胞需要在无血清环境中逐渐适应才能高密度悬浮生长[13] [14]。尽管本实验选用的 CHO-S 细胞曾经经过无血清培养基 B001 成功悬浮驯化，但转染、G418 筛选及细胞单克隆化的过程均在有血清贴壁生长的情况下进行的，因而仍然需要对挑取的高表达细胞株进行无血清悬浮驯化培养，为后期大规模悬浮培养提供更加稳定高表达的工程细胞株。

细胞无血清悬浮培养包括批次培养、流加培养及灌注培养。批次培养较直观地反映了细胞在生物反应器中的生长及代谢变化,操作简单,但随着培养时间的延长,不断消耗的营养物质及积累的有害代谢产物(如氨、乳酸、甲基乙二醛)可能成为细胞密度、细胞活力及外源蛋白表达的主要限制因素[15]-[17]。本实验我们在 500 mL 摇瓶中进行批次培养观察蛋白的基础分泌表达,蛋白产量约 10.0 mg/L,由于营养等的限制,培养条件的转换等原因使得产量远不及单克隆在 96 孔板中 24 h 表达量。为解决细胞在批次培养过程中营养限制的问题,保证细胞高密度高活力生长,提高蛋白产量,又选择了流加培养。流加培养易操作、易放大、产量高,应用较为广泛。然而,流加培养效果的好坏直接影响细胞的生长及产品的表达量。我们初步探索了流加培养的工艺,采取逐级放大培养模式,从小规格的摇瓶及转瓶培养逐步扩大到生物反应器中。一般来说,合格的小规模培养工艺可以为大规模生产提供重要的参考,并能解决大规模生产过程中可能出现的一些问题[18]。本实验在悬浮流加培养过程中选择了适合 CHO-S 细胞悬浮生长的无血清培养基 B001,同时添加了 100 μ M 次黄嘌呤、16 μ M 胸腺嘧啶核苷及胰岛素生长因子(IGF)促进细胞生长,添加流加培养基 F001 以弥补长期培养过程中营养的消耗。选择 2.0×10^6 cells/mL 的初始接种密度,既能保证细胞高活力,又有利于缩短扩种时间。过早或过晚流加都会极大地影响流加的最终效果。过早流加,细胞的生长虽然不会出现营养不足,但会导致培养体系中营养过剩,增加了培养体系的渗透压,在培养后期有可能会抑制细胞的生长,导致细胞密度及活力下降。因此,当细胞生长进入平台期或产品生产期间歇(每隔 24 h 或 48 h)添加 F001,以葡萄糖水平作为流加体积的控制参数,经反馈法控制每日葡萄糖的残余量,使其维持在较低水平 2 g/L 左右,既能补充培养过程中营养物质的消耗,又保证了细胞高活力。Erika 等[19]曾报道,由于细胞存在易化运输和高亲和运输两个系统,细胞能在较低的葡萄糖浓度条件下生长。还有研究发现,在连续或间歇的流加培养过程中,将培养体系中葡萄糖的浓度限制在培养体系中较低的范围,可以使细胞的新陈代谢从高乳酸生产转为低乳酸生产[20],保持细胞的活力及最大生产力。本研究最终在转瓶和生物反应器中完成了流加培养,产量分别为 18.3 mg/L 和 20.5 mg/L,较批次培养有所提高,但是培养时间未得到明显延长,产量同样也没有单克隆在 96 孔板中培养 24 h 表达量高。因而,后期仍需进一步优化培养条件以提高产量,如控制合适的转速,尽量减少对细胞的剪切力,生产期适当的降温,低温可以延长细胞有丝分裂的时间,延迟新陈代谢,虽然这对 CHO 细胞生长有一定抑制性,但却可能提高重组蛋白的特异性表达[21] [22]。

本研究成功构建了 pMH3-sTNFR^{II}-gAD-Fc 表达载体,利用 CHO-S 细胞系统实现了 sTNFR^{II}-gAD-Fc 融合蛋白的快速高效表达,检测到 sTNFR^{II}-gAD-Fc 在培养上清中以二聚体和多聚体形式表达,获得了高表达(75 μ g/mL)单克隆细胞株,且该蛋白具有显著抑制 TNF α 杀伤 L929 细胞的活性。在摇瓶中无血清批次培养和转瓶及生物反应器中流加培养时产量分别为 10.0 mg/L、18.3 mg/L 和 20.5 mg/L,为建立一套高密度、高效表达该融合蛋白的悬浮流加培养中试工艺打下了良好基础。然而,大规模培养条件的优化、产品批次间的稳定性和过程成本的控制仍需要深入细致的研究。

基金项目

国家新药创新重大专项(No. 2009ZX09103-649),浙江省重大科技专项(Nos. 2008C14082, 2010C13007),卫生部科研基金(No. 201231029),浙江省教育厅科学基金(No. Y201016528),浙江省卫生高层次创新人才培养工程,浙江省研究生创新科研项目。

参考文献 (References)

- [1] Fernandez-Botran, R. (2000) Soluble cytokine receptors: Novel immunotherapeutic agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **9**, 497-514.
- [2] Mohler, K.M., Torrance, D.S., Smith, C.A., et al. (1993) Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective

therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *The Journal of Immunology*, **151**, 1548-1561.

- [3] Edwards 3rd, C.K., Martin, S.W., Seely, J., et al. (2003) Design of PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I (PEG sTNF-RI) for chronic inflammatory diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55**, 1315-1336.
- [4] Combs, T.P., Wagner, J.A., Berger, J., et al. (2002) Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPAR γ agonists: A potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology*, **143**, 998-1007.
- [5] 高基民 (2007) 可溶性肿瘤坏死因子受体 II-“脂联素”球部融合蛋白. 中国专利: 200510100468.9.
- [6] 陈素云, 何秋山, 董小岩 (2010) 可溶性肿瘤坏死因子受体 II-脂联素球部融合蛋白的真核表达及生物学活性检测. *生物工程学报*, **2**, 207-215.
- [7] 陆月, 刘丹, 张孝任 (2011) 腺病毒载体介导的重组蛋白 sTNFR_{II}-gAD 快速表达和制备. *生物工程学报*, **27**, 1239-1246.
- [8] Jia, Q., Wu, H. and Zhou, X. (2010) A “GC-rich” method for mammalian gene expression: A dominant role of non-coding DNA GC content in regulation of mammalian gene expression. *Science China Life Sciences*, **53**, 94-100.
- [9] 张翊, 高凯, 韩春梅 (2003) 重组人肿瘤坏死因子受体-Fc 融合蛋白质控方法和标准的研究. *药学学报*, **3**, 165-168.
- [10] Luo, M., Liu, D. and Zhang, L. (2012) Protective effects of a novel trimerized sTNFR_{II} on acute liver injury. *International Immunopharmacology*, **13**, 88-92.
- [11] Rosser, M.P., Xia, W. and Hartsell, S. (2005) Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: A rapid mammalian protein expression system. *Protein Expression and Purification*, **40**, 237-243.
- [12] Thomas, C.E., Ehrhardt, A. and Kay, M.A. (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, **4**, 346-358.
- [13] Kurano, N., Leist, C. and Messi, F. (1990) Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. Effects of physical and chemical environments. *Journal of Biotechnology*, **15**, 101-112.
- [14] Ozturk, S.S. and Palsson, B.O. (1991) Physiological changes during the adaption of hybridoma cells to low serum and serum-free media. *Biotechnology and Bioengineering*, **37**, 35-46.
- [15] Bibila, T.A. and Robinson, D.K. (1995) In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. *Biotechnology Progress*, **11**, 1-13.
- [16] Hesse, F. and Wagner, R. (2000) Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *Trends in Biotechnology*, **18**, 173-180.
- [17] Fletcher, T. (2005) Designing culture media for recombinant protein production: A rational approach. *BioProcess International*, **3**, 30-36.
- [18] Li, F., Hashimura, Y. and Pendleton, R. (2006) A systematic approach for scale-down model development and characterization of commercial cell culture processes. *Biotechnology Progress*, **22**, 696-703.
- [19] Spens, E. and Häggström, L. (2007) Defined protein and animal component-free NS0 fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, **98**, 1183-1194.
- [20] Xie, L.Z. and Wang, D.I.C. (1996) High cell density and high monoclonal antibody production through medium design and rational control in a bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **51**, 725-729.
- [21] Fox, S.R., Tan, H.K. and Tan, M.C. (2005) A detailed understanding of the enhanced hypothermic productivity of interferon- γ by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **41**, 255-264.
- [22] Fox, S.R., Yap, M.X. and Yap, M.G. (2005) Active hypothermic growth: A novel means for increasing total interferon- γ production by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **41**, 265-272.