

产尿激酶原 CHO 工程细胞无血清培养基的研究

陈昭烈 吴本传 贾熙华 刘红 肖成祖

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 在分析产尿激酶原 CHO 工程细胞对培养基中氨基酸和糖利用的基础上,对 DMEM:F12 (1:1) 进行初步优化。采用正交实验设计建立了无血清培养基 11G-SG-SFM 和 11G-SE-SFM。用 11G-SG-SFM 悬浮培养 11G 细胞,细胞增殖速率与含 5% 小牛血清 DMEM:F12 或 CHO-S-SFM 相当。用 11G-SE-SFM 培养 11G 细胞,细胞增殖缓慢,但有利于提高 11G 细胞表达 pro-UK 的水平,pro-UK 的表达水平比含 5% 小牛血清的 DMEM:F12 培养提高 80% 左右。

关键词 尿激酶原, CHO 工程细胞, 无血清培养基

随着无血清培养基研究的日益深入及其应用的逐步推广,无血清培养基(SFM)的优点已普遍地为人们所认识。就生物活性蛋白的生产而言,SFM 成分明确、质量一致,蛋白含量低,不仅有利于提高细胞产品生产的稳定性并使细胞产品易于纯化,同时也可使不同的细胞能各自在最有利其生长或最有利于表达目的产物的环境中持续高密度培养⁽¹⁾。因而随着越来越多的编码具有重要医用价值的人体蛋白基因相继在 CHO 工程细胞中获得高效表达^(2~5),要求有相应的无血清培养基来满足重组蛋白大量生产的需要。我们在对 DMEM:F12 (1:1) 进行初步优化的基础上,采用正交实验设计建立了适于产尿激酶原 CHO 工程细胞 11G 生长和有利于提高 pro-UK 表达的价格低廉的无血清培养基。

1 材料和方法

1.1 细胞

11G 细胞是用含尿激酶原(pro-UK)目的基因和 dhfr 标记的表达载体,经磷酸钙沉淀法转染 CHO-dhfr-细胞所建立的具有高效表达 pro-UK 表型的细胞株,尿激酶原的表达水平稳定在 10^6 细胞 400~600IU/d⁽⁶⁾ (由本所蛋白质工程研究室构建)。

1.2 培养基及培养基添加物

DMEM、F12、CHO-S-SFM 均为 GIBCO 产品。胰岛素、铁转运蛋白、D-果糖、微量元素混合液 A、脂混合液、腐胺、乙醇胺和 Pluronic F68 等购自 Sigma 公司。丝氨酸(Ser)、胱氨酸(Cys)、亮氨酸(Leu)、甲硫氨酸(Met)、小牛血清(NBS)、牛血清白蛋白(BSA)、丙酮酸钠、丁酸钠、硫酸亚铁、硫酸铜、硫酸锌、维生素 B₁、D-生物素、尼克酰胺等均为国产试剂。

1.3 DMEM:F12 (1:1) 的初步优化

用磺基水杨酸法处理细胞培养前后的 DMEM:F12 (1:1) 样品,然后用日立 835.50 型氨基酸自动分析仪分析 11G 细胞对培养基添加氨基酸的利用情况;用 4-AA-酚法测定培养基中葡萄糖浓度,根据分析结果调整培养基成分。

1.4 适于 11G 细胞生长的 SFM (11G-SG-SFM) 的设计

采用 L8 (2⁷) 正交模式, 以不含 NBS 的初步优化 DMEM : F12 (1 : 1) 为基础培养基, 以细胞的增殖效果为评价指标, 在 24 孔培养板分析肌醇、脂混合液、胰岛素、微量元素混合液 A、BSA、铁转运蛋白和腐胺等培养基中添加成分对 11G 细胞生长的影响, 继而用 L9 (3⁴) 正交模式验证 L8 (2⁷) 正交实验结果并观察微量元素混合液 B (FeSO₄ · 7H₂O 10μg · ml⁻¹、CuSO₄ · 5H₂O 25μg · ml⁻¹、ZnSO₄ · 7H₂O 15μg · ml⁻¹) 对 11G 细胞生长的影响, 确定有关因素的最佳水平。

1.5 有利于提高 11G 细胞表达 pro-UK 的 SFM (11G-SE-SFM) 的设计

以不含微量元素混合液 B 和脂混合液并把 BSA 减到 100μg · ml⁻¹ 的 11G-SG-SFM 为培养基, 以 11G 细胞表达 pro-UK 的效果为评价指标, 在 24 孔培养板采用 L8 (2⁷) 正交模式分析乙醇胺、微量元素混合液 A、微量元素混合液 B、B3P (0.5mol · L⁻¹ 丙酮酸钠、5mmol · L⁻¹ 腐胺、50mmol · L⁻¹ 丁酸钠)、脂混合液、肌醇和维生素混合液等培养基中成分对 11G 细胞表达 pro-UK 的影响。用 11G-SG-SFM 和 11G-SE-SFM 在 600ml 转瓶内培养 11G 细胞生产 pro-UK。

1.6 细胞计数

在方瓶、搅拌瓶和转瓶培养的 11G 细胞用细胞计数板直接计数; 用改良 MTT 比色法^[7]计数用 24 孔培养板培养的 11G 细胞。所用试剂四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 为 Fluka 产品, N, N-二甲基甲酰胺、Triton X-100 为国产试剂。

1.7 尿激酶原测定

采用琼脂糖-纤维蛋白-平板法^[8]。尿激酶标准品购自卫生部药品生物制品检定所。

2 结 果

2.1 11G 细胞对 DMEM : F12 中氨基酸和葡萄糖的利用及 DMEM : F12 的初步优化

从细胞培养前后培养基添加氨基酸的分析结果 (图 1) 看, 11G 细胞对 Ser、Cys、Leu 和 Met 的需要量相对较大, 培养基中上述 4 种氨基酸的含量相对不足。用低葡萄糖含量的 DMEM 和 F12 等量混合的培养基培养 11G 细胞, 细胞密度为 2 × 10⁶ · ml⁻¹, 培养 24h 后培养基中的葡萄糖几乎被完全消耗 (数据未列)。增加培养基中以上 4 种氨基酸的含量并补充 D-果糖对 DMEM : F12 进行初步优化 (表 1)。在相同的培养条件下 11G 细胞在初步优化 DMEM : F12 中的细胞密度和 pro-UK 表达量均比对照提高 10% ~ 20%。

表 1 初步优化的 DMEM : F12 (1 : 1)、11G-SG-SFM 和 11G-SE-SFM 的配方

Table 1 Composition of primary optimized DMEM : F12, 11G-SG-SFM and 11G-SE-SFM

Components	Primary optimized DMEM : F12	11G-SG-SFM	11G-SE-SFM
DMEM/g · L ⁻¹	5	5	5
F12/g · L ⁻¹	5.3	5.3	5.3
Fructose/g · L ⁻¹	2	2	2
Ser/mg · L ⁻¹	30	30	30
Cys/mg · L ⁻¹	50	50	50
Leu/mg · L ⁻¹	60	60	60
Met/mg · L ⁻¹	20	20	20
Glutamine/mmol · L ⁻¹	4	4	4
HEPES/mmol · L ⁻¹	5	5	5
NaHCO ₃ /g · L ⁻¹	1.2	1.2	1.2
NBS/%	5	—	—
Insulin/mg · L ⁻¹	—	5	5
BSA/mg · L ⁻¹	—	250	100
Trace element mix B/%	—	0.5	1
Lipid mixture/%	—	0.5	—
Inositol/mg · L ⁻¹	—	—	18
B3P/%	—	—	1

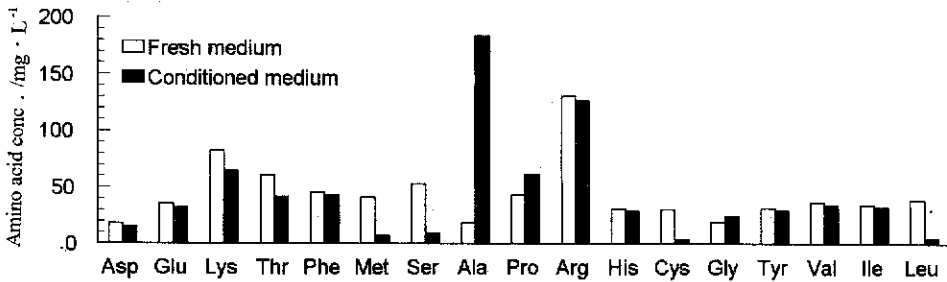


图 1 11G 细胞对 DMEM:F12 中氨基酸的利用

Fig. 1 Amino acids utilization of 11G cells in DMEM:F12

2.2 11G-SG-SFM 及其对 11G 细胞的生长和表达 pro-UK 的影响

从 L8(2⁷) 正交模式结果分析, 在不含 NBS 的初步优化 DMEM:F12 中, 加入 BSA、胰岛素和脂混合液均有利于 11G 细胞的生长, 其中以 BSA 的影响为最显著; 肌醇、微量元素混合液 A、铁转运蛋白和腐胺等培养基添加成分对 11G 细胞的生长无明显影响。BSA、胰岛素和脂混合液的添加量分别在 0.25~1g · L⁻¹、5~20mg · L⁻¹ 和 0.5%~2% 的剂量范围内对 11G 细胞生长的影响无明显差别。0.5%~1% 微量元素混合液 B 对 11G 细胞有轻微的生长刺激作用, 而当剂量增大至 2% 时, 对 11G 细胞生长有轻微的生长抑制作用。根据以上结果设计了适于 11G 细胞生长的无血清培养基 11G-SG-SFM (表 1)。用 11G-SG-SFM 悬浮培养 11G 细胞, 细胞的生长和 pro-UK 的表达效果与含 5%NBS 的 DMEM:F12 培养相当, 但 pro-UK 的表达水平只相当于用 CHO-S-SFM 培养的 60%~70% (图 2、3)。11G 细胞在 11G-SG-SFM 中连续传代, 其生长特性和表达 pro-UK 的能力均未发生改变。

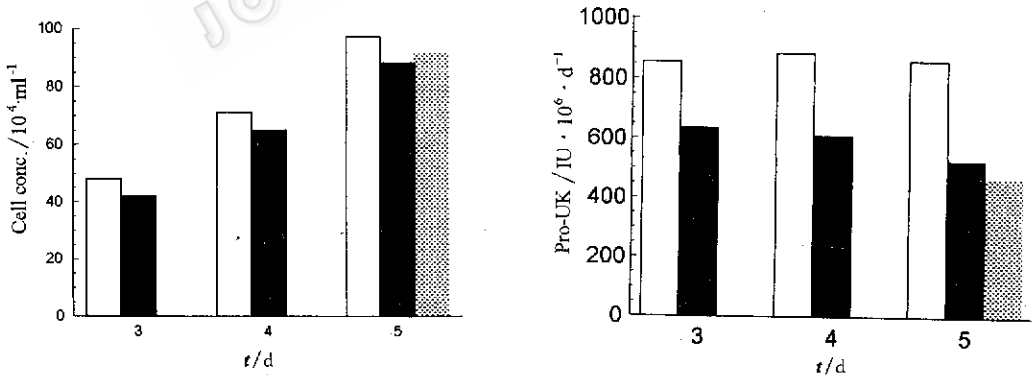


图 2 11G 细胞在 11G-SG-SFM 中的生长和 pro-UK 表达

Fig. 2 Growth and pro-UK expression of 11G cells in 11G-SG-SFM

□ CHO-S-SFM, ■ 11G-SG-SFM, ▨ DMEM:F12+5%NBS

2.3 11G-SE-SFM 及其对 11G 细胞的生长和表达 pro-UK 的影响

为了提高 11G 细胞在 SFM 中悬浮培养的 pro-UK 表达水平, 经 L8(2⁷) 正交模式分析, B3P、微量元素混合液 B 和肌醇有利于 11G 细胞表达 pro-UK, 其中以 B3P 的影响最大。乙醇胺、脂混合液、维生素合剂对 11G 细胞表达 pro-UK 无明显影响。把 B3P 和肌

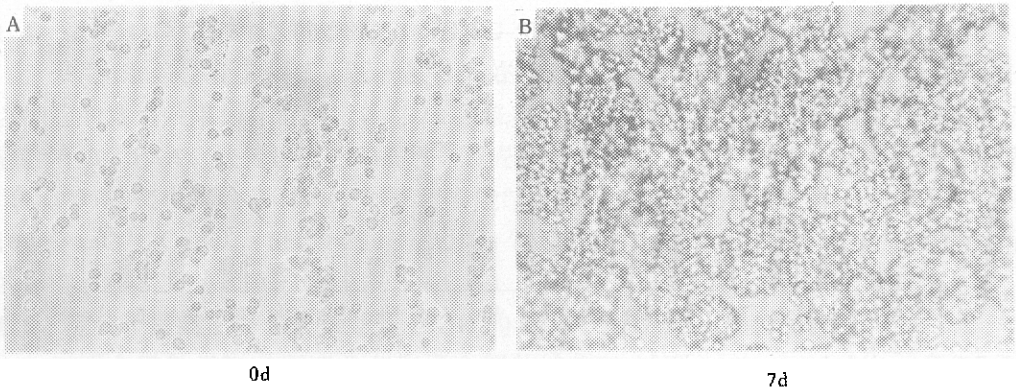


图 3 11G 细胞在 11G-SG-SFM 中生长

Fig. 3 Growth of 11G cells in 11G-SG-SFM

A. Inoculation, B. After 7 days cultivation

醇引入 11G-SG-SFM, 并把微量元素混合液 B 的添加量增加到 1% (v/v), 组成有利于提高 11G 细胞表达 pro-UK 的无血清培养基 11G-SE-SFM (表 1)。11G 细胞在 11G-SE-SFM 中生长缓慢, 但有利于 pro-UK 的表达, pro-UK 的表达水平达 $800 \sim 1000 \text{IU}/10^6 \cdot \text{d}$, 比用 CHO-S-SFM 和含 5%NBS 的 DMEM:F12 培养约分别提高 20% 和 80% (图 4)。

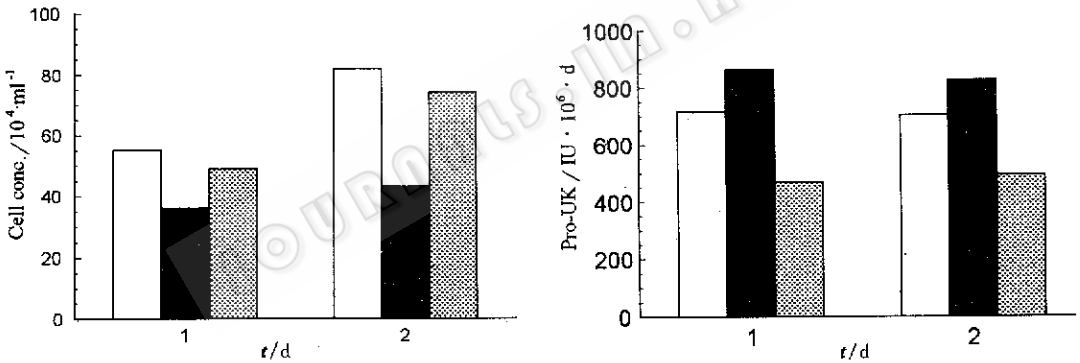


图 4 11G 细胞在 11G-SE-SFM 中的生长和 pro-UK 表达

Fig. 2 Growth and pro-UK expression of 11G cells in 11G-SE-SFM

□ CHO-S-SFM, ■ 11G-SE-SFM, ▨ DMEM:F12+5%NBS

2.4 在转瓶内用 SFM 培养 11G 细胞的生长和 pro-UK 表达

在 600ml 的转瓶内, 11G 细胞接种密度 $1.4 \times 10^5 \text{ml}^{-1}$, 用 11G-SG-SFM 培养 5d, 细胞密度达 $1.16 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, pro-UK 的表达水平为 $502 \text{IU}/10^6 \cdot \text{d}$ 。改用 11G-SE-SFM 培养, 11G 细胞密度自第 7 天起呈缓慢下降趋势, 第 13 天细胞密度降至 $8.8 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$, 但 pro-UK 的表达一直维持在 $885 \pm 126 \text{IU}/10^6 \cdot \text{d}$ 的较高水平。

3 讨 论

目前用于设计动物细胞无血清培养基的方法仍沿用 Ham 所创立的限制性因素分析法 (Limiting factor approach)^[9]。由于动物细胞 SFM 的组成复杂, 且不同细胞的培养基组成可能存在显著的不同^[10]。传统的限制性因素分析法存在工作量大, 效率低的突出缺点。正

交实验设计是优化动物细胞培养基, 尤其是设计用于动物细胞培养和细胞产品生产的 SFM 的一种高效方法。

Hosio 等^[11]认为理想的用于大规模生产生物活性蛋白的细胞株, 应该是可以高密度悬浮培养的细胞。CHO 细胞虽然具有兼性贴壁生长的特性, 但因 CHO 工程细胞都是在含血清的培养基中细胞呈贴壁生长状态下构建的。因而用无血清培养基悬浮培养 CHO 工程细胞生产重组蛋白的前提是, 细胞在从含血清培养基贴壁生长转入无血清培养基悬浮培养的过程中, 不影响目的基因的有效表达^[12]。11G 细胞在从含 5%NBS 的 DMEM : F12 培养基中贴壁生长转入用 11G-SG-SFM 悬浮培养不影响 11G 细胞表达 pro-UK 且细胞无需经低血清培养适应, 表明 11G-SG-SFM 可用于悬浮培养 11G 细胞生产 pro-UK 的实际应用。

在细胞培养达到一定密度后, 尽可能延长生物活性蛋白生产期的细胞培养时间, 是 SFM 在生产生物活性蛋白应用中的一个引人关注的研究内容^[1]。丁酸钠是具有抑制细胞生长和诱导蛋白质合成等作用的培养基添加成分^[13]。用含 B3P 的 11G-SE-SFM 培养 11G 细胞, 有利于 pro-UK 表达水平的提高, 但细胞生长缓慢, 有利于延长 pro-UK 生产期的细胞培养时间, 提高 pro-UK 的生产效率。

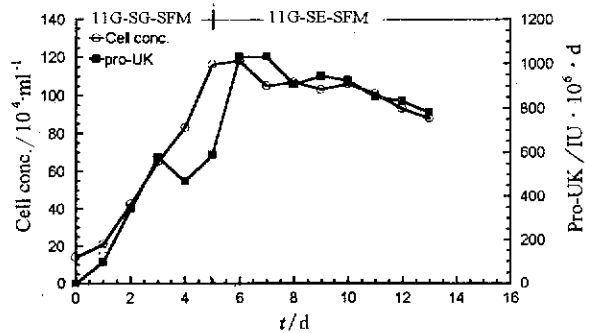


图5 在转瓶内用 SFM 培养 11G 细胞的细胞生长和 pro-UK 表达

Fig. 5 Growth and pro-UK expression of 11G cells in SFM in roller bottle

参 考 文 献

- [1] Murakami H. Cytotechnology, 1990, 3: 3~7.
- [2] Nelles L, Lijinen H R, Collen D *et al.* J Biol Chem, 1987, 262: 5682~5686.
- [3] Friedman J S, Cofer G L, Anderson C L *et al.* Bio/technology, 1989, 7: 359~362.
- [4] Kaufman R J, Wasley L C, Furie B C *et al.* J Biol Chem, 1986, 261: 9622~9628.
- [5] Zebtlemeissel G, Ragg H, Furid B C *et al.* Biotechnology, 1987, 5: 720~725.
- [6] 李 军, 李凤知, 俞炜源等. 生物技术通讯, 1993, 4: 35~38.
- [7] 贾熙华, 肖成祖. 军事医学科学院院刊, 1993, 17: 207~211.
- [8] 韩蒙文, 俞炜源, 李秀珍等. 军事医学科学院院刊, 1987, 11: 101~118.
- [9] Ham R G. Handbook of Experimental Pharmacology, 1981, Vol. 57, pp. 13~58.
- [10] Waymouth C. Cell Culture Methods for Molecular and Cell Biology, New York, Alan R. Liss, 1984, Vol. 1 pp. 23~68.
- [11] Hosio S, Miyaji H, Satoh M *et al.* Cytotechnology, 1991, 5 (Suppl): 17~34.
- [12] Broad D, Boraston, Rhodes M *et al.* Cytotechnology, 1991, 5: 47~55.
- [13] Kruh J. Molecular and Biochemistry, 1982, 42: 65~82.

Study on Serum-free Media for Genetically-engineered CHO Cells Producing Prourokinase

Chen Zhaolie Wu Benchuan Jia Xihua Liu Hong Xiao Chengzu

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract Bsaed on the initial optimization of DMEM/F12 (1 : 1), two kinds of serum-free media, 11G-SG-SFM and 11G-SG-SFM were formulated by using orthogonally designed experiments for the growth of genetically-engineered CHO cell line 11G and the expression of recombinant prourokinase in suspension culture, respectively. Growth of 11G cells in 11G-SG-SFM was comparable with that observed in DMEM/F12 (1 : 1) + 5% (v/v) NBS and CHO-S-SFM. 11G cells grew slowly in 11G-SE-SFM, but secreted relative high levels of recombinant prourikinase. The prourokinase productivity of 11G cells in 11G-SG-SFM reached 800~1000IU/10⁶ · d and was about 80% and 20% higher than in DMEM/F12+5% NBS and CHO-S-SFM, respectively.

Key words Prourokinase, genetically-engineered CHO cell, serum-free medium