

## 昆虫细胞-杆状病毒表达系统表达尿激酶原\*

孙洪亮 常韶华 李佐虎

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

**摘 要** 在转瓶和 2L 搅拌反应器中,利用重组杆状病毒 AcNPV 感染 sf9 昆虫细胞表达尿激酶原。在转瓶中,细胞接毒密度  $1.2 \times 10^6$ /mL、MOI = 30 时,尿激酶原活性达到 1065IU/mL。研究了尿激酶原表达过程中葡萄糖、乳酸的代谢变化。实验结果表明细胞状态对尿激酶原的表达水平有显著影响。

**关键词** sf9 昆虫细胞,杆状病毒,悬浮培养,尿激酶原

**分类号** Q781 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0373-77

昆虫细胞-杆状病毒表达系统可用于表达一系列在医药和科学研究上有重要应用价值的蛋白<sup>[1]</sup>,已有 200 多种蛋白在该体系表达成功<sup>[2]</sup>。与其他表达系统相比具有表达水平高,可进行翻译后修饰,产生具有生物活性的蛋白和糖蛋白<sup>[3]</sup>。因此昆虫细胞-杆状病毒表达系统是当前昆虫细胞培养研究的热点和重点。苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(AcNPV)是该表达系统中常用的外源基因载体,对应的寄主细胞通常为取自秋行军虫的 sf9 细胞<sup>[1]</sup>。尿激酶原(ProUK)是一种纤维蛋白溶酶原的激活剂,是目前治疗血栓性疾病一类较好的溶栓药物<sup>[4]</sup>,在医疗上有重要的应用价值。本文将研究尿激酶原(ProUK)在 sf9 昆虫细胞中的表达特点。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 细胞和病毒株

**1.1.1 细胞:** 采用来源于秋行军虫蛹卵巢的 sf9 昆虫细胞,由北京大学生命科学院胡美浩教授提供。使用 TC-100 昆虫细胞培养基(GIBCO 公司)培养,添加体积百分比 10% 的小牛血清(北京西郊奶牛场)。

**1.1.2 病毒株:** 尿激酶原重组昆虫细胞杆状病毒由北京大学生命科学院惠赠。

#### 1.2 转瓶培养和反应器培养

**1.2.1 转瓶培养:** 用 600mL 自制转瓶,培养体积 170mL。置于 27℃ 恒温培养箱内的磁力搅拌器上,搅拌转速 80~100r/min。

**1.2.2 反应器培养:** 2L 搅拌反应器(LH 公司),培养体积 750mL,螺旋桨(Marine impeller),搅拌转速 100r/min。表面通气供氧,结合使用空气和氧气保持溶氧水平 DO 在 50% 空气饱和度以上。

\* 国家自然科学基金项目资助(No. 29676043)。

收稿日期:1998-05-11,修回日期:1998-12-08。

### 1.3 分析

1.3.1 细胞密度测定：采用血球计数板计数，活细胞由 0.1% 的台盼蓝染色判断。

1.3.2 葡萄糖、乳酸浓度：采用葡萄糖、乳酸分析仪 YSI-2700 (YSI 公司) 分析。

1.3.3 尿激酶原活性测定：用纤维蛋白琼脂糖平板法测定。

### 1.4 比生长速率和葡萄糖比消耗速率的计算

细胞比生长速率  $\mu$  的定义如下：

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

细胞在指数生长期内细胞比生长速率  $\mu$  基本不变，对(1)式积分

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

由细胞生长曲线的对数图很容易确定细胞的指数生长期。截取细胞指数生长期的实验点对(2)式进行拟合，拟合参数为  $X_0, \mu$ 。

葡萄糖比消耗速率  $q_{02}$  的定义式如下：

$$q_{02} = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (3)$$

(3)比(1)式：

$$q_{02} = \mu \frac{dS}{dX} \quad (4)$$

细胞指数生长期葡萄糖比消耗速率  $q_{02}$  的计算采用(4)式，指数生长期内实验点的葡萄糖浓度对细胞密度作图，由直线斜率求得  $\frac{dS}{dX}$ ，再乘以指数生长期细胞的比生长速率  $\mu$ 。

图中葡萄糖比消耗速率  $q_{02}$  对时间的曲线中  $q_{02}$  是两个取样点间平均葡萄糖比消耗率，求法如下：

$$q_{02} = \frac{2}{X_1 + X_2} \frac{\Delta S}{\Delta t} \quad (5)$$

(5)式是(3)式的近似式， $x_1$  和  $x_2$  是两取样点的细胞密度； $\Delta S$  是两取样点葡萄糖浓度的变化值； $\Delta t$  是两取样点时间间隔。所求得  $q_{02}$  的时间坐标是对应两取样点时间的平均值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 尿激酶原在 2L 搅拌反应器中的表达

图 1 给出了采用表面通气方式表达尿激酶原(ProUK)的反应器实验，实验代号 sr2。细胞在接毒之前细胞正常生长，指数生长期比生长速率  $0.020 \pm 0.002 \text{h}^{-1}$  (95% 置信度)，葡萄糖比消耗率  $14 \mu\text{g}/10^6 \text{cells} \cdot \text{h}$ 。167.5h 指数生长中期感染细胞，MOI (Multiplicity of infection)

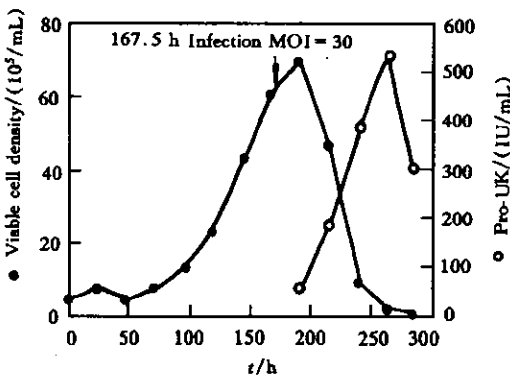


图 1 尿激酶原在 2L 机械搅拌反应器中的表达  
Fig. 1 Expression of ProUK in 2L agitated bioreactor

= 3。接毒后细胞减速增长,在 24hpi(Hours post infection)达到  $6.9 \times 10^5/\text{mL}$  的最大活细胞密度,随后迅速下降。同时尿激酶原的活性迅速上升,在 95.7hpi 到达 533IU/mL 的最大活性。尿激酶原易失活,达到最大活性后 19.3h,活性锐减到 301IU/mL,降低了 44%,可能是细胞大量破碎后细胞内的水解酶的大量释放,导致尿激酶原的失活<sup>[5]</sup>。

## 2.2 尿激酶原在转瓶中的表达

图 2 是尿激酶原在转瓶中的表达实验,实验代号 sr9p。细胞接种后没有延迟期,细胞比生长速率  $0.028 \pm 0.004\text{h}^{-1}$  (95% 置信度),葡萄糖比消耗率  $12\mu\text{g}/10^6\text{cells}\cdot\text{h}$ ,同 sr2 反应器实验比较,生长快,葡萄糖比消耗率小,说明在接毒时细胞处于良好的状态之中。47.8h 接毒,接毒细胞密度  $1.2 \times 10^6/\text{mL}$ , MOI = 30。在营养充分的前提下,MOI 对重组蛋白的细胞平均表达水平没有显著的影响<sup>[6]</sup>。sr9p 较高的接毒细胞密度要求较高的 MOI。细胞接毒后密度先缓慢下降,47.2hpi 后转为迅速下降,细胞活性同时迅速降低,细胞开始大量裂解。表达尿激酶原的外源基因取代了 AcNPV 杆状病毒的多角体蛋白基因,在 AcNPV 杆状病毒生活史中多角体蛋白在病毒繁殖后期开始表达<sup>[7]</sup>,因此尿激酶原在病毒繁殖后期表达,并随着细胞的裂解而大量释放,活性迅速升高。裂解前细胞膜的通透性逐渐增加,因此一部分尿激酶原在细胞裂解之前可透过细胞膜<sup>[7]</sup>,培养基中的尿激酶原活性在细胞裂解之前就开始升高。sr9p 尿激酶原活性在 96.2hpi 达到最大值 1065IU/mL,并在随后 23h 内降到 650IU/mL,降低了 30%,再次表明尿激酶原极易失活,需要考虑尿激酶原的保护。由于尿激酶原的活性测定需要 10~14h,尿激酶原活性不能在线即时监测,而尿激酶原失活的速度很快,在实际应用中需要较准确的预测尿激酶原达到活性最大值的时刻。

2.3 尿激酶原表达时的葡萄糖、乳酸代谢

图 3,图 4 分别是 sr2 和 sr9p 的葡萄糖、乳酸代谢曲线。sr9p 接毒后葡萄糖和乳酸浓度升高,是由于接毒液中葡萄糖和乳酸的浓度较高所至。sr2、sr9p 在尿激酶原达到最大活性时葡萄糖浓度均未降为 0,营养基本没有抑制尿激酶的表达。sr2 接毒后细胞的葡萄糖比消耗率平均为  $16\mu\text{g}/10^6\text{cells}\cdot\text{h}$  (标准误差  $3\mu\text{g}/10^6\text{cells}\cdot\text{h}$ , 自由度 4),比接毒前的  $14\mu\text{g}/10^6\text{cells}\cdot\text{h}$  (标准误差  $2.5\mu\text{g}/10^6\text{cells}\cdot\text{h}$ , 自由度 4)略高,  $t$ -检验二者之间没有显著性差异(显著性水平 95%),葡萄糖比消耗率接毒前后基本不变。sr9p 葡萄糖比消耗率接毒后初期基本同接毒前,但随着细胞的大量解体而逐渐下降,整个培养期间葡萄糖比消耗率都比 sr2 低。sr2 和 sr9p 的共同点是接毒前乳酸积累较慢或基本不积累,但大约接毒一天后都开始明显积累。细胞染毒后,能量代谢的效率降低,表现在乳酸生成量相对于葡萄糖消耗量的比例变高(见表 1),因此细胞接毒后细胞的代谢不同于细胞生长期,随病毒繁殖的进行细胞正常的代谢被打破,可能大部分胞内资源用于病毒的复制,细胞机构得不到

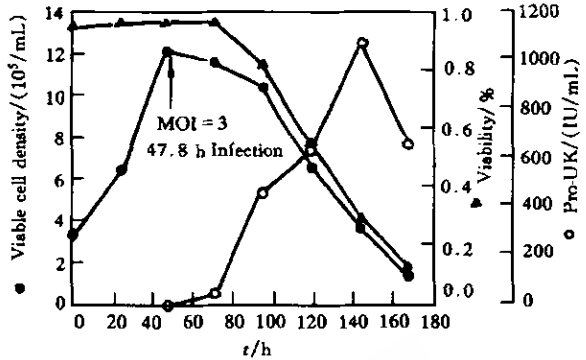


图 2 尿激酶原在转瓶中的表达

Fig.2 Expression of ProUK in the spinner-flask

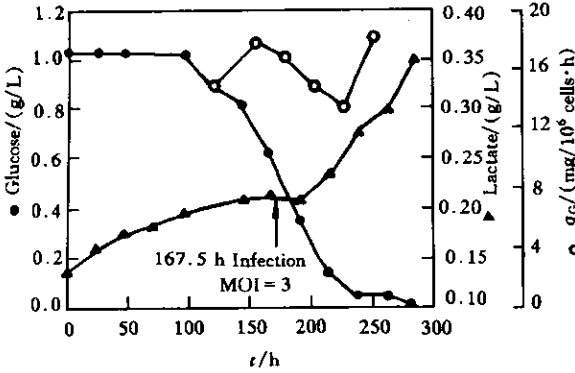


图3 sr2 尿激酶原在2L 机械搅拌反应器表达时的葡萄糖、乳酸代谢

Fig.3 Metabolism of glucose and lactate during the expression of ProUK in 2L bioreactor

联。葡萄糖和乳酸的代谢反映了细胞对葡萄糖的利用率,可作为细胞状态的衡量标准之一,此点上 sr9p 细胞的状态要好于 sr2。

### 3 结 论

在本文实验条件下,反应器和转瓶中细胞的流体环境相似,而且本实验室的工作表明 sf9 昆虫细胞在二者中细胞的生长和尿激酶原的表达不受流体环境的影响。因此反应器和转瓶尿激酶原的表达水平的差异是二者细胞状态不同的结果。

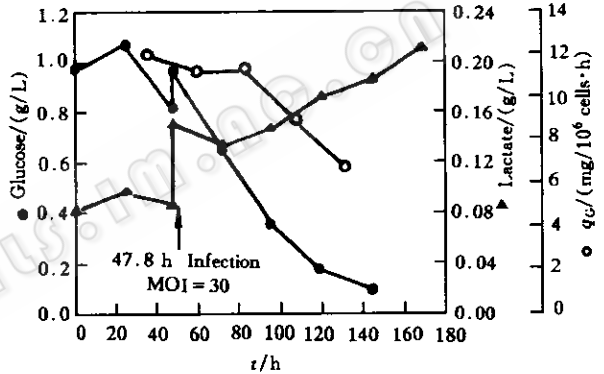


图4 sr9p 尿激酶原在转瓶中表达时葡萄糖、乳酸代谢

Fig.4 Metabolism of glucose and lactate during the expression of ProUK in spinner-flask

表 1 细胞接毒后能量代谢情况

Table 1 Metabolism of energy after infection

|      | Time step/h                           | 167.5~191 | 191~215 | 215~239 |
|------|---------------------------------------|-----------|---------|---------|
| sr2  | (Lactic acid yield/Glucose consume)/% | 3         | 13      | 49      |
|      | Time step/h                           | 71~95     | 95~119  | 119~144 |
| sr9p | (Lactic acid yield/Glucose consume)/% | 4         | 14      | 15      |

sr9p 相较 sr2 细胞比生长速率高,葡萄糖比消耗速率小,细胞生命活动效率高,允许在同样的营养条件下支持更多的细胞用于表达尿激酶原,所以培养所获得的最大尿激酶原活性提高了约 1 倍。良好的细胞状态是尿激酶原高效表达的关键。细胞的比生长速率和乳酸生成/葡萄糖消耗之比可用于衡量细胞的状态。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 邓继先, 萧成祖. 生物工程进展, 1993, 13(4): 53~56.
- [ 2 ] V. A. Luckow. Recombinant DNA Technology and Applications. New York: McGraw - Hill. 1991, pp. 97~152
- [ 3 ] S. H. Lee, T. H. Park. *Biotechnol. Lett.* 1994, 16(4): 327~332.
- [ 4 ] 孙天宵, 徐长法. 生物工程进展, 1996, 16(2): 43~49.
- [ 5 ] M. Y. Wang, T. R. Pulliam, M. Valle *et al.* *Journal of Biotechnolog.* 1996, 46: 243~254.
- [ 6 ] Radford Karthryn M., Cavegn Catherine, Bertrand Martine *et al.* *Cytotechnology*, 1997, 24: 73~81.
- [ 7 ] F. Power John, Raid Steven, K. M. Radford *et al.* *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44: 710~719.

### Expression of Recombinant Protein ProUK with Baculovirus Expression Vector System in sf9 Insect Cell Suspension Culture\*

Sun Hongliang Chang Shaohua Li Zuohu

(Institute of Chemical Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** The expression of recombinant protein prourokinase (ProUK) with baculovirus expression vector system was studied in sf9 insect cell suspension culture using spinner flask and bioreactor. The expression level 1065IU/mL of ProUK was achieved in spinner flask when MOI = 30 and the infecting cell density  $1.2 \times 10^6$  cells/mL. The metabolism of glucose and lactate was researched also. The good cell state was very important for maximizing expression of ProUK.

**Key words** Insect cell sf9, baculovirus, suspension culture, prourokinase (ProUK)

\* Project of Chinese National Natural Science Fund for Free Application(No.29676043).