

凝血因子 VII 高表达细胞的高通量筛选方法

彭林¹, 李成媛², 熊文典², 蔡燕飞², 金坚², 李华钟^{*1}

(1. 江南大学 生物工程学院/工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 针对哺乳动物细胞表达克隆的耗时较长的筛选过程, 作者通过流式细胞仪对细胞进行快速筛选和纯度检测。利用流式细胞仪对电转细胞进行分选, 利用点杂交和 western blot 方法筛选高表达克隆。流式细胞仪分选后的细胞, 经点杂交和 WB 检测后获得的 CHO-rFVII-1 细胞, 表达 rFVII 细胞的比例为 99.9%, 同时与传统筛选方法获得的 CHO-rFVII 克隆比较后发现, 两株细胞具有相同的 rFVII 产量。作者基于流式细胞仪建立了快速筛选高表达重组药物蛋白克隆的筛选的高通量方法和纯度检测的方法, 为其他在哺乳动物细胞中表达重组蛋白的筛选提供参考。

关键词: 高通量; 中国仓鼠卵巢细胞; 流式细胞仪; 重组蛋白

中图分类号: Q 814 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)07-0722-05

High-Throughput Method for Screening Recombinant Coagulation Factor VII Expressing Cells

PENG Lin¹, LI Chengyuan², XIONG Wendian², CAI Yanfei², JIN Jian², LI Huazhong^{*1}

(1. School of Biotechnology / Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To overcome the time-consuming screening process, mammalian cells expressing recombinant therapeutic protein were selected by flow cytometry and method of cell purity analysis was established. Transfected CHO cells were sorted by flow cytometer and high expression sub-clone was screened by dot blot and western blot. CHO cells after transfecting with rFVII expression vector were divided by flow cytometry to 96 micro-plates and recombinant coagulation factor VII expression was analyzed by dot blot and western blot. High rFVII expression clone, CHO-rFVII-1, was obtained and the purity of CHO-rFVII-1 was 99.9%. Moreover, CHO-rFVII-1 had similar viable cell density and rFVII expression compared to CHO-rFVII, which was obtained by traditional screening method. Screening high expression clones by flow cytometry was a rapid and high-throughput method and will be beneficial to screen high recombinant therapeutic protein expression clone in other mammalian cells.

Keywords: high-throughput, CHO, flow cytometry, recombinant protein

收稿日期: 2016-04-01

基金项目: 国家 863 计划项目(2014AA021003)。

作者简介: 彭林(1987—), 男, 蒙古族, 内蒙古呼伦贝尔人, 发酵工程专业博士研究生。E-mail: leogard2005@163.com

* 通信作者: 李华钟(1958—), 男, 山东龙口人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物制药研究。E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

引用本文: 彭林, 李成媛, 熊文典, 等. 凝血因子 VII 高表达细胞的高通量筛选方法[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(07): 722-726.

自 1987 年第一款重组蛋白药物人组织纤溶酶原激活剂(tPA)批准销售,至今已有超过 200 种重组蛋白药物用于治疗多种疾病,包括单克隆抗体、激素、生长因子和其他融合蛋白^[1]。同时重组蛋白药物的销售利润也在 2012 年超过 1 600 亿美元,这显示了重组药物蛋白庞大的市场前景^[2]。目前,多种表达宿主用于表达生产重组药物蛋白,如原核细胞的大肠杆菌和简单真核细胞的酵母等。重组药物蛋白主要用于人类疾病的治疗,而表达宿主的差异可能由于蛋白合成过程中翻译后修饰方面的差异,从而导致在临床使用中引起毒副作用^[3],因此具有和人相近的哺乳动物细胞成为越来越多药物蛋白的表达宿主。较为常见的哺乳动物细胞包括中国仓鼠卵巢巢细胞(CHO)、幼仓鼠肾细胞(BHK)等,而 CHO 细胞具有成熟的无血清培养体系 and 大规模生产技术手段,其生产的重组药物蛋白更易通过 FDA 的批准^[4-5]。

利用 CHO 细胞表达重组药物蛋白,在转入目的蛋白编码基因后需要通过基因缺陷或抗性标记等方法,从中选出阳性高表达克隆,目前主要采用二氢叶酸还原酶基因缺陷型 CHO 细胞或带有抗性的质粒进行筛选^[6]。传统方法中需要将转入基因的细胞稀释后贴壁生长于平板中,单一细胞在相应环境生长后检测重组蛋白表达量后进行挑选。虽然此方法可获得重组药物蛋白的表达细胞系,但挑选过程需要人工完成并耗时较长,为获得较纯的单一细胞系依赖于个人经验。作者在构建表达重组凝血因子七(rFVII)的过程中,利用流式细胞仪对转入 *fvi* 基因的 CHO 细胞分选并检测,同时将最终获得的 rFVII 表达克隆与传统方法下获得克隆进行比较,探讨该方法的可行性,建立快速高通量的筛选方法并其他重组药物蛋白表达细胞提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒和细胞 pMH3 质粒和中国仓鼠卵巢巢细胞(CHO-K1)购自杭州 AmProtein 公司,含有 FVII 编码基因的 pINC9-rFVII 质粒由苏州大学提供。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Not* I 和 *Eco*R I: Ferments 公司产品;DMEM/F12 培养基和胎牛血清(FBS):Gibco 公司产品;无血清培养基 B001: AmProtein 公司产品;山羊抗人 FVII 抗体:Cedarlane

Labs 公司产品;rFVII Elisa 检测试剂盒:Assaypro 公司产品;Alexa Fluor 488 兔抗山羊二抗:Invitrogen 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建及酶切验证 将 FVII 编码基因利用设计引物通过 PCR 方法获得两段分别为 *Not* I 和 *Eco*R I 酶切位点的基因序列,酶切后连接于 pMH3 获得 pMH3/rFVII,构建的质粒酶切后在 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳验证。同时,pMH3/rFVII 送至上海生工进行测序验证。

1.2.2 细胞分选 在 MoFlo XDP 流式细胞仪(Beckman Coulter 公司)中,以 PBS 溶液为流动相,通过设定 96 孔板每孔不同细胞数进行细胞分选,分选后的 96 孔板每孔含有 200 μ L 含有质量分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基,于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 2 周,统计每个 96 孔板中含有细胞生长的孔数。

1.2.3 构建并筛选 rFVII 表达细胞 通过电转方法将 rFVII 编码基因转入 CHO 细胞中,电转反应体系(200 μ L): 3×10^6 个 CHO 细胞、20 μ g 质粒、10 μ g 鲑鱼精 DNA,电转条件为 400 V、500 μ s 条件电击 3 次。电转后细胞在 1.8 mg/mL G418 筛选后经流式细胞仪分选至 96 孔板,于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 2 周后用于免疫印迹检测。通过点杂交筛选 96 孔板中分选的细胞后,将高表达克隆转至 24 孔板培养并利用 Western Blot(WB)检测,最终获得 rFVII 的 CHO 表达细胞。

1.2.4 免疫印迹检测 点杂交:将 96 孔板中的培养基换为无血清培养基 B001 生长 2 d,在 PVDF 膜滴加 5 μ L 待检测样品,烘干后利用脱脂牛奶封闭,用 TBST 清洗后加入 FVII 抗体稀释液(利用 TBST 以 1:3 000 比例稀释),室温孵育 3 h,经 TBST 清洗 3 次,每次 15 min,最后利用化学发光显色液 ECL 进行显色检测。WB:将样品经 10 g/dL SDS-PAGE 凝胶分离后在转膜缓冲液中转至 PDVF 膜中,转膜条件为 100 V 电压、400 mA 电流下 1 h,PDVF 膜经封闭和孵育 FVII 抗体后由 ECL 显色,具体过程与点杂交相同。

1.2.5 rFVII 表达细胞的纯度检测 将细胞消化重悬后利用体积分数 4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 溶液清洗后质量分数 0.2% Triton 通透 10 min,PBS 溶液清洗后在质量分数 5% BSA 中封闭 30 min,

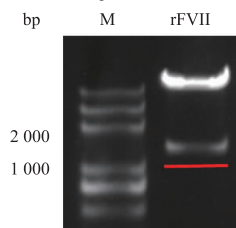
PBS 清洗后 PBS 以体积比 1:3 000 比例稀释的 FVII 抗体室温孵育 2 h, PBS 溶液清洗后利用 Alexa Fluor 488 兔抗山羊二抗孵育 1 h, PBS 溶液清洗后利用流式细胞仪检测。

1.2.6 悬浮培养 将 rFVII 表达细胞转至 T75 培养瓶中, 以质量分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基、37 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 2 d, 消化后离心去除培养基并用 20 mL 无血清培养基于 T75 培养瓶中悬浮培养 2 d, 细胞经离心后以 1×10⁶ 个/mL 浓度接种至 250 mL 三角瓶中用 B001 培养, 培养条件为 37 °C、100 r/min。细胞悬浮培养过程中不同时间的细胞经台盼蓝染色后, 利用血球板计算其中活细胞数目。rFVII 浓度通过 Elisa 试剂盒 (Assaypro 公司) 检测, 检测方法依照试剂盒说明书。

2 结果与讨论

2.1 表达质粒酶切验证

以 pINC9-rFVII 质粒为模板, 通过 PCR 方法获得两侧分别为 *Not* I 和 *Eco*R I 酶切位点的基因片段, 将片段与 pMH3 质粒酶切后连接, 最终获得表达质粒 pMH3/rFVII, 表达质粒分别通过酶切验证 (图 1) 和测序, 最终确定所获得的 pMH3/rFVII 与设计一致, 用于后续电转。



M: marker, rFVII: rFVII expression plasmid

图 1 pMH3/rFVII 质粒的酶切验证

Fig. 1 Identification of plasmid pMH3/rFVII by double enzymatic digestion

2.2 细胞分选条件的设定

MoFlo XDP 流式细胞仪在使用中可以设定 96 孔板中每孔细胞数, 设置每孔分选细胞数可以显著影响细胞在 96 孔板中的生长, 较小的细胞数设定导致生长细胞的孔数较为明显的下降。96 孔板中生长有细胞的孔数一方面受仪器的限制无法使所有 96 孔板分选到细胞, 另一方面可能分选加入的细胞在培养过程中死亡, 因此需要调整流式细胞仪的设定从而保证筛选样品的范围, 每孔过多的细胞数可能会导致细胞纯度的下降, 最终影响 rFVII 的表达

量。综合考虑上述两种因素, 最终选择以每孔 3 细胞条件进行细胞的分选。

2.3 点杂交筛选高表达克隆

将电转后经过 G418 筛选的细胞经流式细胞仪分选后, 无血清培养基培养的细胞培养上清液用于点杂交检测, 结果见图 2。细胞分选中将细胞分选至 6 块 96 孔板中, 结果发现点杂交结果中可被检测到 rFVII 的孔数与表 1 中结果相近。通过比较点杂交结果中每块 96 孔板中表达量, 从每块 96 孔板中挑选表达量较高的克隆。点杂交方法的原理与 WB 相同, 但可同时检测的样品数远高于 WB, 因此首先利用点杂交方法对分选后细胞进行初步检测, 从中选出表达量相对较高的细胞用于后续 WB 进一步检测。

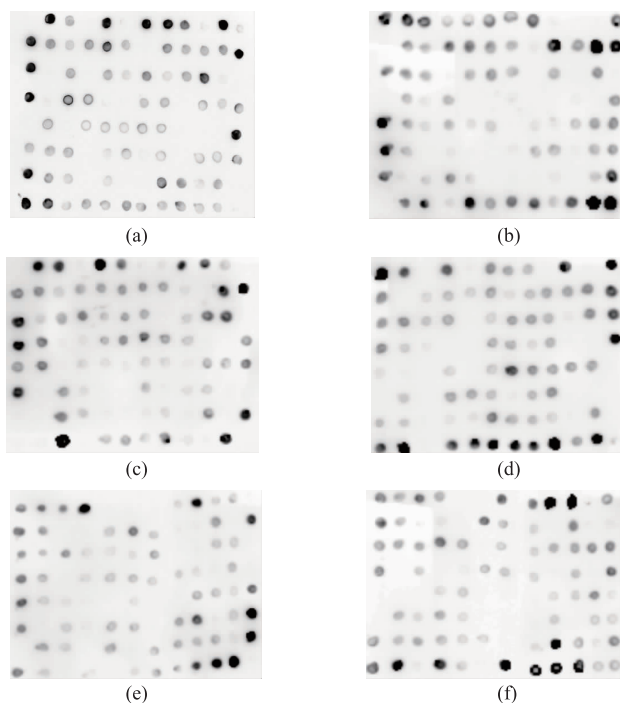


图 2 点杂交筛选 rFVII 高表达克隆

Fig. 2 Screening high rFVII expression clones by dot blot

2.4 WB 筛选高表达克隆

将点杂交筛选得到的 rFVII 表达量较高克隆转至 24 孔板生长后, 其无血清培养基培养的上清液进行 WB 检测, 结果见图 3。rFVII 相对分子质量为 50 000, 与 WB 检测结果中显示的条带相对分子质量抑制。通过 WB 方法的检测, 将不同 96 孔板挑选出的细胞进行比较, 最终确定 9 个克隆中 a2 克隆具有较高的表达量。由于上述方法采用每孔 3 个细胞进行分选, 经点杂交、WB 筛选得到的细胞并非纯细胞, 因此需要再重复上述分选、点杂交、WB 进一

步检测,最终得到 CHO-rFVII-1 细胞用于后续悬浮无血清发酵实验。

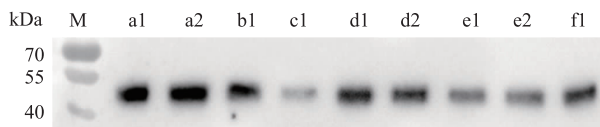


图3 WB 筛选 rFVII 高表达克隆

Fig. 3 Screening high rFVII expression clones by WB

2.5 rFVII 表达克隆的纯度检测

为考察流式细胞仪分选方法筛选获得的克隆纯度,将细胞标记带有绿色荧光标记后利用流式细胞仪进行检测,结果见图4。蛋白在合成过程中需要经过转录、翻译和修饰等过程,因此少量 rFVII 存在于胞内并可与 FVII 抗体结合,经过带有荧光蛋白的二抗标记后可通过流式细胞仪进行检测。作者在之前的研究中考察了单独加一抗或二抗抗体后的细胞进行检测,发现其并未有荧光蛋白标记,而不同纯度的克隆可通过该方法进行区分并定量。结果表明,与未转入构建质粒的 CHO 细胞与分选方法获得的 CHO-rFVII-1 细胞可明显区分,同时 CHO-rFVII-1 细胞中可合成 rFVII 的阳性克隆占 99.9% 以上。

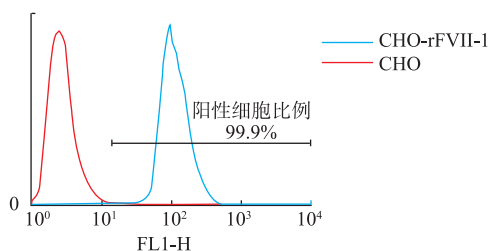


图4 CHO-rFVII-1 细胞中表达 rFVII 细胞的比例

Fig. 4 Percentage of positive cells expressing rFVII in CHO-rFVII-1

2.6 悬浮培养表达 rFVII

在经过上述筛选过程后获得 rFVII 表达细胞 CHO-rFVII-1 后,将传统方法筛选获得的 CHO-rFVII 细胞作为对照,从 rFVII 表达量和细胞生长两方面进行比较。在无血清培养基悬浮培养的条件下发酵 6 d, rFVII 表达量和细胞密度结果见图 5。细胞密度在 250 mL 三角瓶中培养时在第 3 天达到最高,之后开始下降,而 rFVII 浓度随发酵时间的增加而逐渐积累,在发酵结束的第 6 天达到最高。与对照相比,利用流式细胞仪分选方法获得 rFVII 表达

细胞在细胞生长和 rFVII 表达方面并无明显差别,表明流式细胞仪分选方法在实际操作中具有可行性。

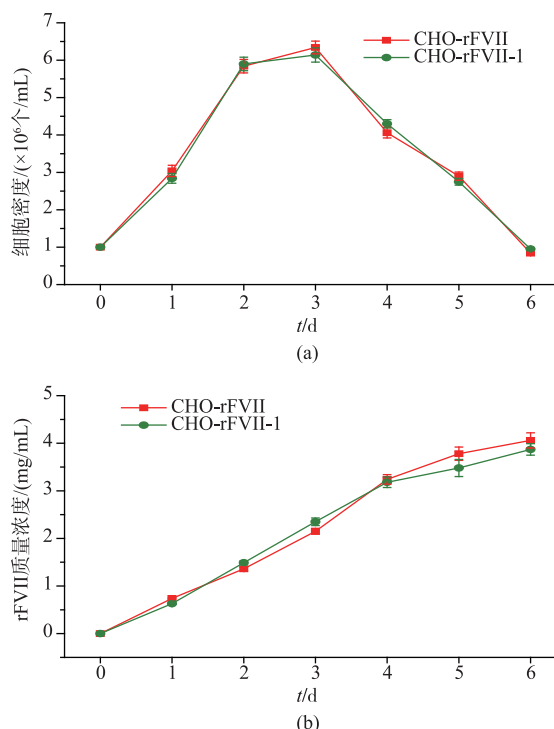


图5 无血清悬浮培养中 CHO-rFVII 和 CHO-rFVII-1 的活细胞密度(a)和 rFVII 质量浓度(b)

Fig. 5 Viable cell density (a) and rFVII concentration of CHO-rFVII and CHO-rFVII-1 during suspension culture with serum-free medium

3 结语

近年来,越来越多的重组药物蛋白选择利用 CHO 细胞进行表达和生产^[1-7]。在构建和筛选生产细胞的过程中,需要利用基因缺陷型或表达质粒带有的抗性标记进行挑选,同时利用免疫印迹方法对表达蛋白进行检测,从而选择高表达克隆。目前广泛采用的基因缺陷型 CHO 细胞为早期构建的二氢叶酸脱氢酶基因缺陷细胞,即 CHO-DUKX 细胞^[6]。为获得高表达克隆,可通过增加电转时体系中的质粒和抗生素添加量等方法提高细胞中目的基因的拷贝数,从而达到提高重组蛋白表达量的目的^[8]。但在整个挑选高表达细胞的过程中,由于细胞处于贴壁培养的状态,最为耗时的步骤为将稀释后生长于平板中的细胞挑选至 96 孔板,同时该过程较为依赖人工经验,因此很难再较短的时间内挑选克隆的数

量并保证克隆的纯度。为解决这一问题,一些研究者将细胞培养于半固体培养基中,使细胞表达的重组蛋白集中在细胞周围,利用带有荧光标记的抗体进行检测后进行筛选^[7]。此方法与传统方法不同之处在于可在平板中培养后直接挑选高表达克隆,但仍需进一步检测和验证不同克隆之间的表达量,同时在培养基中进行检测仍存在较大误差。此外,还有研究者将绿色荧光蛋白(GFP)通过基因构建的手段与目的蛋白共同表达,通过胞内表达 GFP 是阳性克隆带有标记从而进行分选^[9-10]。作者建立的方法,还可以应用于其他重组蛋白和重组融合蛋白表达克隆的筛选。

通过考察不同分选条件后,确定以每孔 2 个细

胞进行分选可同时达到较大筛选范围和较高细胞纯度的目的,利用点杂交和 WB 方法进行两次筛选后可得到 rFVII 高表达克隆。在利用荧光抗体标记后通过流式细胞仪检测得到克隆的纯度后发现,该克隆全部为 rFVII 表达细胞,同时与传统方法得到的 rFVII 表达细胞具有相同的细胞生长和 rFVII 表达特性,表明该方法可实现与传统筛选方法相同的筛选结果。与传统方法相比,细胞分选方法在挑选细胞时具有高通量、节省时间和排除人工经验等优点,不仅适用于 rFVII 表达细胞的筛选,对 CHO 和其他哺乳动物细胞表达重组药物蛋白的筛选工作具有借鉴意义。

参考文献:

- [1] JAYAPAL K R, WLASCHIN K F, HU W S, et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting[J]. **Chemical Engineering Progress**, 2007, 103(10): 40-47.
- [2] FLIEDL L, GRILLARI J, GRILLARI-VOGLAUER R. Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon[J]. **New Biotechnology**, 2015, 32(6): 673-679.
- [3] CHEMMANUR A T, WU G Y. Drug evaluation; Albuferon-alpha - an antiviral interferon-alpha/albumin fusion protein [J]. **Current Opinion in Investigational Drugs**, 2006, 7(8): 750-758.
- [4] KAUFMAN R J, WASLEY L C, FURIE B C, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells [J]. **The Journal of biological chemistry**, 1986, 261(21): 9622-9628.
- [5] GOLOR G, BENSEN-KENNEDY D, HAFFNER S, et al. Safety and pharmacokinetics of a recombinant fusion protein linking coagulation factor VIIa with albumin in healthy volunteers [J]. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2013, 11(11): 1977-1985.
- [6] URLAUB G, CHASIN L A. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1980, 77(7): 4216-4220.
- [7] DE J M, WURM F M. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors [J]. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2011, 78(2): 184-188.
- [8] CHENUET S, MARTINET D, BESUCHET S N, et al. Calcium phosphate transfection generates mammalian recombinant cell lines with higher specific productivity than polyfection[J]. **Biotechnology and bioengineering**, 2008, 101(5): 937-945.
- [9] MANCIA F, PATEL S D, RAJALA M W, et al. Optimization of protein production in mammalian cells with a coexpressed fluorescent marker[J]. **Structure**, 2004, 12(8): 1355-1360.
- [10] MENG Y G, LIANG J, WONG W L, et al. Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells[J]. **Gene**, 2000, 242(1-2): 201-207.