

CHO 细胞无血清培养基的工艺优化

蒋娟娟, 任东升*, 段鑫, 张艳

西藏诺迪康药业股份有限公司, 成都 610003

摘要: 本文以表达人肿瘤坏死因子受体-人 IgG-Fc 抗体融合蛋白的 CHO 细胞为研究对象, 通过对影响其细胞密度、活力及蛋白表达量和聚体百分比的进行了 3 个大类因素的考察, 即水解物: 0.5% 酵母提取物, 0.5% 谷类水解物, 0.5% 大豆蛋白水解物, 0.5% 植物蛋白胨; 脂类物质: 10 mmol/L 磷脂酰胆碱, 10 mg/L 乙醇胺, 0.05% 脂肪乳剂; 激素类物质: 10 $\mu\text{mol/L}$ 氢化可的松(肾上腺皮质激素), 10 mg/L 胰岛素, 20 nM 孕酮(类固醇激素)。结果表明, 水解物中 0.5% 酵母水解物, 脂类物质中 10 mg/L 乙醇胺, 激素类物质中 10 mg/L 胰岛素对提高 CHO 细胞密度、活力和蛋白表达量和降低聚体含量具有重要促进作用。

关键词: CHO 细胞; 无血清培养基; 细胞活力; 蛋白表达量

中图分类号: R392-33

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.025

Optimization of Serum-free Medium of CHO Cells

JIANG Juan-juan, REN Dong-sheng*, DUAN Xin, ZHANG Yan

Tibet Rhiola Pharmaceutical Holding Co, Chengdu 610003, China

Abstract: In this study, CHO cell, which can express antibody fusion protein of human tumor necrosis factor receptor - Fc - people IgG, was used as research object. The effect of three important factors on the cell density, activity, expression level and percentage of polymers were investigated, including: the hydrolysate: 0.5% yeast extract, 0.5% cereal hydrolysate, 0.5% soyprotein hydrolysate, 0.5% phytone; the lipid: 10 mmol/L phosphatidyl choline, 10 mg/L ethanolamine, 0.05% intralipid; the hormone substances: 10 $\mu\text{mol/L}$ hydrocortisone (adrenocortical hormone), 10 mg/L insulin, 20 nM progesterone (steroid hormones). The results showed that 0.5% yeast hydrolysate, 10 mg/L ethanolamine and 0.05% intralipid in lipid, 10 mg/L insulin can significantly improve the density, activity and the protein expression level of CHO cells.

Key words: CHO cells; serum free medium; cell vitality; protein expression level

近些年, 体外培养动物细胞的现代生物技术发展相当迅速^[1]。目前, 多数动物细胞在体外进行培养的时候仍然需要在培养基中加入血清, 用于提供细胞生长所需的生长因子、激素以及部分营养物质, 但由于其价格昂贵、极易感染病毒或支原体、成分复杂不利于进行细胞产品的分离纯化等诸多不利使得科学家们开始寻求一种新的替代培养基——无血清培养基^[2-6]。作为继天然培养基、合成培养基之后的第三大培养基, 该培养基不含动物血清及其他的生物类提取物, 但能够保证细胞在体外生长、繁殖较长时间^[7]。另外, 其组成成分相对清楚、制备过程简单, 被广泛应用于现代生物学领域, 同时, 在细胞生成、繁殖、分化及基因表达调控的基础研究的阐述上

也发挥着重要作用^[8]。

CHO 细胞, 即中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary), 具有不死性, 可以传代百代以上, 目前在生物工程上被广泛作为外源基因的宿主, 生产蛋白质如抗体等^[9]。为了商业化生产药物蛋白, 通过提高细胞密度从而达到规模化生产是必由之路。因此, 优化一种成分明确, 廉价的无血清培养基对于哺乳动物细胞大规模培养并生产药物蛋白非常必要。本实验以表达抗体融合蛋白的 CHO 细胞为研究对象, 以细胞密度、活力及蛋白表达量作为评价指标, 确定了几种对培养基有影响的关键成分, 研制出适合于 CHO 细胞生长和产物表达的低成本无血清培养基。

1 材料与方法

1.1 细胞系

表达人肿瘤坏死因子受体-人 IgG-Fc 抗体融合

蛋白的 CHO 细胞系,由安必奇生物科技有限公司提供,经中国科学院成都生物研究所李家堂研究员鉴定。

1.2 培养基

DMEM/F12 无血清培养基由 Hyclone 公司提供。

1.3 试剂

糖皮质激素及各之类物质、大豆蛋白水解物、植物蛋白胨、谷类水解物、酵母提取物等均购自美国 Sigma 公司;蛋白表达量检测用标准品购自美国安进公司。

1.4 无血清培养基培养 CHO 细胞的方法

将表达人肿瘤坏死因子受体-人 IgG-Fc 抗体融合蛋白的 CHO 细胞以密度为 5×10^5 个/mL 接种到 100 mL 的摇瓶中,其中,工作体积 50 mL;然后,以在 DMEM/F12 培养基上添加过维生素、脂类、氨基酸及其他微量元素的无血清培养基 SFM 为基础培养基,在 37 °C,5% CO₂ 培养箱中,100 rpm 悬浮振荡培养,同时,以细胞密度、活力及蛋白表达量作为评价指标来检测不同添加物质:不同种类的水解物,即 0.5% 酵母提取物,0.5% 谷类水解物,0.5% 大豆蛋白水解物,0.5% 植物蛋白胨,空白对照;不同种类的脂类物质,即 10 mmol/L 磷脂酰胆碱,10 mg/L 乙醇胺,0.05% 脂肪乳剂,空白对照;不同种类的激素类物质,即 10 μmol/L 氢化可的松(肾上腺皮质激素),10 mg/L 胰岛素,20 nM 孕酮(类固醇激素),空白对照,连续培养 10 d,检测其对细胞密度、细胞活力、蛋白表达量及蛋白中聚体含量对无血清培养基培养 CHO 细胞的影响。

1.5 CHO 细胞密度和细胞活力的检测方法

测定细胞密度和活力,选择台盼蓝染色法,用血球计数板计数,测定细胞的存活率及细胞密度,以培养天数为横坐标,细胞密度和细胞活力分别为纵坐标绘制曲线。

1.6 CHO 细胞蛋白表达量的检测

CHO 细胞蛋白表达量的检测采用亲和层析 HPLC 法,流动相为 20 mmol/L Tris pH 7.0,上样用流动相洗脱,流速 3 mL/min,进样 20 μL。利用标准品在此条件下吸收峰面积与浓度绘制标准曲线,得到标准曲线方程,然后将待测蛋白的吸收峰带入,计算得到待测蛋白的含量。

1.7 CHO 细胞蛋白中聚体的含量检测方法

采用分子筛排阻层析检测目的蛋白中聚体的含

量,使用 G3000WXL 柱(300 mm × 4.6 mm),洗脱液为 0.2 mL 磷酸盐溶液(pH = 7.0),流速 1 mL/min,在 280 nm 波长下检测。

2 结果与讨论

2.1 不同水解物对无血清培养基培养 CHO 细胞的影响

蛋白质的水解物,即其经酶、酸、碱等水解处理之后生成的氨基酸、多肽、脂类化合物、维生素、矿物质等混合物^[10,11]。成分复杂,但营养很丰富,价格较低,在培养基中添加这些非动物源的水解物,能够迅速地达到增加细胞密度、活力及蛋白表达量的目的^[12,13]。因此,蛋白水解物,在无血清培养基的研发和优化过程中,应用广泛,常用的由酵母提取物、谷类水解物、大豆提取物等。

在基础培养基无血清培养基 SFM 里,分别加入不同种类的水解物,结果如下图 1~3 所示。图 1 中显示了不同水解物的添加对无血清培养基培养 CHO 细胞密度的影响,从中可以看出,整个培养过程中,0.5% 的酵母提取物在无血清培养基中的添加使得 CHO 细胞在培养过程中增加的较多,在培养的第 5 d,0.5% 的酵母提取物的添加使 CHO 细胞密度达到最大,比对照组增加了 58%。图 2 中显示了不同水解物的添加对无血清培养基培养 CHO 细胞活力的影响,从中可以看出,整个培养过程中,0.5% 的酵母提取物的活力可一直维持在 90% 以上,而对照组则一般在 90% 下。图 3 中显示了不同水解物的添加对无血清培养基培养 CHO 细胞蛋白表达量的影响,从中可以看出,整个培养过程中,0.5% 的酵母提取物的添加,大大提高了目的蛋白的表达量。

2.2 不同脂类物质对无血清培养基培养 CHO 细胞的影响

脂类和脂肪酸物质在细胞进行体外培养的过程中的作用曾一直未被重视起来。但是,脂类化合物不仅可以作为能量储存物质,为细胞的成长和代谢提供能量,同时它也是细胞膜结构的重要组成部分,另外,在物质运输和信号转导方面也有重要作用。常见的脂肪酸类化合物有,亚油酸和亚麻酸,它们是细胞不能自我合成,只能依靠从培养中获取。常见的脂类化合物如胆碱类和乙醇胺,它们的添加可以促进细胞的增殖,对提高细胞的密度有重要作用。

在基础培养基无血清培养基 SFM 里,分别加入不同种类的脂类物质,结果如下图 4~6 所示。图 4

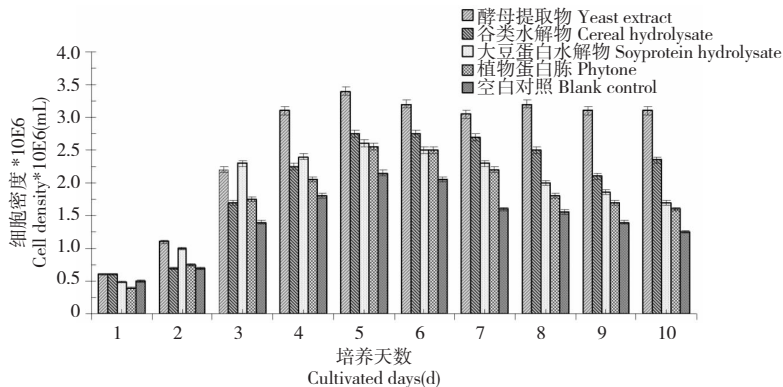


图 1 不同水解物对无血清培养基培养 CHO 细胞密度的影响

Fig. 1 Effect of different hydrolysates on the density of CHO cells in serum-free medium

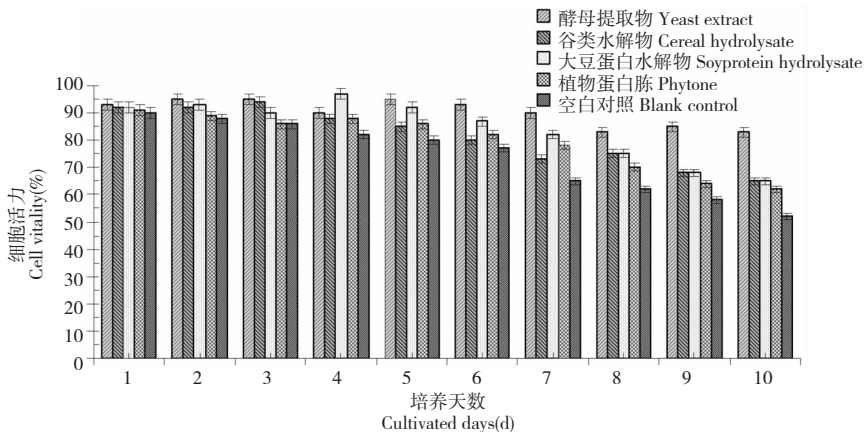


图 2 不同水解物对无血清培养基培养 CHO 细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of different hydrolysates on vitality of CHO cells in serum-free medium

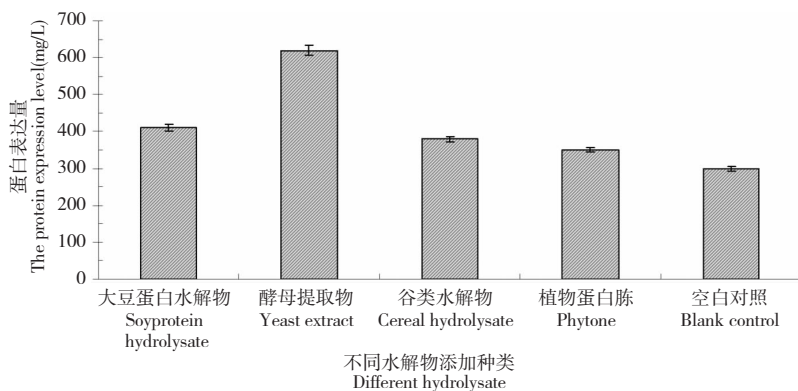


图 3 不同水解物对无血清培养基培养 CHO 细胞蛋白表达量的影响

Fig. 3 Effect of different hydrolysates on the protein expression level of CHO cells in serum-free medium

显示了不同脂类物质无血清培养基培养 CHO 细胞密度的影响,从中可以看出,整个培养过程中,10 mg/L 乙醇胺和 0.05% 脂肪乳剂的添加对 CHO 细胞密度的影响基相差不多,但前者细胞培养到第 7 d

时,使细胞的密度达到了最大,相对对照组增加了 28%。图 5 显示了不同脂类物质无血清培养基培养 CHO 细胞活力的影响,10 mg/L 乙醇胺和 0.05% 脂肪乳剂的添加后细胞活力基本都维持在 95% 以上,

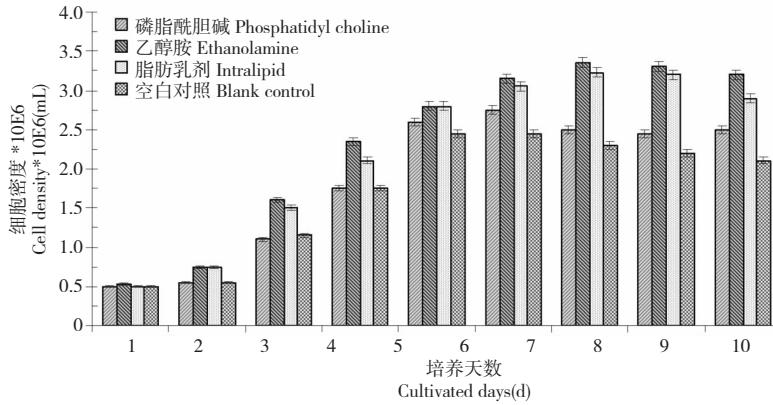


图4 不同脂类物质对无血清培养基培养 CHO 细胞密度的影响

Fig. 4 Effect of different lipids on density of CHO cells in serum-free medium

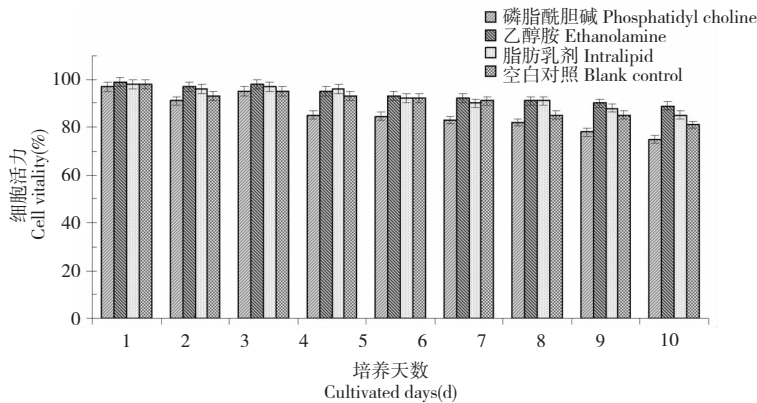


图5 不同脂类物质对无血清培养基培养 CHO 细胞活力的影响

Fig. 5 Effect of different lipids on vitality of CHO cells in serum-free medium

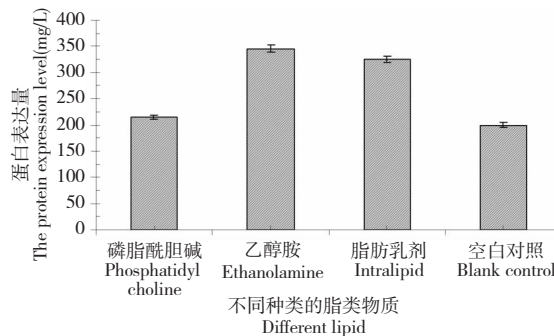


图6 不同脂类物质对无血清培养基培养 CHO 细胞蛋白表达量的影响

Fig. 6 Effect of different lipids on the protein expression level of CHO cells in serum-free medium

与细胞密度组类似。图6显示了不同脂类物质无血清培养基培养 CHO 细胞蛋白表达量的影响,从中可以看出,整个培养过程中,10 mg/L 乙醇胺对 CHO 细胞表达蛋白的促进作用最强。

2.3 不同激素类物质对无血清培养基培养 CHO 细胞的影响

激素在哺乳动物体内是通过血液循环的过程到

达机体的各个组织和结构的,故在血清中含有很多种激素^[14]。在研制无血清细胞培养基的初期,就是利用在细胞培养基中添加不同激素的方法来进行的。在无血清细胞培养基中常用的激素主要有糖皮类激素素地塞米松、氢化可的松,类固醇类激素如孕酮,多肽类激素如胰高血糖素、甲状腺素等,另外,胰岛素是目前应用最广泛的激素之一,可促进细胞对

葡萄糖和氨基酸的摄取,并促进细胞生长,具有促进糖原、脂肪酸、蛋白质和 RNA 合成的作用,同时也可抑制细胞死亡,是重要的细胞存活因子^[15,16]。

在基础培养基无血清培养基 SFM 里,分别加入不同种类的激素类物质,结果如下图 7~9 所示。图 7 显示了不同激素对无血清培养基培养 CHO 细胞

密度的影响,从中可以看出,整个培养过程中,10 mg/L 胰岛素对 CHO 细胞密度的影响较为显著,在培养到第 6 d 时使细胞密度达到最大,相对空白对照增加了 5%;但 10 $\mu\text{mol/L}$ 氢化可的松的加入使得 CHO 细胞密度远低于对照组和添加胰岛素组,在培养到第 6 d 时,相对空白对照降低了 48%。图 8

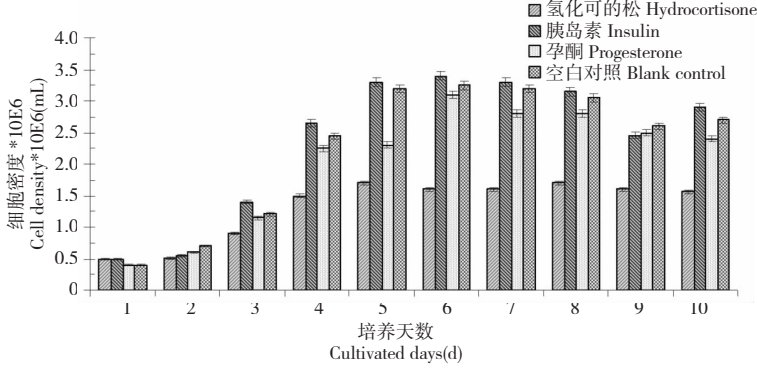


图 7 不同激素类物质对无血清培养基培养 CHO 细胞密度的影响

Fig. 7 Effect of different hormone substances on density of CHO cells in serum-free medium

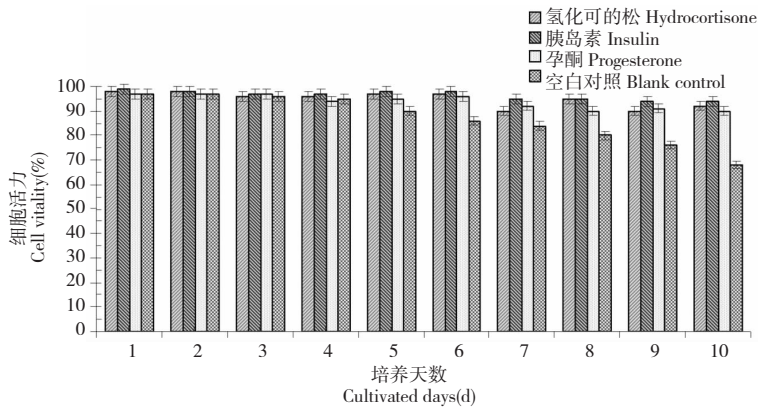


图 8 不同激素类物质对无血清培养基培养 CHO 细胞活力的影响

Fig. 8 Effect of different hormone substances on vitality of CHO cells in serum-free medium

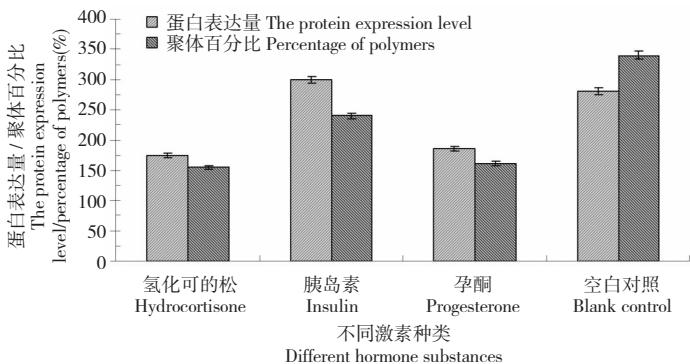


图 9 不同激素类物质对无血清培养基培养 CHO 细胞蛋白表达量和聚体百分比的影响

Fig. 9 Effect of different hormone substances and percentage of polymers on the protein expression level and percentage of polymers of CHO cells in serum-free medium

显示了不同激素对无血清培养基培养 CHO 细胞活力的影响,从中可以看出,整个培养过程中,除空白对照组其余组对 CHO 细胞活力的影响差别不大,基本维持在 95% 以上。图 9 显示了不同激素对无血清培养基培养 CHO 细胞蛋白表达量和聚体含量的影响,从中可以看出,整个培养过程中,添加了 10 $\mu\text{mol/L}$ 氢化可的松后,蛋白表达量也低于其他三组,但 10 $\mu\text{mol/L}$ 氢化可的松和添加 10 mg/L 胰岛素后,聚体含量低于对照组,说明在无血清培养基中添加地塞米松不仅可增加蛋白的表达量,同时可降低蛋白中聚体的含量。

3 结论

本文通过对培养表达人肿瘤坏死因子受体-人 IgG-Fc 抗体融合蛋白的 CHO 细胞的无血清培养基的优化,即通过向培养基中添加不同类型的水解物、脂类物质、激素类物质,并以其加入后对 CHO 细胞的细胞密度、活力、蛋白表达量和聚体所占百分比的比较,发现水解物中 0.5% 酵母水解物可以较大地提高 CHO 细胞密度、活力和蛋白表达量;脂类物质中 10 mg/L 乙醇胺和 0.05% 脂肪乳剂对 CHO 细胞密度、活力、蛋白表达量的提高方面具有相似的作用,但相对来说,前者更强一些;激素类物质中 10 mg/L 胰岛素对提高 CHO 细胞密度、活力和蛋白表达量和降低聚体含量具有重要促进作用。因此,该研究为无血清培养基的优化和进一步的研究提供一定的参考。

参考文献

- 1 Kaufman RJ, Sharp PA, Latt SA. Evolution of chromosomal regions containing transfected and amplified dihydrofolate reductase sequences. *Mol Cell Biol*, 1983, 3:699-711.
- 2 Grillberger L, Kreil TR, Nasr S, et al. Emerging trends in plasma - free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. *Biotech J*, 2009, 4: 186-201.
- 3 Zoon K. Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals. Center for Biological Evaluation and Research, Rockville; Food and Drug Administration, 1993. 7-8.
- 4 Schiff LJ. Review; production, characterization, and testing of

banked mammalian cell substrates used to produce biological products. *In Vitro Cell Dev-An*, 2005, 41(3-4): 65-70.

- 5 Van der Valk J, Mellor D, Brands R, et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro*, 2004, 18(1): 1-12.
- 6 Coecke S, Balls M, Bowe G, et al. Guidance on good cell culture practice, a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim*, 2005, 33: 313-315.
- 7 Hartung T, Balls M, Bardouille C, et al. Good cell culture practice. *Alter Lab Animal*, 2002, 30:407-414.
- 8 Li Y, Powell S, Brunette E, et al. Expansion of human embryonic stem cells in defined serum free medium devoid of animal-derived products. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 91:688-698.
- 9 Huang YM, Hu W, Rustandi E, et al. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol Prog*, 2010, 26:1400-1410.
- 10 Hgidemann R, Zhang C, Qi HS, et al. The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology*, 2000, 32:157-167.
- 11 Taylor WG, Dworkin RA, Pumper RW, et al. Biological efficacy of several commercially available Peptones for mamalian cells in culture. *Exp Cell Res*, 1972, 74:275-279.
- 12 Heidemann R, Zhang C, Qi H, et al. The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology*, 2000, 32:157-167.
- 13 Franek F, Hohenwarter O, Katinger H. Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnol Progr*, 2000, 16:688-692.
- 14 Lindl T, Gstraunthaler G. Zell-und Gewebekultur; von den Grundlagen zur Laborbank. Spektrum Akademischer Verlag, 2008.
- 15 Price PJ, Gregory EA. Relationship between *in vitro* growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. *In vitro*, 1982, 18:576-584.
- 16 Hayashi I, Sato GH. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature*, 1976, 259: 132-134.