

泛染色体开放元件对 CHO 细胞株中抗体表达量的影响

王 驰, 田 泓, 高向东*, 姚文兵**

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘 要 泛染色体开放元件(UCOE)来自于人类看家基因启动子基因序列,能阻止基因转录沉默,使转录的目的基因不受“位置效应”的影响,从而使目的蛋白在细胞中高表达。本研究考察了不同片段大小的 UCOE 元件对稳转细胞株中抗体表达量的影响。将 UCOE 元件中来自于 CBX3 基因的 1.5 kb 片段和来自于 HNRPA2B1 基因的 2.5 kb 片段及完整 UCOE 4.0 kb 片段分别插入到含有抗体轻、重链的质粒载体中,转染中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,加压筛选获得 4 组单克隆细胞株。比较不同组的单克隆细胞株抗体表达量,结果显示,转染 UCOE 1.5 kb、2.5 kb 的单克隆细胞株抗体表达量是对照组的 1.5~2 倍,转染 UCOE 4.0 kb 的单克隆细胞株抗体表达量是对照组的 3~4 倍;两个看家基因启动子基因序列对目的基因表达的增强作用可相互叠加。

关键词 泛染色体开放元件;中国仓鼠卵巢细胞;抗体;表达;看家基因

中图分类号 Q786 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)01-0096-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170115

引用本文 王驰,田泓,高向东,等. 泛染色体开放元件对 CHO 细胞株中抗体表达量的影响[J]. 中国药科大学学报,2017,48(1):96-101.

Cite this article as: WANG Chi, TIAN Hong, GAO Xiangdong, *et al.* Influence of ubiquitous chromatin opening element on the antibody expression in CHO cells[J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(1):96-101.

Influence of ubiquitous chromatin opening element on the antibody expression in CHO cells

WANG Chi, TIAN Hong, GAO Xiangdong*, YAO Wenbing**

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Ubiquitous chromatin opening element (UCOE), composed of the promoters of human housekeeping genes, prevents transgene from silencing and produces consistent, stable and high-level gene expression irrespective of the chromosomal integration site. The research studied the influence of different UCOE element parts on antibody expression in CHO cells. UCOE 1.5 kb from chromobox homolog 3 (CBX3), UCOE 2.5 kb from the heterogeneous ribonucleoprotein A2/B1 (HNRPA2B1) and the whole UCOE 4.0 kb were inserted into the antibody light and heavy chain vectors, respectively, and transfected into CHO cells using antibiotics-Zeocin and Blasticidin for pressure selection. Four groups of monoclonal cells were harvested and antibody expression of each group was detected. The monoclonal cells with UCOE 1.5 kb and UCOE 2.5 kb increased 1.5 to 2-fold in the level of antibody expression, whereas, monoclonal cells with UCOE 4.0 kb increased 3 to 4-fold. The enhancement of two housekeeping promoter genes on antibody expression could stack up.

Key words ubiquitous chromatin opening element; Chinese hamster ovary cells; antibody; expression; house-keeping gene

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81430082); and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20120096110007, No. 20120096120008)

收稿日期 2016-04-11 **通信作者** * Tel:025-83271543 E-mail:xdgao@cpu.edu.cn

** Tel:025-83271218 E-mail:wbyao@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81430082);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(No. 20120096110007, No. 20120096120008)

中国仓鼠卵巢细胞(CHO cells)是商业化生产蛋白药物的主要宿主细胞^[1-2],通过质粒转染,目的蛋白基因可以整合到 CHO 细胞基因组中,稳定表达人们所需要的蛋白质。但是筛选出一个高表达的稳定细胞株用于商业化蛋白表达是非常繁琐困难的一件事。这主要是由于外源基因随机整合到基因组的不同位置,其转录效率受到表观遗传基因的调控,例如 DNA 的甲基化^[3-5]和组蛋白去乙酰化是影响细胞稳定表达的主要原因。为解决随机整合位点影响目的基因转录效率的“位置效应”问题,一些看家基因的转录调控元件受到普遍关注。

泛染色体开放元件(UCOE)来自于异质核糖核蛋白 A2 B1/染色盒蛋白同系物 3(HNRPA2B1/CBX3)看家基因,是由一个延展的无甲基化的 CpG 岛和双向启动子组成^[6-7]。UCOE 元件能阻止基因转录沉默,使转录的目的基因不受“位置效应”的影响,从而使目的蛋白在细胞中高表达。由于完整的 UCOE 元件基因序列长达 8 kb,使用完整的 UCOE 元件给基因克隆造成困难,又从中截取来自于 HNRPA2B1/CBX3 4.0 kb 片段,但是 4.0 kb 仍旧较长,因此,选择能有效提高目的基因表达量的 UCOE 片段非常重要。

本研究考察了 UCOE 元件中 HNRPA2B1 和 CBX3 看家基因和两者串联的 UCOE 元件对提高蛋白表达量的影响。分别将 UCOE 元件中来自于 CBX3 的 1.5 kb 片段和来自于 HNRPA2B1 的 2.5 kb 片段及 UCOE 4.0 kb 片段分别插入到含有抗体轻链、重链质粒载体中。将构建好的抗体轻链重链质粒同时转染进入 CHO 细胞中,筛选出表达抗体的单克隆细胞株,分别检测单克隆细胞株抗体的表达量且进行比较。

1 材 料

1.1 试 剂

质粒小提试剂盒及胶回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司);分子克隆工具酶及 T4 DNA 连接酶(大连 TaKaRa 生物科技有限公司);Mut Express® II Fast Mutagenesis Kit(南京诺唯赞生物科技有限公司);无内毒素质粒小提试剂盒(北京康为世纪生物有限公司);D-MEM/F-12 培养基、胎牛血清、Opti-MEM、无血清培养基,羊抗人 IgG Fc

HRP,人 IgG ELISA 试剂盒(美国 ThermoFisher 公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司);博来霉素(zeocin),杀稻瘟毒素(blasticidin)(美国 InvivoGen 公司);羊抗人 Kappa light chain(美国 Life Technologies 公司);兔抗羊 IgG(H+L)HRP(北京麦约尔生物科技公司);ECL 显色液(上海天能科技有限公司);Hi-trap™ ProteinA HP 预装柱(英国 GE Healthcare 公司)。

1.2 仪 器

Thermal Cycle PCR 仪、SDS-PAGE 蛋白电泳仪(美国 Bio Rad 公司);高速冷冻离心机(美国 ThermoFisher 公司);半干式碳板转印仪槽(北京六一仪器厂)。

1.3 质粒、菌株及细胞

质粒 pFUSEss-Hlg-hG1、pFUSE2ss-Llg-hk 为本实验室保藏;UCOE Hu-P(美国 Merck Millipore 公司);宿主菌 *E. coli* DH5 α 为本实验室保藏;细胞株 CHO-K1 为本实验室保藏。

2 方 法

2.1 获得 UCOE 1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb 片段

将 UCOE Hu-P 载体中的 UCOE 序列与 HNRPA2B1/CBX3 的启动子序列进行比对,结果显示 UCOE 中 2.5 kb 序列与 HNRPA2B1 的基因序列完全一致。通过 PCR 的方式获取与 HNRPA2B1 一致的 2.5 kb 片段,和剩余的来自于 CBX3 的 1.5 kb 片段及完整 UCOE 4.0 kb 片段。UCOE 1.5 kb 引物如下:正向扩增引物序列 5'-GAAGATCTAGCT-TATCGATACCGGTGGCGC-3';反向扩增引物序列 5'-GGTACC CACCCGAATCAACTTCTAGTCAAAT-3';UCOE 2.5 kb 引物如下:正向扩增引物 5'-GAAGATCTGGGCACGGAAAACAAAAAGG-3';反向扩增引物序列 5'-TACAATTGGTACCACCGAACCCAAAGCCTGTAT-3';UCOE 4.0 kb 引物如下:正向扩增引物 5'-GAAGATCTAGCTTATCGATACCGGTGGCGC-3';反向扩增引物序列 5'-TACAATTGGTACCACCGAACCCAAAGCCTGTAT-3';其中下划线标出的序列 AGATCT 是 *Bgl* II 酶切位点,GGTACC 是 *Kpn* I 的酶切位点。

2.2 构建含有 UCOE 不同元件的轻链、重链载体
为了将 UCOE 元件插入到本实验室保藏的含

有完整人 IgG1 抗体轻链、重链质粒 pFUSE2ss-Llg-hk、pFUSEss-Hlg-hG1 中,使用 Mut Express[®] II Fast Mutagenesis Kit 对两个质粒启动子前端突变出 *Kpn* I、*Bgl* II 酶切位点。突变 *Bgl* II 酶切位点的引物序列如下:正向扩增引物序列:5'-CATTACA-GATCTGTGTTGGTTTTTGTGTGAATCGT-3';反向扩增引物序列:5'-CAACACAGATCTGTAAT-GAAAATAAAGATATTTTATTGCGG-3'。其中下划线标出的序列 AGATCT 是 *Bgl* II 酶切位点。突变 *Kpn* I 酶切位点的引物序列如下:正向扩增引物 5'-GGTTTTTGGTACCATCGTAACATAACGCT-CTCC-3';反向扩增引物序列:5'-CGATGG-TACCAAAAAACCAACAGATCTGTAA-3'。其中下划线标出的序列 GGTACC 是 *Kpn* I 酶切位点。突变后,通过南京金斯瑞生物科技有限公司测序筛选出含有 *Bgl* II、*Kpn* I 酶切位点的 pFUSE2ss-Llg-hk、pFUSEss-Hlg-hG1 的单克隆菌落。利用 *Bgl* II、*Kpn* I 限制性内切酶分别对突变后的 pFUSE2ss-Llg-hk 和 pFUSEss-Hlg-hG1 质粒及 UCOE 1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb PCR 产物同时进行双酶切,胶回收试剂盒回收 UCOE 1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb 基因片段和质粒载体,T4 DNA 连接酶 16 °C,1 h,连接子转入大肠埃希菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,筛选出含有 UCOE 1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb 的轻链、重链阳性单克隆菌落。分别提取质粒,经过限制性内切酶 *Bgl* II、*Kpn* I 双酶切鉴定。

2.3 细胞转染及单克隆细胞株筛选

将轻链、重链质粒分成 4 组:无 UCOE、UCOE1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb,使用无内毒素质粒小提试剂盒分别提取 4 组无内毒素质粒。用含 10% 胎牛血清的 D-MEM/F-12 培养基,37 °C,5% CO₂ 恒温培养 CHO-K1 细胞。转染前 18~24 h 收集对数期生长状态良好的 CHO-K1 细胞,以每孔 2×10^4 个细胞的密度接种于 24 孔板中,于 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养过夜,待细胞密度达到 70%~80% 时进行质粒转染。利用脂质体介导法转染 CHO-K1 细胞。转染试剂是阳离子脂质体 Lipofectamine[™] 2000,按照产品说明书进行操作。

将 24 孔板转染后的细胞转入 6 孔板,37 °C,5% CO₂ 培养 24 h 后加入终浓度为 500 μ g/mL 博来霉素和 10 μ g/mL 杀稻瘟霉素进行加压筛选。多克隆细胞通过 14 d 加压筛选后通过有限稀释到

96 孔板中进行单克隆细胞株筛选。培养 1 周后,取单克隆细胞培养基上清,进行斑点杂交(Dot blotting)初步筛选,初筛出来的单克隆进行 Western blot 检测。取细胞培养基上清液制样,进行 10% SDS-PAGE 电泳,利用恒流 30 mA 1.5 h 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭硝酸纤维素膜上非特异性结合位点,室温封闭 2 h,PBST 洗涤后加入一抗(羊抗人 Kappa light chain,羊抗人 IgG Fc HRP,1:5 000 PBST 稀释),室温孵育过夜,反应结束后,PBST 洗涤后加入二抗[兔抗羊 IgG (H+L)HRP,1:1 000 PBST 稀释],室温避光孵育 1 h,PBST 洗涤后 ECL 显色。

2.4 转染含 UCOE 1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb 质粒获得的单克隆抗体表达量检测及分析

筛选出 4 组单克隆细胞,将单克隆细胞转到 24 孔板中扩大培养,再转到 6 孔板中扩大培养,待细胞长满时,计数并换成无血清培养基培养 72 h,收集上清液检测抗体表达量。使用人 IgG Elisa 试剂盒检测 4 组单克隆细胞株中抗体表达量,按照说明书操作。

3 结果

3.1 UCOE 1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb 片段的获得

UCOE 元件基因序列与 HNRPA2B1/CBX3 基因序列进行比对,结果显示 UCOE 4.0 kb 中 1.5 kb 与人类 CBX3 基因序列一致,其中 2.5 kb 与人类 HNRPA2B1 基因序列一致。通过设计引物,PCR 扩增分别获得 UCOE 1.5 kb、UCOE 2.5 kb、UCOE 4.0 kb 片段(图 1)。

3.2 重组含 UCOE1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb 的轻链、重链载体的鉴定

含有完整人 IgG1 抗体轻链、重链质粒 pFUSE2ss-Llg-hk、pFUSEss-Hlg-hG1 在 hEF1-HTLV 启动子前端突变出 *Bgl* II、*Kpn* I 酶切位点,将 *Bgl* II、*Kpn* I 双酶切后的 pFUSE2ss-Llg-hk、pFUSEss-Hlg-hG1 的载体片段经纯化后,与同样经过 *Bgl* II、*Kpn* I 双酶切的 UCOE 1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb PCR 片段产物连接,获得重组含 UCOE 1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb 的抗体轻链、重链表达载体。如图所示是构建的含有不同大小 UCOE 元件的完整抗体轻链重链质粒流程图(图 2)。对构建的含有 UCOE 1.5 kb 和 UCOE 2.5 kb 的轻链、重链质粒分别进行 *Bgl* II、

Kpn I 双酶切验证,由于 UCOE 4.0 kb 的轻链、重链质粒中 UCOE 4.0 kb 和载体片段大小相近,所以使用菌落 PCR 的方式验证(图 3)。

3.3 单克隆细胞株的筛选及鉴定

转染无内毒素的 4 组抗体轻链、重链质粒,博来霉素、杀稻瘟毒素加压筛选,有限稀释至 96 孔

板中,挑取单克隆细胞株,获得 4 组单克隆细胞株。取 96 孔板细胞培养基上清,使用 Dot blotting 的方式检测进行单克隆的初筛,再进一步精确筛选使用 Western blot 的方式鉴定抗体轻链、重链的表达。如图 4 所示是其中一组单克隆细胞株筛选结果图。

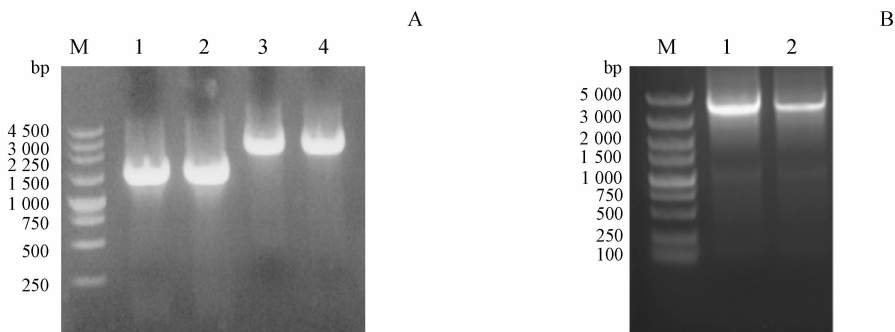


Figure 1 Identification of ubiquitous chromatin opening element (UCOE) elements with different fragments including UCOE 1.5 kb,UCOE 2.5 kb (A) and UCOE 4.0 kb(B)

A. Lane 1-2;PCR products of UCOE 1.5 kb;Lane 3-4;PCR products of UCOE 2.5 kb. B. Lane 1-2;PCR products of UCOE 4.0 kb

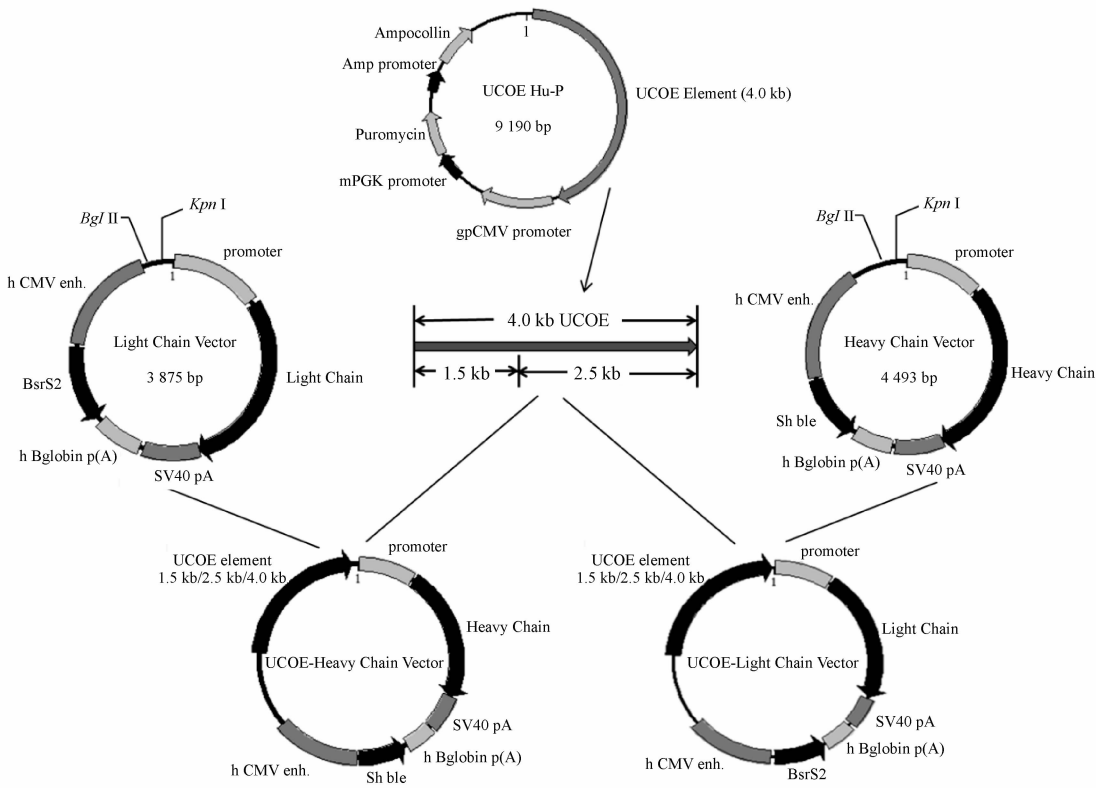


Figure 2 Construction system of UCOE-light chain vector and UCOE-heavy chain vectors

The construction of light and heavy chain plasmids with different size UCOE elements achieved by inserting PCR amplified 4.0 kb/1.5 kb/2.5 kb UCOE elements, respectively, into light and heavy chain vectors digested by *Bgl*III and *Kpn*I

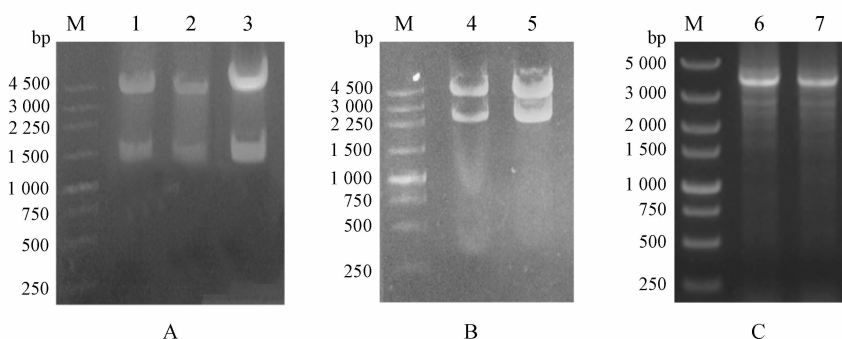


Figure 3 Identification of UCOE 1.5 kb-Light/Heavy chain vector (A), UCOE 2.5 kb-Light/Heavy chain vector (B) and UCOE 4.0 kb-Light/Heavy chain vector (C)

Lane 1-2: UCOE 1.5 kb-Light chain vector (*Bgl*III, *Kpn*I); Lane 3: UCOE 1.5 kb-Heavy chain vector (*Bgl*III, *Kpn*I); Lane 4: UCOE 2.5 kb-Light chain vector (*Bgl*III, *Kpn*I); Lane 5: UCOE 2.5 kb-Heavy chain vector (*Bgl*III, *Kpn*I); Lane 6: UCOE 4.0 kb-Light chain vector (Colony PCR); Lane 7: UCOE 4.0 kb-Heavy chain vector (Colony PCR)

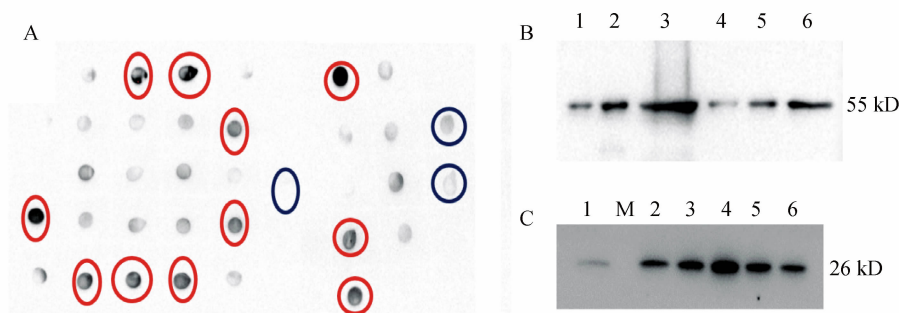


Figure 4 Selection of monoclonal cell lines expressing antibody

A. Dot blotting result of primary selection (red circle; monoclonal cell lines produced antibody; Blue circle; negative control); B. Selection of monoclonal cell lines expressed heavy chain of antibody; C. Selection of monoclonal cell lines expressed light chain of antibody

3.4 转染含 UCOE 1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb 质粒的单克隆细胞抗体表达量的比较分析

无 UCOE、含 UCOE 1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb 的轻链、重链转染后获得单克隆细胞抗体表达量比较见图 5。结果显示,含 UCOE 1.5 kb 和 UCOE 2.5 kb 的单克隆细胞株抗体表达量相较于对照组提高 1.5~2 倍,含有 UCOE 4.0 kb 的单克隆细胞株抗体表达量相较于对照组提高 3~4 倍。

4 讨论

CHO 细胞是目前广泛用于重组抗体药物表达的表达式系统^[8-10],但获得高表达工程细胞株需要大量的筛选工作。UCOE 元件能有效阻断基因转录沉默,提高目的基因的表达量,可以有效减少 CHO 工程细胞株构建中的筛选工作,并且获得高表达抗体细胞株。

本研究对 UCOE 元件的组成进行了分析,将 UCOE 分为 2 个部分,分别来自于不同的看家基因

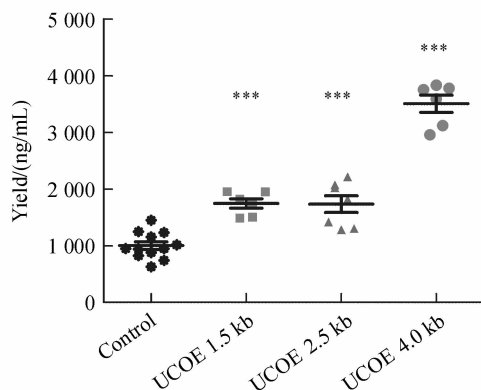


Figure 5 Quantity of antibody expression of four monoclonal cell groups (transfected light and heavy chain with non UCOE, UCOE 1.5 kb, 2.5 kb, 4.0 kb) ($\bar{x} \pm s, n=5$)

*** $P < 0.001$ vs control group

CBX3/HNRPA2B1 启动子基因序列。通过 PCR 的方式获得 UCOE 的 1.5 kb、2.5 kb、4.0 kb,并插入到含有抗体轻链、重链真核表达载体启动子前端。分别筛选出含有 UCOE 1.5 kb、2.5 kb 和 4.0 kb 质粒的单克隆细胞株,对每组细胞的表达量进行分

析。结果显示 UCOE 1.5 kb、UCOE 2.5 kb 组的单克隆表达量并无显著性差异,相较于无 UCOE 组表达量提高 1.5 ~ 2 倍,说明两个看家基因启动子序列发挥的作用基本相同。UCOE 4.0 kb 组的单克隆表达量得到 3 ~ 4 倍的提高,说明两个看家基因启动子基因序列会发挥叠加作用。

参 考 文 献

- [1] Butler M. Animal cell cultures; recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **68**(3): 283 - 291.
- [2] Barnes LM, Moy N, Dickson AJ. Phenotypic variation during cloning procedures; analysis of the growth behavior of clonal cell lines[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **94**(3): 530 - 537.
- [3] Osterlehner A, Simmeth S, Göpfert U. Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant Chinese hamster ovary cell lines[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2011, **108**(11): 2670 - 2681.
- [4] Yang Y, Mariati, Chusainow J, *et al.* DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell

- lines[J]. *J Biotechnol*, 2010, **147**(3/4): 180 - 185.
- [5] Zhang F, Frost AR, Blundell MP, *et al.* A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors[J]. *Mol Ther*, 2010, **18**(9): 1640 - 1649.
- [6] Antoniou M, Harland L, Mustoe T, *et al.* Transgenes encompassing dual-promoter CpG islands from the human TBP and HNR-PA2B1 loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing[J]. *Genomics*, 2003, **82**(3): 269 - 279.
- [7] Nair AR, Jinger X, Hermiston TW. Effect of different UCOE-promoter combinations in creation of engineered cell lines for the production of Factor VIII[J]. *BMC Res Notes*, 2011, **4**: 178.
- [8] Liu S, Tian H, Wang C, *et al.* Weakening resistance marker for establishing a process of screening high-producing CHO cell lines[J]. *J China Pharma Univ* (中国药科大学学报), 2015, **46**(5): 617 - 622.
- [9] Almo SC, Love JD. Better and faster; improvements and optimization for mammalian recombinant protein production[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2014, **26**: 39 - 43.
- [10] Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production[J]. *Biotechnol Adv*, 2012, **30**(5): 1158 - 1170.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2017 年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由国家教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药代动力学、药物生物技术、药理学、药事管理等学科的原创新研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录,被国内权威数据库:中国科学引文核心数据库(CSCD 核心)、《中文核心期刊要目总览》(2014 年版)、中国科技论文统计源数据库等列为药学类核心期刊,屡获原国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2008 年,《中国药科大学学报》被评为中国精品科技期刊,2006、2008、2010 年连续 3 次被教育部评为中国高校精品科技期刊。据中国知网,中国学术期刊(光盘版)电子杂志社《中国学术期刊影响因子年报(2010 版)》公布的最新数据,《中国药科大学学报》复合影响因子为 1.171,位居中国药学历学学术期刊第 4 位。学术影响力极高,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,128 页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32 - 1157/R

ISSN:1000 - 5048

国内邮发代号:28 - 115

定 价:40 元/期,全年 240 元

地 址:南京市童家巷 24 号

邮政编码:210009

电 话:025 - 83271566

传 真:025 - 83271279

E-mail: xuebao@cpu.edu.cn

http://www.zgykdxxb.cn