

葡萄糖对重组 CHO 细胞生长代谢及 EPO 表达的影响

孙祥明 张元兴*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要 在 CHO 细胞批培养中, 葡萄糖浓度从 8.9 增加到 49.6mmol/L, 最大活细胞密度没有明显的差异, 乳酸对葡萄糖的得率系数首先随着葡萄糖浓度的增加而增加, 葡萄糖浓度达到 17.9mmol/L 后, 乳酸对葡萄糖的得率系数基本上维持恒定。在本实验中, 葡萄糖浓度对谷氨酰胺代谢没有明显的影响。EPO 的累积浓度首先随着起始葡萄糖浓度的增加(8.9~17.9mmol/L)而增加, 进而又随着葡萄糖浓度的增加(17.9~49.6mmol/L)而下降, 表明存在一最适浓度, 在此浓度下重组 CHO 细胞的 EPO 表达最大。

关键词 CHO 细胞, 葡萄糖, 代谢, 红细胞生成素, 动物细胞培养

中图分类号 Q953.31 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0698-05

中国仓鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary, CHO)细胞构建重组细胞的宿主, 广泛应用于生产具有重要药用价值的重组蛋白药物。重组 CHO 细胞生产的人红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)已经获准上市。对重组 CHO 细胞生长代谢特点研究有助于优化细胞的培养过程, 对提高产物的生产率具有重要意义。

葡萄糖是细胞培养过程中重要的碳源和能源物质, 也是过程优化和控制的主要参数之一^[1]。本文着重研究了葡萄糖对重组 CHO 细胞生长、代谢和产物 EPO 表达的影响, 以期对 EPO 生产过程的优化提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

表达人红细胞生成素的重组 CHO 细胞, CHO-DEH-II, 由山东东阿阿胶股份有限公司提供, 培养基为 DMEM 与 F12 的 1:1 混合物, 添加 5% (V/V) 的胎牛血清, 培养基和血清均购自美国 Gibco 公司。

1.2 细胞培养

从细胞库中取出重组 CHO 细胞种子, 在 75mL 的方瓶中加入 10mL 培养基进行复苏培养, 细胞长满单层后, 0.025% (W/V) 的胰蛋白酶消化片刻, 倾去胰蛋白酶, 加入 10mL 培养基, 用移液管反复轻轻吹打成单细胞悬浮液, 按 1:10 的接种比例传代培

养。

取 5 只 100mL 血清瓶, 分别加入 60mL 的培养基和一定量 1mol/L 的葡萄糖溶液, 形成不同葡萄糖浓度的培养基, 葡萄糖浓度以实测结果为准。

取 4 只单层长满的细胞培养瓶, 用 0.025% (W/V) 胰蛋白酶消化后, 分别用 10mL 的培养基反复轻轻吹打成单细胞悬浮液。将 4 只瓶中的细胞悬浮液均匀混合于一处作为实验种子, 并以每瓶 8mL 的接种量分别接入上述 5 只血清瓶中, 并吹打混合均匀, 实测的细胞密度为培养过程的接种密度。

取 60 只 75mL 细胞培养瓶, 分成 5 组, 对应于 5 只不同葡萄糖浓度的血清瓶。将血清瓶中的细胞悬浮液以 5mL 的装液量分装到各组培养瓶中, 血清瓶中的细胞密度即为各组培养瓶中的细胞接种密度。所有方瓶置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱 (Shellab, USA) 中培养, 每天每组各取 2 瓶, 计数培养液中的悬浮细胞密度 (X_n) 后, 将培养液在 1500r/min 下离心 15min, 取上清置于 -20℃ 冰箱中保藏。另在瓶中加入 5mL 的胰蛋白酶消化细胞, 吹打成单细胞悬浮液, 计数细胞密度 (X_n)。第 n 个取样点的细胞密度由下式给出:

$$X_n = X_{n-1} + X_{n-2} \quad (1)$$

1.3 分析方法

1.3.1 细胞计数: 用血球计数板点样计数细胞, 并用台盼蓝拒染法确定细胞的存活率, 每样计数 3 次,

取平均值。

1.3.2 葡萄糖、乳酸和氨浓度的测定:葡萄糖和氨浓度的测定分别采用 GOD-POD 和 Berthelot 比色试剂盒(上海生物制品研究所)测定,乳酸浓度采用乳酸脱氢酶法测定。

1.3.3 氨基酸浓度的测定:采用邻苯二甲醛(OPA)(Fluka, Switzerland)柱前衍生的反相高效液相色谱系统(HP1100, Hewlett Packard, Germany)测定^[2]。

1.3.4 EPO 浓度的测定:用 EPO 体外诊断试剂盒(R & D System, USA)测定,其浓度单位为 IU/mL。

1.4 计算

细胞对营养物的得率系数:

Y_{X/S} = (X_t - X_0) / (S_0 - S_t) (2)

产物对营养物的得率系数:

Y_{P/S} = (P_t - P_0) / (S_0 - S_t) (3)

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖对重组 CHO 细胞生长的影响

图 1 为不同起始葡萄糖浓度下重组 CHO 细胞批培养的葡萄糖利用和细胞生长曲线,结果表明,在批培养过程中,葡萄糖浓度从 8.9mmol/L 上升到 48mmol/L,并没有增加最大活细胞密度。在起始葡萄糖浓度为 8.9mmol/L 的培养过程中,96h 起由于葡萄糖的耗尽,细胞开始死亡,而在其它培养条件下,从 96h 到 132h 细胞密度基本上维持恒定。从图 1 中亦可看出,在本实验的葡萄糖浓度范围内,葡萄糖浓度对细胞的生长速率也没有明显的影响,且 36~60h,细胞生长处于对数生长期,则 48h 对应的葡萄糖浓度不是细胞生长的限制因素。图 2 为各种培养条件下 48h 所对应的葡萄糖浓度,起始葡萄糖浓度为 8.9mmol/L 的批培养,在 48h 的葡萄糖浓度为 6mmol/L,因此在重组 CHO 细胞的灌注培养过程中,葡萄糖浓度控制在 6mmol/L 左右,不会对细胞生长产生负的影响。

在杂交瘤培养的研究中,许多学者提出,在细胞的维持过程中,谷氨酰胺作为能源物质可替代葡萄糖,而葡萄糖不能替代谷氨酰胺^[3]。在 BHK 细胞培养中,Cruz 等^[4]提出了相似的观点。在起始葡萄糖浓度为 8.9mmol/L 的重组 CHO 细胞的培养过程中,随着葡萄糖的耗尽,细胞开始死亡(图 1),表明葡萄糖是重组 CHO 细胞生存不可缺少的营养物,显示出 CHO 细胞具有与其它细胞不同的能量代谢特点。

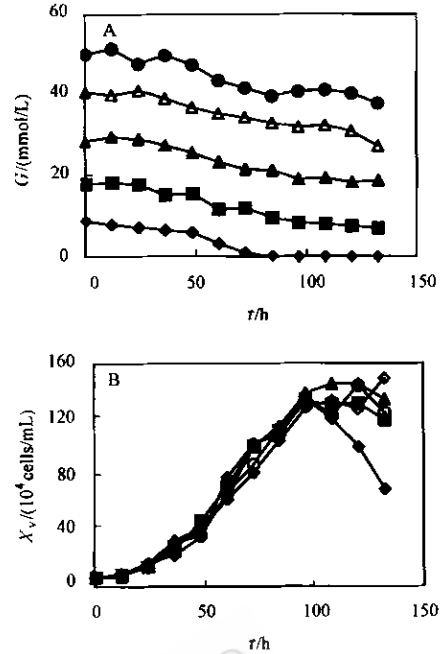


图 1 不同起始葡萄糖浓度的批培养中的葡萄糖利用(A)和重组 CHO 细胞的生长(B)

Fig.1 Glucose consumption (A) and growth (B) of recombinant CHO cells in the batch cultures with different initial glucose concentrations

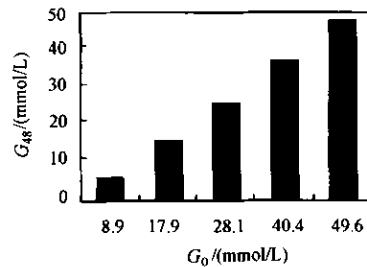


图 2 不同起始葡萄糖浓度条件下,重组 CHO 细胞批培养 48h 时的葡萄糖浓度

Fig.2 Glucose concentrations at 48h in the batch cultures of recombinant CHO cells with different initial glucose concentrations

2.2 葡萄糖对乳酸生成的影响

一般认为,对于转化的动物细胞系和肿瘤细胞系,糖酵解途径失去了有效的调节,葡萄糖经过糖酵解途径的通量取决于葡萄糖浓度。由于三羧酸循环的通量较低,只有少量的糖酵解代谢的产物丙酮酸进入三羧酸循环进一步氧化成水和二氧化碳,导致细胞质中丙酮酸的大量累积,并在乳酸脱氢酶的作用下转化成乳酸,因此在细胞培养中,葡萄糖浓度越高,乳酸生成速率越快,其累积浓度也越高^[4-6]。

作。异丙醇沉淀后,取小部分离心,DEPC 水溶解后进行甲醛变性电泳检测总 RNA 的质量,紫外检测总 RNA 的纯度和浓度,其余的用 75% 乙醇沉淀后,用 mRNA 纯化试剂盒中的 Elution buffer 溶解,再按 mRNA 纯化试剂盒说明书操作。mRNA 分离后,取小部分用甲醛变性电泳检测。

1.2.3 cDNA 的合成:基本按照 Stratgene 的 ZAP Express[®] cDNA synthesis kit 说明书操作。本文以 mRNA 为模板, Oligo (dT) 18-*Xho* I 为引物,在 MMLV 反转录酶作用下合成第一链 cDNA,再在 DNA 聚合酶 I 作用下置换合成第二链 cDNA。cDNA 第二链合成后,用 Pfu DNA 聚合酶将 cDNA 末端 *Xho* I 位点补平,再用 T4 DNA 连接酶连接补平的 cDNA 和 *Eco* R I Adapters,经 T4 Polynucleotide Kinase 磷酸化 *Eco* R I 末端后,再用 *Xho* I 限制酶消化,得到两端分别为 *Eco* R I 和 *Xho* I 的粘性末端。

1.2.4 cDNA 的纯化与定量:将消化后的双链 cDNA,经电泳后,切下含 500bp ~ 4kb DNA 片段的胶,其余步骤按 Qiaquick gel Extraction 试剂盒操作手册进行,洗脱出的双链 cDNA 加 1/10 体积的 3mol/L NaAc,2 倍体积的冰乙醇,-20℃ 沉淀过夜后,4℃ 下 13000r/min 离心 60min,去上清,用 75% 的乙醇洗 1 次,室温干燥后,加 8μL dd H₂O 溶解。取 1μL 用于定量电泳,以 30ng/μL 的 λDNA 作定量标准。

1.2.5 cDNA 片段的克隆和体外包装:本文采用 ZAP Express vector,它是一种用 *Eco* R I 和 *Xho* I 预切好并去磷酸化的载体,这样可以大大减少载体自连,也可以定向克隆 cDNA。取纯化回收的 cDNA(约 30ng)与 ZAP Express vector 4℃ 连接 2d,再取连接反应液 3μL 用 Gigapack[®] III Extract 进行体外包装,具体操作按试剂盒说明书进行。

1.2.6 cDNA 文库的鉴定:

(1)cDNA 文库容量的测定:

取包装好的反应液 5μL 作 1:10,1:100,1:1000,1:10000 稀释,然后各取 5μL 稀释液加入到 200μL 对数生长期的 XLI-Blue MRF⁻ 细菌液中,混合后,37℃,吸附 20min,再加入 3mL NZY Top agar(大约 48℃)混匀铺平板,37℃ 培养过夜,第二天计算平板上的清亮噬菌斑。

(2)cDNA 文库的扩增和滴度的测定:

文库容量测定后,按 5×10^4 pfu/板将剩余的噬菌体 cDNA 包装反应物全部铺板扩增,37℃ 培养 6 ~ 8h 后,每板加 10mL SM buffer,4℃ 浸泡过夜,收集洗脱液,再用 2mL SM buffer 冲洗,将收集的全部洗脱

液加 5% (V/V) 的氯仿,混匀,室温放置 15min,500g 离心,去除沉淀,收集上清,取小部分加 0.3% 的氯仿,混匀后保存于 4℃,其余的加 7% 的 DMSO (V/V) 于 -80℃ 保存,取 4℃ 保存的 cDNA 文库 10μL,按梯度稀释后铺板,测定扩增后文库的滴度。

(3)cDNA 文库重组比的测定:

在测容量的平板上,随机挑取 50 个清亮噬菌斑,置于 0.5mL 的离心管中,再分别加入 50μL SM buffer 和 2μL 氯仿,混匀后 4℃ 放置过夜。分别取 5μL 做模板,同时取 4℃ 保存的 cDNA 文库 5μL 做模板,用 T7 和 T3 为引物进行 PCR,PCR 的条件为 94℃ 变性 5min;94℃ 30s,55℃ 40s,72℃ 2min,30 个循环;72℃ 延伸 10min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 *E. tenella* 孢子化卵囊总 RNA 的提取和 mRNA 的分离

用 Trizol 试剂从 *E. tenella* 孢子化卵囊中提取的总 RNA,经紫外分光光度计测定其 $OD_{260}/OD_{280} = 1.9$,满足纯度要求。在甲醛变性电泳凝胶上,可见明显的 28S,18S 条带(如图 1 所示),说明提取的总 RNA 没有降解。经 Oligo(dT)纤维素柱 2 次纯化后,得到的 mRNA 经甲醛变性电泳检测也无降解现象(如图 2 所示),可用于 cDNA 文库的构建。

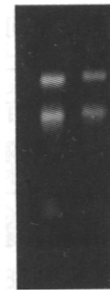


图 1 *E. tenella* 孢子化卵囊的总 RNA 的提取

Fig.1 Isolation of total RNA from *E. tenella* sporulated oocysts



图 2 mRNA 的分离

Fig.2 Isolation mRNA from total RNA

2.2 cDNA 的合成

双链 cDNA 电泳显示,合成的 cDNA 大小分布在 0.2~6.0kb 之间,大部分集中在 0.5~2kb 之间(如图 3 所示),这一结果与合成的 cDNA 双链用碱性电泳后放射性自显影法检测的 cDNA 长度一致,符合 cDNA 合成的分布规律。

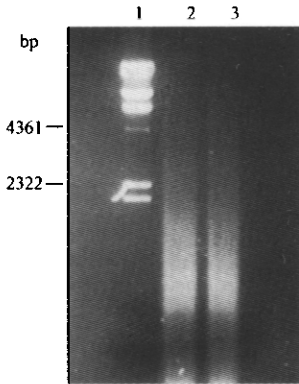


图 3 *E. tenella* 孢子化卵囊双链 cDNA 1% 琼脂糖凝胶电泳
Fig.3 1% agarose gel electrophoresis of the double-strand cDNA from *E. tenella* sporulated oocysts

1. λ DNA/*Hind* III markers; 2~3. The double-strand cDNA

2.3 cDNA 文库的构建及鉴定

双链 cDNA 与 ZAP Express Vector 连接包装后,测得的文库容量为 6×10^6 ,扩增后文库的滴度为 1×10^{11} Pfu/mL,经 PCR 扩增后,推算出文库的重组率为 96%,扩增出的片段主要集中在 0.6~3.5kb 之间(如图 4 所示)。

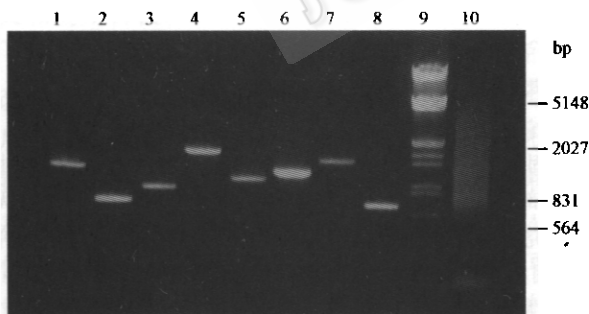


图 4 *E. tenella* 孢子化卵囊 cDNA 文库的 PCR 鉴定

Fig.4 Identification of cDNA library from *E. tenella* sporulated oocysts by PCR

1~8. PCR products of using the single clone as template;
9. λ DNA/*Eco* R I + *Hind* III markers;
10. PCR products of using the cDNA library as template

3 讨论

大多数高等真核生物的 rRNA 为 28S、18S、5S 等几类 RNA, *E. tenella* 的 rRNA 和 mRNA 具有真核生物的特性^[1],其 rRNA 也具有 28S、18S 和 5S。但 mRNA

经甲醛变性电泳显示:有几条明显的条带,可能原因是由于这一位置有高丰度的 mRNA,因为 *E. tenella* 在孢子化过程中,其 mRNA 的含量是变化的。鸡球虫在孢子化过程中,基因组 DNA 的合成没有变化,基因组 DNA 在孢子化过程中不进行复制,其孢子所需的全部 DNA 在合子发育阶段就已合成^[3],但 RNA 的合成是有变化的。Ellis 等^[4]用体外翻译和 DNA 杂交技术研究表明 *E. tenella*, *E. maxima* 在孢子化过程中,mRNA 的丰度是变化的,在孢子化的后期阶段,有一些基因是高表达的,这些基因的转录物 mRNA 丰度也增加。

目前,我国鸡球虫研究着重集中于生物学、免疫学、以及药物防治等传统领域,分子水平的研究仍处于起步阶段。国外在鸡球虫分子生物学方面的研究是始于 80 年代末,到目前,已建立了鸡球虫不同生活史阶段的 cDNA 文库和基因组文库,如未孢子化卵囊的 cDNA 文库^[5],孢子化卵囊的 cDNA 文库^[6],第一代裂殖体 cDNA 文库^[7],第二代裂殖子 cDNA 文库^[8],大配子体 cDNA 文库^[9],*E. tenella* 孢子基因组文库^[10]等。我们采用构建表达文库的方法,成功构建了 *E. tenella* 孢子化卵囊的 ZAP 表达性文库,为从分子水平深入研究 *E. tenella* 特异性基因提供了物质基础,目前我们正着手进一步筛选保护性抗原基因。

致谢 本文得到了本研究所蔡幼民研究员,中国科学院上海生物化学研究所吴祥甫研究员以及上海市肿瘤研究所周筱梅老师、李宏年老师的大力帮助,在此表示感谢。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bhogal B S, Miller G A, Anderson A C *et al.* Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for day-old broiler chickens against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1992, 31: 323 - 335
- [2] Pasternak J, Winkfein R, Fernando M A. Ribosomal and translatable messenger RNA of *Eimeria tenella*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1981, 3: 133 - 142
- [3] Wang C C, Stotish R L. Changes of nucleic acids and proteins in the oocysts of *Eimeria tenella* during sporulation. *The Journal of Protozoology*, 1975, 22(3): 438 - 443
- [4] Ellis J, Thurlby T. Changes in the messenger RNA population during sporulation of *Eimeria maxima*. *Parasitology*, 1991, 102: 1 - 8
- [5] Herbert R G, Pasternak J J, Fernando M A. Characterization of *Eimeria tenella* unsporulated oocyst-specific cDNA clones. *The Journal of Parasitology*, 1992, 78(6): 1011 - 1018
- [6] Laurent F, Bourdieu C, Kaga M *et al.* Cloning and characterization of an *Eimeria acervulina* sporozoite gene homologous to aspartyl proteinase-

- es. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1993, **62**(2): 303 ~ 312
- [7] Quarzane M, Labbe M, Pery P. *Eimeria tenella*: cloning and characterization of cDNA encoding a S3a ribosomal protein. *Gene*, 1998, **225**: 125 ~ 130
- [8] Binger M H, Hug D, Weber G *et al.* Cloning and characterization of a surface antigen of *Eimeria tenella* merozoites and expression using a recombinant vaccinia virus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1993, **61**(2): 179 ~ 187
- [9] Fried M, Mencher D, Sar-Shalom O, Wallach M. Developmental gene expression of a 230-kilodalton macrogamete-specific protein of the avian coccidial parasite, *Eimeria maxima*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1992, **51**(2): 251 ~ 262
- [10] Ellis J, Bumstead J. *Eimeria* species: studies using rRNA and rDNA probes. *Parasitology*, 1990, **101**: 1 ~ 6

Construction of cDNA Library of *Eimeria tenella* Sporulated Oocysts

HAN Hong-Yu HUANG Bing* ZHAO Qi-Ping

(Key Laboratory for Animal Parasitology of Ministry of Agricultry, Shanghai Institute of Animal Parasitology, CAAS, Shanghai 200232, China)

Abstract A lambda ZAP express cDNA library was constructed using mRNA from *Eimeria tenella* sporulated oocysts. Total RNA was isolated by the TRIzol from *Eimeria tenella* sporulated oocysts, mRNA was further purified through oligo(dT)-cellulose columns. The first-strand cDNA was synthesized by using MMLV reverse transcriptase with oligo(dT)₁₈ primers containing *Xho* I restriction site. After the second strand cDNA replacement synthesized, the uneven termini of the double-stranded cDNA were filled in with cloned Pfu DNA polymerase and *Eco* R I adapters were ligated to the blunt ends. Then the double-strand cDNA was digested with *Xho* I restriction enzyme. The fragments of 0.5kb ~ 4kb were collected by agarose gel fraction method. After ligation of the cDNA with the lambda ZAP Express vector, the cDNA library was packaged using Gigapack III Gold Packaging extract. According to the phage plaques bright selection, the cDNA library contained 6×10^6 clones and the titer of the amplified library was 1×10^{11} pfu/mL. By using PCR identification, the cDNA library contained approximately 96% recombinant phages.

Key words *Eimeria tenella*, sporulated oocysts, cDNA library

Received: May 14, 2001

This work was supported by Grand from the Key Technologies Reaseach and Development Programme of the Ninth Five-Year Plan(96-005-02-01-05).

* Corresponding author. Tel: 86-21-54081089; Fax: 86-21-54080044; E-mail: caassp@public.sta.net.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>