

CHO/dhfr⁻ 细胞定点整合高效表达系统的建立 Development of Site-specific Integration System to High-level Expression Recombinant Proteins in CHO Cells

周 宏 刘志刚 孙志伟 俞炜源*

ZHOU Hong, LIU Zhi-Gang, SUN Zhi-Wei and YU Wei-Yuan*

军事医学科学院 生物工程研究所蛋白质工程研究室 北京 100071

Lab for protein engineering, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

摘 要 为了克服随机整合建立高表达细胞株时“位置效应”所带来的不可预知的后果,我们尝试建立基于定点整合的 CHO 高效表达系统。首先设计一个新的高效筛选载体 pMCEscan。该载体含有报告基因(*k₂tPA*)、扩增基因(*dhfr*)、重组酶识别序列(FRT)及筛选基因(*neo*),且 *neo* 基因的表达经过系统的弱化,确保能够对基因组中的整合位点进行大规模的高效筛选。然后利用该载体转染 CHO/dhfr⁻ 细胞并进行大规模筛选以获得足够多的阳性克隆,并对阳性克隆进行系统分析,筛选出报告基因表达水平高、单拷贝且扩增效果好的克隆,此克隆被认为筛选载体整合入 CHO 细胞基因组中转录热点(Hot spot)区域,从而获得了能够实现外源基因在基因组中定点整合和有效表达的 CHO/dhfr⁻ 细胞系。随后利用位点特异性重组系统(FLP-FRT)将外源基因定点整合到 Hot spot 区域,以实现外源基因在 CHO 细胞基因组中的定点整合及高效表达。并利用该细胞系实现了 *k₂tPA* 的高表达,表达量达到 $17.1\mu\text{g}/10^6\text{ cell}\cdot 24\text{h}$ 。该研究致力于 CHO 细胞基因组中高表达位点的寻找和确认,建立基于定点整合的哺乳动物细胞高效表达系统。

关键词 CHO 细胞, 定点整合, 高效表达, 重组蛋白

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)04-0756-07

Abstract Stable transformants for mammalian cells from gene transfer often show extreme variability in expression of the introduced transgene. This occurs from the highly variable number of copies integrated into the genome and from position effects on gene expression due to random integration. We constructed engineered CHO strains that can be used for high-level production of foreign proteins by gene-targeting. After transfecting dihydrofolate reductase (DHFR)-deficient CHO cells with a newly screening vector plasmid pMCEscan, which carrying a *FRT-neo^{*}-IRES-k₂tPA* fusion gene and a DHFR gene, we screened colonies by *k₂tPA* expression level. We selected 7 clones that expressed high level of *k₂tPA* and carried one copy of the plasmid in their chromosomes. These clones showed in high level *k₂tPA* production without amplification. So we targeted reporter gene (*k₂tPA*) to test the basal expression ability of these cells clones. The clone, 8-1, showed the same effect to high base expression level. In this clone, the *FRT-neo^{*}-IRES-tPA* gene was integrated at a transcription-active, DHFR-mediated, gene-amplifiable locus in the chromosomes. A gene-targeting vector, carrying a *FRT*-fused hygromycin-resistance gene, was constructed to target desired genes in chromosomal *FRT* by FLP recombinase-mediated site-specific recombination. Using this cell-vector system, we could reproducibly obtain high producers of recombinant proteins by gene-targeting and gene amplification. Using the site-specific integration CHO/dhfr⁻ cell line 8-1, the expression level of *k₂tPA* could amount to $17.1\mu\text{g}/10^6\text{ cell}\cdot 24\text{h}$.

Key words recombinant protein, high-level expression, site-specific integration, Chinese hamster ovary (CHO)

Received: December 11 2006; Accepted: March 7 2007.

This work was supported by a grant from the National 863 Project of China (No. 2001AA215351).

* Corresponding author. Tel: +86-10-66948829; E-mail: weiyuanyu@nic.bmi.ac.cn

国家高技术“863”计划基金资助(No. 2001AA215351).

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

与原核、昆虫和酵母表达系统相比,哺乳动物细胞表达系统具有更精确的转录后加工、翻译后修饰(糖基化、二硫键形成等),其表达产物在分子结构、理化性质和生物学功能等方面与天然蛋白更接近。因而哺乳动物细胞表达系统是目前重组蛋白药物,尤其是结构较复杂的重组蛋白(如:抗体,生长因子等)的主要表达系统。

现阶段,利用哺乳动物细胞表达系统制备重组蛋白药物依然存在研发周期长、成本较高等问题。目前建立特定重组蛋白的高表达细胞株的方法也有很大的局限性。主要是利用随机整合的方法将目的基因表达单元和筛选基因表达单元同时整合到宿主细胞的基因组中,然后挑选基础表达水平较高的克隆进行加压扩增,以提高目的基因的表达水平并筛选稳定的高表达目的蛋白的细胞系。由于在哺乳动物细胞基因组中存在大量的整合位点,插入染色体的位置影响真核基因的表达,即外源基因插入染色体区域所产生的影响,导致所谓的“位置效应”(position effect)。其中绝大部分整合位点不属于转录活跃区,因而目的基因在这些位点整合后的基础表达水平很低,即使某些位点位于转录活跃区,整合后基础表达水平也较高,但该位点也可能不适应随后的 MTX 加压扩增——因为在利用 MTX 对目的基因的拷贝数进行扩增时,必然会伴随整合位点周边序列的扩增,而周边序列的扩增可能对细胞的正常生长产生不良影响等,从而导致不能获得高表达细胞系。因而按照目前常规方法建立特定重组蛋白的高表达细胞株存在两个需要耗费大量的时间和精力阶段,即基础表达水平较高的克隆的筛选阶段和随后的加压扩增阶段。按照此常规方法建立特定重组蛋白的高表达细胞株,即使在人力和物力有充分保证的前提下,也往往需要 6~12 个月的时间。该方法本质上是基于随机整合的原理,在制备不同目的蛋白的高表达细胞株时,即使利用相同的宿主细胞和表达载体,由于前期工作中可供借鉴和利用的资源和信息相当有限,因而也必须重复克隆筛选及加压扩增过程,从而导致大量的时间和精力浪费。

针对随机整合方法的局限性,目前国内外的研究者进行了大量的研究,主要集中在以下两个方面。首先,对筛选基因的表达进行充分的弱化。筛选基因表达的弱化能够有效减少低表达克隆背景,从而在筛选整合在基因组中转录活跃区中基础表达水平较高的克隆时能够节省大量的时间和精力。筛选基因的弱化可以从基因表达的各个层次着手,包括转录、转录后加工、翻译等^[1]。另一方面,即确定或标

记基因组中某一个适合外源基因高表达的位点,通过位点特异性重组或同源重组的方式实现外源基因在该位点的定点整合和表达^[2,3]。定点整合不仅能够直接获得基础表达水平较高的克隆,而且由于整合位点固定,因而加压扩增程序的重复性将更好,对后期工作的指导性将更好,能够大大缩短建立特定重组蛋白高表达细胞株的周期和工作量。

本研究将在对筛选基因(*neo* 基因)的表达进行充分弱化的基础上,建立一个以 k_2tPA 为报告基因的筛选平台,从而筛选到多株可用于外源基因定点整合并高效表达的细胞株。该细胞株不仅可用于真核基因表达调控规律的研究,也将为建立新型高效哺乳动物细胞表达系统奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

菌株 DH5 α , 细胞株 CHO/dhfr⁻, 质粒 pOG44(含表达 Flp 重组酶的基因)为本室保存。常用限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*pfu* DNA 聚合酶、T4 PNK、dNTP 等购自 TaKaRa 公司和 NEB 公司。血清和 IMDM 培养基购自 Hyclone 公司。抗生素 G418 购自 Sigma 公司,抗生素 Hygromycin B 购自 Roche 公司。纤维蛋白原、凝血酶购自中国药品生物制品检定所。其他常用生化试剂购自军事医学科学院条件处,为分析纯。

1.2 细胞培养液

CHO/dhfr⁻ 细胞常规培养采用含 4mmol/L L-谷氨酰胺的 IMDM 培养基,并添加 1.5g/L 的 NaHCO₃, 0.1mmol/L 次黄嘌呤(H), 0.016mmol/L 胸苷(T)以及 10% 小牛血清。当使用筛选载体 pMCEscan 转染 CHO/dhfr⁻ 时,使用抗生素 G418,浓度为 400 μ g/mL,并去除 HT。当筛选定点重组 k_2tPA 的细胞株时,将抗生素改为 Hygromycin,浓度为 350 μ g/mL。利用 MTX 进行目的基因 k_2tPA 的加压扩增时,则将血清改为经透析的胎牛血清,并添加相应浓度的 MTX。

1.3 细胞转染

CHO/dhfr⁻ 转染前 24h 以 8×10^5 细胞/孔传于 6 孔板,24h 后细胞贴壁并覆盖孔底大致致密。筛选载体 pMCEscan 使用 *Ssp* I 线性化后,以 4 μ g/孔的量进行转染操作。具体方法和步骤参阅 Invitrogen 公司的 LipofectamineTM 2000 的使用说明。转染 24h 后,以 1×10^5 cells/瓶传入细胞瓶,使用相应的筛选培养基(含 G418 400 μ g/mL)进行阳性克隆的筛选。

1.4 Southern blot 分析基因组 DNA

转染 pMCEscan 的 CHO 细胞,经 G418 筛选获得

单克隆后,扩大培养至约 2×10^6 个时,提取基因组 DNA,采用 Promega 公司的试剂盒进行。20 μ g 基因组 DNA 用 *EcoRV* 进行完全消化,0.7% 的琼脂糖凝胶电泳分离(16V)36h。DNA 变性后在碱性条件下向尼龙膜转移(Hybond-N⁺, Amersham),以 α -³²PdCTP 标记(利用 Promega 公司的随机引物标记试剂盒, Cat. # U1100 进行标记)的 Neo 基因片断为探针进行 Southern Blot 分析以确定 pMCEscan 质粒在基因组中的拷贝数。

1.5 *k₂tPA* 表达水平的测定

溶圈实验 利用溶圈法分析重组 *k₂tPA* 的活性,参照文献[4]进行。尿激酶(UK)标准品购自中国药品生物制品检定所。UK 和 tPA 均为血纤维蛋白溶酶原激活物(PA),血纤维蛋白原在凝血酶作用下形成纤维蛋白,与琼脂糖凝胶固定在塑料板或玻璃板上,PA 能激活纤溶酶原转变为纤维蛋白溶解酶,可使纤维蛋白凝块溶解,形成透明溶解圈,在一定范围内 PA 浓度的对数与溶解直径呈线性关系,根据标准 PA 浓度与溶解圈直径大小作图或用直线回归公式计算出 PA 的含量。

1.6 外源基因通过位点特异性重组入重组细胞株

携带外源基因(*k₂tPA*)的打靶载体 pcDNA5/FRT-tPA 与表达重组酶 FLP 的质粒 pOG44 混合后,共转染经 Southern Blot 鉴定的整合单拷贝 pMCEscan 的 CHO 的细胞株。转染 24h 后,以 2×10^4 cells/瓶传入细胞瓶,使用相应的筛选培养基(含 Hygromycin B 350 μ g/mL)进行阳性克隆的筛选。两到三周后挑取单克隆测定 *k₂tPA* 的表达水平。

1.7 中靶细胞株的 MTX 加压扩增

通过位点特异性重组获得整合外源基因的 Hygromycin B 抗性的细胞克隆。该单克隆经扩大培养后,以 2~3 个/孔传入 96 孔细胞板进行相应浓度 MTX 的加压筛选。3~4 周后经筛选配基培养获得的单克隆经逐级扩大直至测定外源基因的表达水平。每轮获得的具有最大表达水平且形态好的克隆再进行下一轮的 MTX 加压筛选程序。

2 结果

2.1 pMCEscan 载体的构建

筛选载体 pMCEscan(图 1)的构建是基于商业化载体 pIRESneo(Clontech)的基本骨架。通过 DNA 重组技术将 pIRESneo 中的 CMV 启动子替换为经突变弱化的 **Psv40* 启动子,将原有的 DHFR 基因替换为报告基因 *K₂tPA*,这样形成一个通过 IRES 偶联的 **Psv40*-MCS-IRES-*K₂tPA*-poly(A) 报告基因表达单

元。再构建一个单独的 **Psv40*-DHFR-poly(A) 表达单元,连入上述载体。最后在多克隆位点中间插入重组酶 FLP 特异性识别的 FRT 位点及融合的 *neo* 基因,构成 pMCEscan 载体。我们对筛选载体 pMCEscan 中 *neo* 基因的表达进行多种弱化设计(表 1)形成一系列筛选载体,并寻找到合适的筛选载体对 CHO 基因中的转录热点进行高效筛选。

携带外源基因(*k₂tPA*)的用于位点特异性重组的载体 pcDNA5/FRT-tPA(图 1)是在商业化载体 pcDNA5/FRT(Invitrogen)的多克隆位点中插入所表达的外源基因。该载体所携带的 FRT 位点在重组酶 FLP 的作用下与 pMCEscan 中的 FRT 位点间形成重组,使外源基因在细胞的基因组中发生整合。

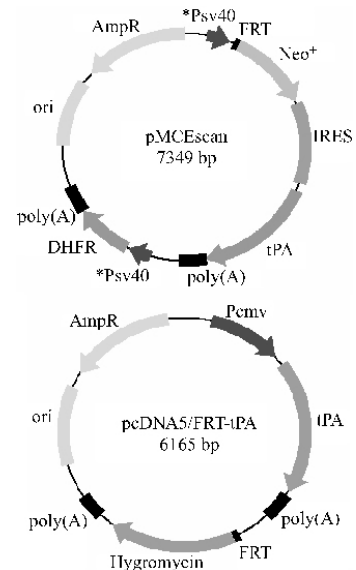


图 1 筛选载体 pMCEscan 和用于位点特异性重组的载体 pcDNA5/FRT 的结构示意图

Fig. 1 Maps of plasmids

**Psv40* enhancer deleted SV40 early promoter, *FRT* Flp recombination target site, *Neo*^{*} mutant neomycin-resistance gene, *IRES* internal ribosome entry sites, *tPA* tissue-type plasminogen activator, *poly(A)* Bovine growth hormone poly A additional sequence, *DHFR* dihydroforate reductase, *Pcmv* Cytomegarovirus early promoter, *Hygromycin* hygromycin-resistance gene.

2.2 载体 pMCEscan 筛选基因(*neo*)的弱化程度

我们所构建的筛选载体 pMCEscan,其筛选基因 *Neo* 的 5' 端融合有 *FRT*(Flp recombinant target)位点。该质粒可方便地用于筛选在基因组中整合 *FRT* 位点的细胞株。由于野生型 SV40 启动子的转录活性强,因而利用该启动子建立在基因组中整合 *FRT* 位点的细胞株时,会出现大量的阳性克隆,但其中的大部分克隆的 *FRT* 位点在基因组中的整合位点并不理想,不适合外源基因在该位点的定点整合和高表达。因此,本研究对筛选载体 pMCEscan 的 *Neo* 基因进行了充分的弱化,以提高其筛选效率,即对该载体中的 SV40 启动子进行了弱化。有文献报道,缺失

SV40 的部分增强子序列将大大降低 SV40 启动子的转录水平^[5]。因而利用缺失增强子序列的 SV40 启动子指导抗性基因的表达时,能够大大减少低表达的背景克隆,从而更方便地筛选到在基因组中转录活跃区(或称热点)整合有 FRT 位点的细胞株。在

表 1 pMCEscan 系列载体 *neo* 基因翻译水平弱化方式的组合特征

Table 1 Characters of impaired translation neomycin resistant gene of pMCEscan series vectors

Plasmid pMCEscan-	p5	p4	p6	p7	p8
Impaired SV40 promoter	+	+	+	+	+
Mutant of neomycin resistant gene	-	+	+	+	+
Out-of-frame start condon(ATG)	-	-	-	+	+
Impaired kozak sequence	+	-	+	-	+
Stem-loop of translation initial sequence	+	-	+	-	+

我们使用该系列筛选载体转染 CHO/dhfr⁻ 细胞,并评价其克隆形成率(个/10⁶ cell)及报告基因 k₂tPA 的混合表达水平(UK IU/10⁶ cell·24h)。图 2 表明 pMCEscan-7(p7)的克隆形成率为 1.54 个/10⁶ cell,其报告基因的混合表达水平为 26.21UK IU/10⁶ cell·24h(0.32μg/10⁶ cell·24h)。p7 的克隆形成率比商业化载体 pcDNA3.1(+)低约 1000 倍,同时其混合表达水平也达到了最高,因此 p7 具有最高的筛选效率并被用于大规模转染 CHO/dhfr⁻ 细胞。

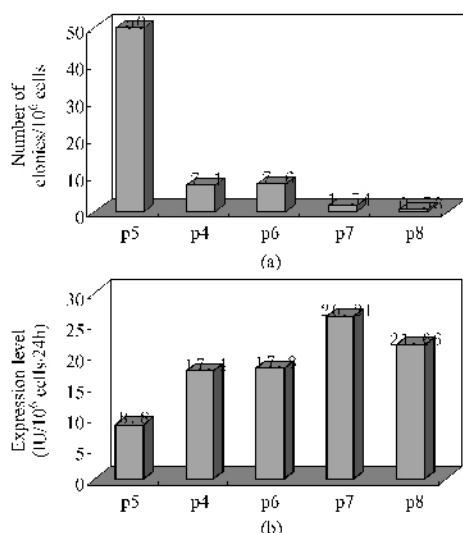


图 2 pMCEscan 系列载体的克隆形成率和混合表达水平的比较

Fig. 2 The screening efficiency of the series pMCEscan plasmids

a : the number of viable colonies produced by transfect the plasmids ; b : the expression level of the plasmids' reporter gene.

2.3 整合单拷贝筛选载体 pMCEscan 细胞株的筛选及鉴定

利用 *Ssp* I 将质粒 pMCEscan-7 进行线性化,然后利用 Invitrogen 公司的阳离子脂质体 Lipofectin2000

翻译水平上,我们应用 *neo* 基因的突变体、在 *neo* 基因的起始使用不同读框的 ATG、突变 Kozak 序列及在翻译起始序列形成茎环结构等不同组合(表 1),构建一系列 pMCEscan 载体。

转染 CHO/dhfr⁻ 细胞,随后用 400μg/mL G418 筛选。共转染细胞量达 5.2 × 10⁷ 个细胞,挑选 82 个报告基因(k₂tPA)基础表达水平较高的阳性克隆;上述克隆的基因组用 *Eco*RV 进行完全消化,以同位素标记的 *Neo* 基因片断为探针进行 Southern blot 分析以确定 pMCEscan 质粒在基因组中的拷贝数。整合单拷贝 pMCEscan 的细胞株在杂交后的显影,将显示为单一条带(图 3)。最终筛选到 7 株整合了单拷贝 pMCEscan 的细胞株,这些细胞株以其载体及克隆编号命名。

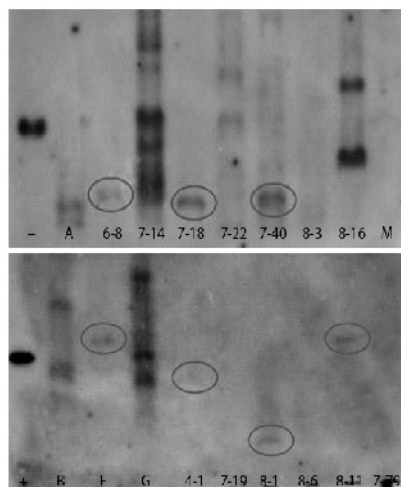


图 3 Southern blot 检测 CHO/dhfr⁻ 细胞基因组中整合 pMCEscan 的拷贝数

Fig. 3 Analysis of the integration copy number of the pMCEscan series plasmids

DNA (15μg) from pMCEscan transformants was digested with *Eco*RV and analyzed by Southern blot using a partial *neo* probe. Cell lines containing a single copy of the *FRT-neo*^{*} was marked by red loops.

2.4 外源基因 k₂tPA 在 CHO/dhfr⁻ 细胞基因组中的定点整合

利用 Invitrogen 公司的阳离子脂质体

Lipofectin2000 将质粒 pcDNA5/FRT-tPA 和 pOG44 共转染各整合单拷贝 pMCEscan 的细胞株。依据 flp-FRT 定点重组系统的原理(图 4), pOG44 质粒表达的 flp 重组酶将能够介导质粒在各单拷贝细胞株基因组中的 FRT 位点的定点整合, 而且定点整合后,

原基因组中的 $Neo^* -IRES -k_2 tPA$ 表达单元将被灭活, 而表达新整合的 Hygromycin B 基因, 而且作为目的基因表达的 $k_2 tPA$ 的表达水平将会有显著的提高。

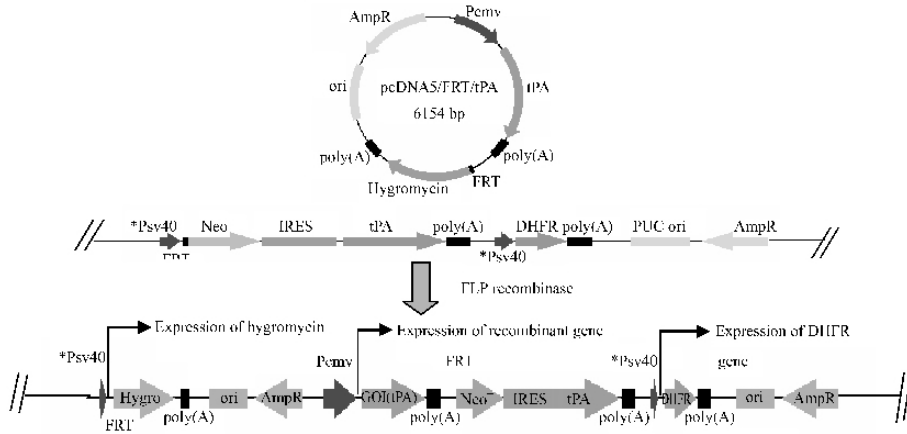


图 4 FLP-FRT 位点特异性重组示意图

Fig. 4 Activation of a functional FRT-hygromycin gene by site-specific targeting

The circular targeting vector pcDNA5/FRT and the chromosomal, functional FRT- neo^* target of pMCEscan are shown. FLP-catalyzed integration regenerates a functional hygromycin gene. At the same time, the integrants lose the neomycin resistance.

我们通过位点特异性重组将外源基因定点整合到上述 7 株单拷贝细胞株后, 首先利用 Hygromycin B 筛选, 然后每株随机挑取 12 个阳性克隆进行分析, 结果表明这些克隆都表现为 Hygromycin B 抗性, $k_2 tPA$ 表达水平有了显著性提高且具有相近的表达水平。这些研究结果表明 $k_2 tPA$ 基因已在 CHO/dhfr⁻ 基因组中的 FRT 位点定点整合并获得有效表达。图 5 为各单拷贝细胞株定点整合外源基因后的表达水平的比较, 其中细胞株 8-1 (177 ± 45.1) UK IU/ 10^6 cell·24h (相当于 2.2 ± 0.5) μ g/ 10^6 cell·24h) 的基础表达水平可达 2μ g 水平以上。

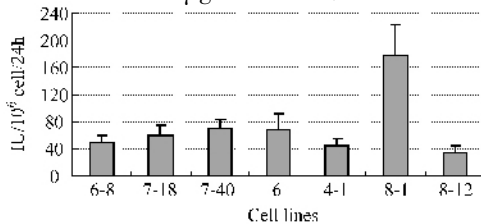


图 5 整合单拷贝 pMCEscan 细胞株定点整合目的基因后基础表达水平

Fig. 5 Basal expression level of single-copy cell lines after targeted $k_2 tPA$

Bars indicate the results of assays from different clones ($n = 12$) which selected by Hygromycin B (350 μ g/mL in IMDM). Specific activity of tPA is 80,000 IU/mg (data not show). Values represent the means \pm S. E. M.

2.5 用于定点整合系统的细胞株 8-1 的 MTX 加压扩增试验

由于在 pMCEscan 载体设计有单独表达单元 *Psv40-DHFR-poly(A), 因此可以通过 MTX 加压对整合在 CHO/dhfr⁻ 细胞基因组中热点区域的 $k_2 tPA$ 基因进行扩增。定点整合细胞株 8-1 在通过三轮 MTX 的加压及多步亚克隆后, 获得多株 $k_2 tPA$ 表达量大于 10μ g/ 10^6 cell·24h 的细胞株(图 6)。所获得的 4 株亚克隆中, 其中 A(图 6, A)在 MTX = 70nmol 时表达水平可达 1374.3UK IU/ 10^6 cell·24h (相当于 17.1μ g/ 10^6 cell·24h); B(图 6, B)在 MTX = 50nmol 时表达水平可达 1144.3UK IU/ 10^6 cell·24h (相当于 14.3μ g/ 10^6 cell·24h); C(图 6, C)在 MTX = 70nmol 时表达水平可达 1000.3UK IU/ 10^6 cell·24h (相当于 12.5μ g/ 10^6 cell·24h); D(图 6, D)在 MTX = 70nmol 时表达水平可达 989.4UK IU/ 10^6 cell·24h (相当于 12.3μ g/ 10^6 cell·24h)。结果可以预示, 随着筛选规模的扩大和 MTX 浓度的上升, 其表达水平还有提高的空间。

3 讨论

哺乳动物表达系统与其他表达系统相比, 其实现重组蛋白的高表达存在研制周期长, 综合成本高

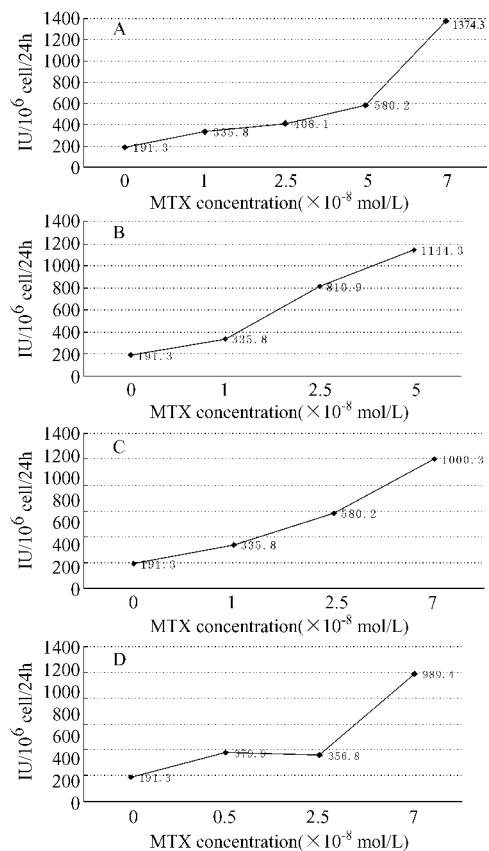


图6 细胞株 8-1 整合外源基因 k_2 tPA 后 MTX 加压后亚克隆表达水平

Fig. 6 Assay for the expression level of engineering cell line 8-1 targeted by recombinant gene when treated by MTX gene-amplified

等问题。这主要是由于筛选高表达细胞株是一个既费时又费力的过程。因而研制高效、经济的真核表达系统一直是生物技术领域,尤其是生物制药领域的一个重要发展方向。目前大量的研究表明,决定重组蛋白在哺乳动物细胞中表达水平的因素是多方面的,包括目的基因在基因组上的拷贝数,目的基因在基因组的整合位点,以及指导目的基因表达的启动子强度,表达产物的稳定性等。其中,实现目的基因在细胞基因组中转录活跃区(或称转录热点 hot spot)的整合是一个关键因素。为实现此目的,目前主要有两个思路,其一就是通过弱化筛选基因表达,从而提高获得目的基因在热点整合克隆的概率。其二为通过同源重组或位点特异性重组直接将外源基因整合到基因组中的转录热点。由于体细胞的同源重组(即体细胞打靶)比较困难,所以目前只有少量的成功报道;而位点特异性重组技术则相对比较成熟。

早在 1992 年, Fukushige 和 Sauer 通过融合有 loxP 序列的 neo 基因的筛选质粒,获得整合有单拷贝的 loxP 序列的细胞株后,使用 Cre 酶实现了外源基

因在 CHO 细胞基因组的定点整合,使 β -gal 基因能够稳定高效表达^[6]。2002 年, Kito 等同样采用 Cre-loxP 系统介导质粒在 CHO 染色体上的定点整合,实现了抗体的高表达,转瓶培养 7d 后,抗体分泌量达到 160mg/L^[2]。Raju K^[3]等用反向遗传学的方法克隆了 CHO 高表达细胞株染色体上整合位点两侧的侧翼序列-HIRPE(Hot spot for increased recombinant protein expression, HIRPE)构建了表达载体,同时使用 HIRPE 序列构建了同源重组载体 pTV(1), pTV(1)携带的目的基因与 CHO 细胞基因组发生同源重组后,使 CTLA4lg 在 CHO 细胞中的基础表达水平比不含 HIRPE 载体的基础表达水平高 10 倍。Reff^[7]等通过同源重组的方式实现了外源基因在 CHO 细胞基因组中的体细胞打靶。国内,刘志刚等^[8]在定点整合方面做了有益的尝试,他们获得了能够实现外源基因在基因组中定点整合和有效表达的 CHO/dhfr⁻ 细胞系,单链抗体-尿激酶融合基因在 MTX 加压后表达量达到 5 μ g/10⁶ cell·24h。目前,国内没有任何商业化的定点整合高效表达系统可供使用。

为实现目的基因在 CHO/dhfr⁻ 细胞基因组中转录活跃区的定点整合和高表达,我们首先对筛选基因表达水平进行了一系列弱化而构建了真核表达质粒 pMCEscan。该载体中筛选基因的弱化包括:缺失增强子以降低转录水平;破坏 kozak 序列以降低翻译水平;将筛选基因与报告基因构建成双顺反子结构实现表达偶联以减少假阳性克隆的产生。利用脂质体转染,将构建的筛选载体 pMCEscan 随机整合到 CHO/dhfr⁻ 细胞基因组,通过一系列筛选和鉴定,获得在基因组中转录活跃区整合 FRT (flp recombination target)位点的 CHO/dhfr⁻ 细胞株。为了克服基因组中“位置效应”的影响,我们选取整合了单拷贝 pMCEscan 的细胞株作为定点整合系统的候选细胞株。我们希望获得基础表达水平高、整合了单拷贝 pMCEscan、耐受 MTX 加压扩增及稳定性好的细胞株。细胞株 8-1 在所筛选的克隆中符合这些特征,这样整合 FRT 位点的细胞株 8-1,表达重组酶 FLP 的质粒 pOG44 和可携带外源基因的载体 pcDNA5/FRT 共同构成定点整合高效表达体系。

本研究建立的基于 flp-FRT 重组系统的 CHO/dhfr⁻ 细胞定点整合和表达系统能够方便、快速、有效地实现外源基因在 CHO/dhfr⁻ 基因组中转录活跃区的定点整合和高效表达,并可通过 MTX 加压,有效提高目的基因的表达。因而该系统将能缩短蛋白药物的研制周期,降低研发成本,加速基因工程药物的产业化进程,具有良好的应用前景。同时,由于该系统之

细胞株可以快速实现特定的靶分子在 CHO/dhfr⁻ 细胞基因组中整合和表达,因此可方便地将特定的调控分子定点整合到 CHO/dhfr⁻ 细胞的基因组中,通过表达这些特定的调控基因来改变宿主细胞的功能分子,从而改善 CHO/dhfr⁻ 细胞大规模培养特性,为研制高效经济的 CHO/dhfr⁻ 细胞表达系统奠定了良好的基础。而且,该系统在真核细胞表达调控等理论研究方面具有较好的应用。由于该系统能够实现外源基因片段在细胞基因组中的 FRT 位点定点整合,筛选所得克隆在理论上都是一致的(包括整合位点,拷贝数等),因而能够方便地应用于不同表达调控元件(包括不同启动子,增强子,5'或3'非翻译区等)的分析比较。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lucas BK, Giere LM, DeMarco RA, et al. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR in intron expression vector. *Nucleic Acids Research*, 1996, **24**(9): 1774 - 1779.
- [2] Kito M, Itami S, Fukano Y, et al. Construction of engineered CHO strains for high-level production of recombinant proteins. *App Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**: 442 - 448.
- [3] Koduri RK, Miller JT, Thammana P. An efficient homologous recombination vector pTV(1) contains a hot spot for increased recombinant protein expression in Chinese hamster ovary cells. *Gene*, 2001, **280**: 87 - 95.
- [4] Han SW(韩素文), Yu WY(俞炜源), Li XZ(李秀珍) et al. Study on plasminogen activators secreted by various cultured cell. *Bulletin of The Academy of Military (Medical Sciences)* (军事医学科学院院刊), 1987, **11**: 101 - 108.
- [5] Wildeman AG. Regulation of SV40 early gene expression. *Biochem Cell Biol*, 1988, **66**(6): 567 - 577.
- [6] Shinichi Fukushige, Brian Sauer. Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, **89**: 7905 - 7909.
- [7] Reff MR, San Diego, Richard Spence Barnett, et al. US Patent, No: 6841383. 2005 - 01 - 11.
- [8] Liu ZG(刘志刚), Lin JB(林建波), Xu LF(许凌峰), et al. Construction of targeted integration and high expression system in CHO/dhfr-cell line. *Bulletin of The Academy of Military (Medical Sciences)* (军事医学科学院院刊), 2004, **28**(6): 501 - 504.