

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620101152323

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

HEK 293 6E 细胞瞬时基因表达平台的建立
及应用

Construction and Application of Transient Gene Expression
Platform in HEK 293 6E cells

沈 容

指导教师姓名: 罗文新 副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩日期: 2013 年 6 月

学位授予日期: 2013 年 6 月

答辩委员会主席: 史维国 教授

评 阅 人: _____

2013 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()
课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室
的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课
题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

重组蛋白药物在市场中需求量越来越大。哺乳动物细胞能够进行复杂的翻译后加工修饰使蛋白产物更接近天然构象，从而在各种重组蛋白表达系统中占据优势地位。近来，瞬时基因表达系统发展迅速，通过瞬时表达可以快速的获取大量的高活性重组蛋白。本研究的策略是通过摸索 HEK 293 6E 悬浮细胞的无血清瞬时转染条件和转染方法，并通过 Fed-Batch 方式补料维持细胞良好状态来达到提高瞬转产量。

本研究以绿色荧光蛋白 GFP、嵌合抗体 10F7 cAb 为报告基因来评价转染和补料等条件对瞬时表达产量的影响；以人源化抗体 E6F6 hAb、嵌合抗体 129G1 cAb、嵌合抗体 5F9 cAb 为报告基因来评价信号肽改造、密码子优化对瞬时表达产量的影响。HEK 293 6E 细胞无血清转染优化条件包括培养基、真核载体、DNA/PEI 比例、细胞密度、转染方法等等。经过优化后在 4×10^6 cells/ml 细胞密度下以 PEI 为转染试剂，pTT5 为表达载体，DNA/PEI 为 1/8 条件下转染，转染效率可以达到 60% 以上，10F7cAb 产量可由初始 40mg/L 提高至 313mg/L。而采用 DOP 转染方法的转染效率可到 70% 以上，10F7cAb 产量可达 400mg/L。

为改善细胞转染后的表达条件及提高表达水平，本研究采用 Fed-Batch 的方式添加营养物质，营养物质包括动物蛋白水解物，丁酸钠，维生素 B12，柠檬酸铁，FM 补料培养基等。这些营养物质对目的蛋白的产量提高效果不尽相同，提高范围从 15% 至 35%，最高表达产量可达 553mg/L。本研究也对外源基因的信号肽和密码子组成进行了改造。信号肽改造对于不同抗体分别有 33% 和 112% 的产量提高，而密码子优化后的 5F9cAb 表达产量比原始提高了 25 倍。

我们利用初步建立的 HEK 293 6E 细胞瞬时基因表达系统表达了多种蛋白，并以禽流感病毒 H5N1 亚型的 HA 蛋白的表达、纯化及活性鉴定为例对此表达平台进行评价。结果表明，经改造后瞬时表达的 HA0 具有血凝活性。

关键词：HEK 293 6E，瞬时基因表达，Fed-Batch，抗体，血凝素蛋白

Abstract

In recent years, the demand for recombinant therapeutic proteins has significantly increased in the drug market. Mammalian cell lines have emerged as a new and powerful alternative for the production of therapeutic proteins due to their ability to perform many of the necessary post-translational modifications for full bioactivity. Recently, improvements in the transient gene expression (TGE) system have shown that mammalian cells can be used to produce a large number of highly active recombinant proteins in a short time. In this study, we sought to improve productivity by focusing on the facilitated transfection of HEK 293 6E, and by improving cell maintenance and protein expression through a fed-batch process. Green fluorescence protein (GFP) and 10F7 cAb were used as report proteins to assess and improve transient gene expression in HEK 293 6E cells under various transfection or fed-batch conditions. E6F6 hAb, 129G1 cAb, and 5F9 cAb were used as report proteins to estimate the effects on multiple signal peptides and codons. In order to optimize the transient expression in HEK 293 6E cells, we altered experimental parameters including culture medium, vector, DNA-to-PEI ratio, cell density, and transfection methods. Following data acquisition, the transfection efficiency was shown to be 60% under experimental conditions with cell densities of 4×10^6 cells/ml, PEI and pTT5 as the transfection agent and expression vector respectively, and a DNA to PEI ratio of 1/8. Furthermore, the production of 10F7 cAb increased from 40mg/L to 313mg/L. Following a DOP protocol transfection efficiencies were shown to be 70%, with 10F7 cAb production over 400 mg/L.

To improve cell maintenance and protein expression, a fed-batch culture was maintained using media enriched with animal protein hydrolysate, sodium butyrate, vitamin B12, ferric citrate, and feed medium. These nutrients were shown to increase protein production from 15% to 35%, with the greatest expression up to 553mg/L. In this study, we also performed a refomation and optimizatio of signal peptides and

codons which increased protein production by 33% in E6F6 hAb and 112% for 129G1 cAb cells. The production of 5F9 cAb was 25 times after codons optimized than the origin.

We had previously discovered optimized TEG system in HEK 293 6E cells, leading to the successful production of variety of proteins. For example, we have already constructed, expressed, and purified a recombinant HA0 protein, which proved more effective than the HA0 protein produced within yeast. This HA0 protein can be indentified with hemagglutination activity.

Key words: HEK 293 6E, Transient gene expression, Fed-Batch, antibody, hemagglutinin.

缩略词

缩写	英文全称	中文名称
AIV	Avian Influenza Virus	禽流感病毒
ADCC	Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity	抗体依赖、细胞介导的细胞毒反应
BHK-21	baby hamster kidney cell	仓鼠幼婴肾细胞
bp	base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cAb	Chimeric antibody	嵌合抗体
CDC	Complement dependent cytotoxicity	补体依赖细胞毒反应
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
CDR	Complementarity Determining Region	抗原决定簇
CHO-S	Chinese hamster ovary suspension cells	中国仓鼠卵巢癌细胞(悬浮)
CMV	Cytomegalovirus	巨细胞病毒
DHFR	dihydrofolate reductase	二氢叶酸还原酶
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲亚砜
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DOP	Developmental Operating Procedure	优化的操作步骤
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FcRn	Fc receptor	Fc 受体
FDA	Food and drug administration	美国食品药品监督管理局
GAH	Goat anti human	山羊抗人
GFP	Green fluorescence protein	绿色荧光蛋白
HA	Hemagglutinin	血凝素
hAb	Humanized antibody	人源化抗体
HEK293	Human embryo kidney cells 293	293 人胚肾细胞
HBsAg	HBV surface antigen	乙肝病毒表面抗原

缩略词

HI	Hemagglutination inhibition test	血凝抑制实验
HIV	Human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
H & T	Hypoxanthine & Thymidine	次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷
IgG	Immunoglobulin	免疫球蛋白 G
kD	kilo Daltons	千道尔顿
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
MW	Molecular Weight	分子量
nt	Nucleotide	核苷
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
Ori	Origin	复制起始位点
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEI	Polyethylenimine	聚乙烯亚胺
PH	Hydrogen ion concentration	氢离子浓度指数
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
SFM	Serum Free Medium	无血清培养基
SIV	Simian immunodeficiency virus	猿免疫缺陷病毒
TGE	Transient Gene Expression	瞬时基因表达
tPA	Tissue Plasminogen Activator	组织型纤溶酶原激活剂
VCD	Viable cell density	活细胞密度
WB	Western blotting	免疫印迹实验
Yu777	A/Ck/HK/YU777/02 (H5N1)	H5N1 病毒株 Yu777

目 录

摘要	I
Abstract.....	II
缩略词	IV
第一章 前言	1
1 重组蛋白	1
1.1 重组蛋白药物的发展	1
1.2 治疗性抗体	2
2 重组蛋白表达系统	5
2.1 原核表达系统	6
2.2 真核表达系统	7
3 哺乳动物细胞瞬时表达系统	16
3.1 瞬时基因转染方法	17
3.2 瞬时基因表达载体	18
4 瞬时基因表达产量提高的方法	19
4.1 细胞工程策略	17
4.2 基因工程策略	20
4.3 化学药物添加	21
5 研究目的及意义	21
第二章 材料与方 法	23
1 材料	23

1.1 主要仪器	23
1.2 主要试剂与材料	24
1.3 常用溶液及培养基配置	26
2 方法	30
2.1 分子克隆常规操作	30
2.2 细胞实验常规操作	34
2.3 蛋白活性检测与纯化方法	36
第三章 结果与分析	42
1 HEK 293 6E 细胞无血清瞬时转染.....	42
2 HEK 293 6E 细胞无血清瞬时转染条件优化.....	43
2.1 不同培养基对 HEK 293 6E 细胞瞬时表达的影响.....	43
2.2 不同载体对 HEK 293 6E 细胞瞬时表达的影响.....	44
2.3 DNA 用量对 HEK 293 6E 细胞瞬时表达的影响	46
2.4 不同转染密度对 HEK 293 6E 细胞瞬时表达的影响.....	47
2.5 不同转染方法对 HEK 293 6E 细胞瞬时表达的影响.....	49
2.6 不同抗体表达信号肽对 HEK 293 6E 细胞瞬时表达的影响.....	59
2.7 密码子优化对 HEK 293 6E 细胞瞬时表达的影响.....	61
3 HEK 293 6E 细胞无血清瞬时表达系统的应用.....	66
3.1 不同蛋白在 HEK 293 6E 细胞中的瞬时表达水平.....	66
3.2 HA0 蛋白在 HEK 293 6E 细胞中的瞬时表达、纯化及活性检测	68
第四章 讨论	72
1 瞬时基因表达系统的稳定性	72

2 瞬时基因表达系统无血清转染及条件优化	73
3 瞬时基因表达系统产量提高策略	75
4 瞬时基因表达系统应用及 HA 蛋白的表达	78
第五章 小结与展望	79
1 小结	79
2 展望	80
参考文献	81
致谢	89

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	II
Abbreviations	IV
Chapter 1 Introduciton	1
1 Recombinant protein	1
1.1 The development of recombinant protein	1
1.2 Therapeutic antibody	2
2 Expression systems of recombinant protein.....	5
2.1 Prokaryotic expression system.....	6
2.2 Eukaryotic expression system	7
3 Transient gene expression systems in mammalian cells.....	16
3.1 The methods of transient gene transfection	17
3.2 The vectors of transient gene expression	18
4 Improvement of the exprssion level of transient gene expression	19
4.1 Cell engineering strategies.....	19
4.2 Gene engineering strategies.....	20
4.3 Chemical supplements.....	21
5 The purpose and meaning of this research.....	21
Chapter 2 Materials and Methods	23
1 Materials	23

1.1 Instrument	23
1.2 Reagent and materials	24
1.3 Solvents and medium.....	26
2 Methods.....	30
2.1 Molecular cloning	30
2.2 Cell experiments	34
2.3 Protein identification and purification	36
Chapter 3 Results and Analysis	42
1 Serum-free transient transfection in HEK 293 6E cell.....	42
2 Optimization of serum-free transient transfection in HEK 293 6E cell	43
2.1 The effect of different medium on the production in HEK 293 cell.....	43
2.2 The effect of different vectors on the production in HEK 293 cell	44
2.3 The effect of DNA amount on the production in HEK 293 cell	46
2.4 The effect of different cell density on the production in HEK 293 cell.....	47
2.5 The effect of different methods on the production in HEK 293 cell	49
2.6 The effect of different signal peptides on the production in HEK 293 cell ...	59
2.7 The effect of codon optimized on the production in HEK 293 cell.....	61
3 Application of serum-free transient gene expression system	66
3.1 The expression level of different proteins in HEK 293 6E cell.....	66
3.2 Expression, purification, identified of HA0 in HEK 293 cell	68
Chapter 4 Discussion	72
1 The stability of transeint gene expreesion system.....	72

2 Serum-free transfection and parameters optimization of transient gene expression system.....	73
3 The strategies of improving prodction in transient gene expression system.....	75
4 Application of transient gene expression system and the expression of HA	78
Chapter 5 Brief summary and prospect	79
1 Brief summary.....	79
2 The prospect	80
References.....	81
Acknowledgement.....	89

第一章 前言

1 重组蛋白

1.1 重组蛋白药物的发展

蛋白质是一种复杂的大分子有机化合物，在人体生命活动中起着重要的作用，可以说没有蛋白质就没有生命活动的存在。蛋白质在细胞中参与了生长、代谢、组织分化、运输和运动^[1]。在多细胞的有机体中，蛋白质还参与免疫系统，神经信号，生长和分化的调控^[1]。这些蛋白质突变、异常都会造成机体的各种疾病。人体染色体基因组有超过 30000 个基因，而能生产蛋白质的基因数量甚至会更高^[2,3]，这就为制药公司发展新药提供了机会，使得新药的出产几率大幅地提高^[4]。因此近年来，兴起了以蛋白质为热点的治疗方法研究。最开始用于治疗蛋白药物是从动物或人体中直接分离出来的，比如说从人体中分离的生长激素^[5]，从猪和牛身上提取的胰岛素^[6]，从雌性个体尿液中分离的孕激素^[7]等等。然而，这种方法因安全性、规模性以及病人的耐受性等原因并没有得到广泛的应用^[5,6]。

自 20 世纪 70 年代末以来，生物技术和进步使蛋白质体外合成成为可能，这些利用 DNA 重组技术或 RNA 重组技术获得的蛋白质称之为重组蛋白。与以往的小分子药物相比，重组蛋白药物具有活性高、特异性强、毒性低、生物功能明确、利于临床应用等优点，使其广泛应用于医疗卫生领域。1984 年第一个由原核表达系统 *E. coli* 生产的胰岛素正式投入人体治疗中^[8]，标志着治疗性重组蛋白时代的来临。而第一个由真核表达系统中国仓鼠卵巢细胞（CHO）生产的组织性纤维蛋白溶酶原活化剂（tPA）也于 1986 年投入使用^[9,10]，到目前为止，已有 60~70% 的重组蛋白药物是由哺乳动物细胞表达生产的^[9]。至 2010 年，FDA 已经批准上百种新重组蛋白上市，包括一些单克隆抗体和 300 多种非重组的药物，如血制品、疫苗等^[11]，重组蛋白药物的总市场规模已超过 521.5 亿美元，重组蛋白药物广泛应用于艾滋病、关节炎、炎症及免疫缺陷等领域的治疗^[12]。重组蛋白药物从 2004 年至 2010 年市场规模的变化以及应用于各领域的变化如图 1.1 中所示。

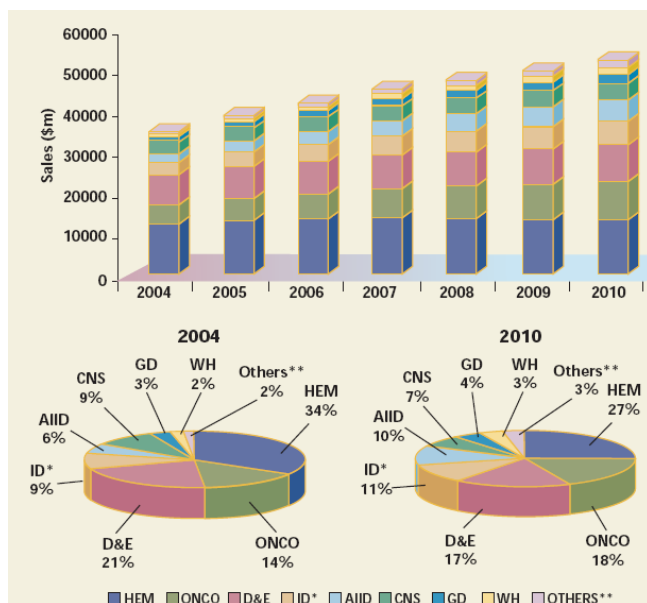


图1.1 从2004至2010重组蛋白药物市场增长及领域分布^[12]
Fig.1.1 Market growth and distribution from 2004 to 2010

1.2 治疗性抗体

重组蛋白药物可分为多肽药物、基因工程药物、单克隆抗体、基因工程抗体及重组疫苗等。目前销售的重组蛋白药物种类繁多，主要有各类干扰素、细胞因子、红细胞生成素、组织纤溶酶原激活剂及治疗性抗体等等，而其中又以治疗性抗体生产规模最大、销售收入最高，截止到2012年抗体类药物已超过32种。2012年畅销的11种重组蛋白药物中有7种是治疗性抗体药物。2012年仅罗氏公司上市的治疗乳腺癌的抗体——赫赛汀全球销售额就超过60亿美金，由此可见抗体市场的巨大。自2007年起，每年有超过40种单克隆抗体药物进入临床研究，表1.1中总结了近年来进入临床研究阶段治疗肿瘤相关的抗体。

表 1.1 近年来进入临床研究阶段的单克隆抗体

Table 1.1 Monoclonal antibody therapeutics approved for clinical use

Generic Name/Trade Name Manufacturer	Launch Date	Major Indication	Target	Protein Form/Isotype	Delivery	Reference
Tocilizumab Actemra Roche/Chugai	2005	Castleman's disease	IL-6R	Humanized IgG1	IV	[13]
Ranibizumab Lucentis Genentech/Novartis	2006	Wet age-related macular degeneration	VEGF	Humanized mab fragment of Avastin	Injection into the eye	[14]

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫