# HEK 293 细胞中重组型抗体表达和分泌的监测系统的构建

何曾安， 柳艺石， 张慧杰， 高晓冬， 藤田盛久*
（江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

**摘要：** 免疫球蛋白 G（Immunoglobulin G，IgG）作为一种十分重要的生物药物，已被广泛应用于多种医学诊断和治疗。为构建高效表达重组抗体的哺乳动物生产菌株，运用可以灵活检测抗体分泌运输的表达细胞株，从而充分理解抗体的折叠、转运及分泌尤为重要。作者在哺乳动物细胞株（HEK 293）中构建了一个稳定表达绿色荧光蛋白（GFP）融合型抗体 E-F-HyHEL10 的表达系统，可通过流式细胞术检测抗体的分泌运输。此哺乳动物细胞表达系统具有良好的抗体表达和分泌水平，且稳定维持了抗体的功能活性。使用布雷菲德菌素 A（brefeldin A）和放线菌酮处理细胞后，来自胞内 E-F-HyHEL10 的 GFP 荧光信号与抗体分泌水平呈正相关。结果表明，本研究中构建的抗体表达系统可实现抗体表达、累积和分泌水平的灵活准确监测，未来可应用于哺乳动物细胞中抗体分泌相关因子的筛选。

**关键词：** 抗体；流式细胞术；蛋白质分泌；EGFP
**中图分类号：**Q 786　**文章编号：**1673-1689(2019)07-0001-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.07.001

# Construction of a System to Monitor Recombinant Immunoglobulin Secretion in HEK 293 Cells

*HE Zeng'an*， *LIU Yishi*， *ZHANG Huijie*， *GAO Xiaodong*， *Morihisa Fujita**
（School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

**Abstract：** Immunoglobulin G （IgG） is one of the most important pharmaceuticals，which has been widely used in many kinds of diagnoses and therapies. To construct cell lines that can produce high amounts of recombinant antibodies，it is essential to understand factors required for the folding and secretion/transport of antibodies using a monitoring system. In this study，we established a mammalian cell line （HEK 293） to stably expressing a green fluorescent protein （GFP）-fused IgG E-F-HyHEL10，which could monitor the recombinant antibody secretion using the flow cytometry. The E-F-HyHEL10 was successfully expressed and secreted well into the medium，and could retain the antibody's biofunction. After treatment with either brefeldin A or cycloheximide，the GFP

**收稿日期：** 2016-12-19
**基金项目：** 国家自然科学基金项目（31400693）；江苏省自然科学基金项目（BK20140141）；中央高校基本科研业务费项目（JUSRP51508）。
* **通信作者：** 藤田盛久（1979—），男，日本人，博士，教授，博士研究生导师，主要从事细胞糖生物学方面的研究。E-mail：fujita@jiangnan.edu.cn
**引用本文：** 何曾安，柳艺石，张慧杰，等. HEK 293 细胞中重组型抗体表达和分泌的监测系统的构建[J]. 食品与生物技术学报，2019，38（07）：01-08.

fluorescence derived from E-F-HyHEL10 in the cells was positively correlated with the level of secreted antibody. These results suggested that the modified HEK293 cells could be used flexibly to monitor the secretion of recombinant immunoglobulin in cells,and possibly can be applied for identification of factors required for antibody secretion in mammalian cells in the future.
**Keywords**: antibody,flow cytometory,protein secretion,EGFP

生物药物(biopharmaceuticals)是一类在生物体或生物组织中综合利用生物化学、生物技术、微生物学、化学和药学等多学科原理和方法制造出的,用于预防、治疗或诊断的药物。与传统的小分子药物相比,以单克隆抗体为代表的生物药物具有较高的亲和性和特异性,可高效识别靶点分子,且副作用极低。重组治疗性蛋白质正日益成为重要的医疗药剂,用以治疗癌症及自身免疫性疾病等顽固性病症[1]。截止2010年,包括生物抗体药物在内的重组蛋白质已获得了1 000亿美元的市场销售额[2]。

免疫球蛋白G(IgG)是重要的重组治疗性生物药物,目前已被广泛地应用于多种疾病的治疗和诊断,如传染病、免疫缺陷病及自身免疫性疾病等[3-4]。IgG由2条γ重链和2条轻链通过二硫键共价连接形成四聚体蛋白质,每个轻链和重链的N端均含有针对同一抗原的抗原结合域。在IgG的Fc结构域上有一个高度保守的N-糖基化位点[5]。目前生物抗体药物主要由经过基因工程改造可大规模培养的宿主细胞表达生产,这些工程细胞株主要有中国仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary,CHO)、幼年叙利亚地鼠肾细胞(Baby Hamster Syrian Kidney、BHK),小鼠骨髓瘤细胞株Sp2/0和NSO等[6]。

如何在尽可能降低生产成本、提高产量的同时仍保持工艺的稳定性和产品的一致性,依旧是抗体工业生产研发的方向。目前虽已有研究通过改善培养技术和优化基因扩增系统显著提高了CHO细胞中抗体的产量[7-8],但工业生产中所用的CHO细胞株的抗体表达水平仍远低于人体自身浆细胞。因此,在优化产品、提升产量方面,哺乳动物细胞株仍有较大改造潜力,其中针对分泌途径进行基因工程改造以提高抗体分泌量的需求尤为迫切。

为了克服哺乳动物细胞株生产中产量较低的现状,充分理解目的蛋白质的折叠、转运及分泌途径中所须的相关因子就显得尤为重要。本研究中,作者采用HEK 293细胞即人体胚胎肾细胞构建了一个可检测抗体转运分泌的监测系统。HEK 293细胞是由人肾胚细胞改造而成的永生化细胞株[9],由于其具有较高的生长速率和较好的蛋白质分泌活性,已被广泛地应用于蛋白质工业生产[10]。本研究中采用人源抗鸡蛋清溶菌酶抗体(anti-Hen egg white lysozyme antibody,HyHEL10)作为模式抗体。HyHEL10是一种晶体结构已知的单克隆抗体,以鸡蛋清溶菌酶(hen egg white lysozyme,HEL)为抗原,且与抗原的识别机制也已十分清楚[11-12]。为了便于监测抗体在细胞内部的累积以及向胞外分泌的情况,本研究中构建的重组型抗体在重链N端融合有增强型绿色荧光蛋白单体(monomeric enhanced green fluorescent protein,mEGFP)和FLAG标签,分别用蛋白质合成抑制剂和蛋白质运输抑制剂处理细胞后,细胞中代表抗体水平的EGFP绿色荧光信号强度发生改变。本研究所构建的抗体表达系统可用于抗体分泌及折叠相关因子的筛选。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

人体胚胎肾细胞HEK 293和HEK 293T细胞株:均使用含有10%胎牛血清(FCS)的DMEM培养基(Gibco,Life technologies,USA)培养,培养条件为37 ℃、5% $CO_2$。

### 1.2 重组型抗体表达载体的构建

以pME18s-HyHEL10-human-sIgG为模板,用上游引物CCCAAGCTTGAGGTGCAGCTTCAGGAGTCA和下游引物AAAAGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGG(下划线处分别为*Hind* III和*Not* I酶切位点)PCR扩增抗体重链(HyHEL10-sIgG1)。以限制性内切酶处理并纯化PCR扩增片段,用连接酶(Ligation Mix,Takara,JP)连接入载体pME-Neo2dH-mEGFP-FCD59_CD59ss[13]的*Hind* III和*Not* I位点,构建出pME-NeodH-ssEGFP-F-HyHEL10中间质粒。

在 pME-NeodH-ssEGFP-F-HyHEL10 质粒上用 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶切出抗体的重链可变区($V_H$),同时用 *Not* I 和 *Xho* I 限制性内切酶切出抗体的重链恒定区($C_H$)。之后用连接酶(Ligation Mix,Takara,JP)将两个片段同时连接入 pLIB2-pgkHyg 逆转录病毒表达载体的 *Not* I 和 *EcoR* I 酶切位点,从而构建出 pLIB2-pgkHyg-ssEGFP-F-HyHEL10-sIgG1 抗体重链表达载体。此载体可表达含有由人源 hCD59 信号肽引导的绿色荧光蛋白(EGFP),以及 FLAG 标签。

以 pME18s-HyHEL10-human-kappa 为模板,用上游引物 AAAAGAATTCATGGATCCCAAAGGATCCC 和下游引物 AAAAGCGGCCGCTAACACTCTCCCC(下划线分别为 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点)扩增抗体的轻链(HyHEL10-human-kappa),并将纯化后的 PCR 扩增片段连接入 pLIB2-pgkBSD 逆转录病毒表达载体的 *Not* I 和 *EcoR* I 酶切位点,由此构建出 pLIB2-pgkBSD-HyHEL10-human-kappa 抗体轻链表达载体。

### 1.3 HEK 293 细胞株稳定转染

在 6 孔板上接种 HEK 293T 细胞,按照 Lipofectamine2000 (Invitrogen,USA) 的说明书,将 pGP、pVSV-G 与重组质粒 pLIB2-pgkHyg-ssEGFP-F-HyHEL10-sIgG1 或 pLIB2-pgkBSD-HyHEL10-human-kappa 按照 1:1:2(m:m:m)转染到 HEK 293T 细胞,用以表达分别含有重组抗体重链(ssEGFP-F-HyHEL10-sIgG1)或抗体轻链 (HyHEL10-human-kappa)的逆转录病毒。病毒表达 24 h 后,将含有表达轻链病毒的培养基上清液与重链病毒培养基上清液以 1:1(V:V)混合,转染入 6 孔板中的 HEK 293 细胞。转染时预先加入 1 000× 溴化己二甲铵(SIGMA,USA)以增加病毒转染效率。病毒转染 24 h 后用杀稻瘟菌素(blasticidin,InvivoGen,USA)和潮霉素(hygromycin,InvivoGen,USA)共同筛选 1 w。用流式细胞分选仪 S3e(Bio-Rad,USA)分选富集具有中等抗体表达量的阳性细胞,并用有限稀释法(limiting dilution cloning,LDC)分离单克隆细胞株,由此获得 HEK 293 E-F-HyHEL10 稳定表达细胞株。

### 1.4 流式细胞分析

用胰酶(Sangon,CN)消化处理并收集细胞,用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline,PBS,Sangon,CN) 洗涤并重悬 (细胞终浓度为 $5\times10^5$ 个/mL)。采用 BD Accuri C6(BD,USA)流式细胞分析仪分析代表重组抗体水平的 EGFP 绿色荧光蛋白信号。

### 1.5 蛋白质印记法

将细胞接种于 6 孔板,以无血清培养基培养 48 h 后收集培养基上清液,同时收集并裂解细胞提取胞内蛋白质。分别用还原态和非还原态的 4× 上样缓冲液稀释并煮沸样品。用 10% SDS-PAGE 进行蛋白质凝胶电泳。转膜和封闭结束后,依次使用 5% 脱脂牛奶稀释 8 000 倍的一抗 (AffiniPure Rabbit Anti-Human IgG(H+L),Jackson,USA)和二抗(Goat Anti-Rabbit IgG(H+L),HRP-Conjugated,Transgen,CN) 孵育 PVDF 膜。最后用 ECL 显色试剂 (Bio-Rad,USA) 显色并观察结果,从而检测 E-F-HyHEL10 抗体表达情况。

鸡蛋清溶菌酶 (hen egg white lysozyme,HEL,SIGMA,USA)用 5× 上样缓冲液稀释,95 ℃煮沸 5 min,在 15 g/dL SDS-PAGE 中进行蛋白质凝胶电泳。将 HEK 293 E-F-HyHEL10 细胞接种于 6 cm 板,用无血清培养基培养 48 h,收集培养基上清液 5 mL,作为一抗加入转有 HEL 作为抗原的 PVDF 膜室温孵育。并使用 5% 脱脂牛奶稀释 8 000 倍的二抗 (Peroxidase AffniPure Goat Anti-Human IgG(H+L),Jackson,USA) 室温孵育。最后以 ECL 显色试剂 (Bio-Rad,USA) 显色并观察结果,用以检测 E-F-HyHEL10 抗体功能。

### 1.6 重组型抗体的纯化

在 10 块 15 cm 培养皿中培养 HEK 293 E-F-HyHEL10 细胞,用含 10% 血清的培养基培养 48 h 后收集培养液,再用含 1% 血清的培养基培养 72 h 并收集培养液。用 anti-DDDDK-tag Gel(MBL,JP)沉淀培养基中的 E-F-HyHEL10 重组抗体,之后用洗脱蛋白质 (DDDDK-tagged Protein,MBL,JP)洗脱。收集洗脱液并加入透析盒 (Slide-A-Lyzer™ G2 Dialysis Cassettes,20K MWCO、3 mL,Thermo Scientific,USA)以去除多余的洗脱蛋白质。用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 (Beyotime Biotechnology,CN)测定纯化获得的 E-F-HyHEL10 抗体标准样品质量浓度。

### 1.7 银染

将纯化的 E-F-HyHEL10 标准样品用 10 g/dL

SDS-PAGE 进行蛋白质凝胶电泳,使用快速银染试剂盒(Beyotime Biotechnology,CN)显色,并分析显色结果。

### 1.8 酶联免疫吸附测定(ELISA)

用鸡蛋清溶菌酶 (HEL,SIGMA,USA) 作为抗原,在 96 孔免疫板(Thermo Scientific Nunc,USA)中铺板。封闭液(PBS,10% FCS)室温封闭后,加入一抗孵育。一抗实验组采用 HEK 293 E-F-HyHEL10 细胞的无血清培养基上清液。一抗对照组用纯化的 E-F-HyHEL10 标准品并稀释至 12 个质量浓度梯度 :0、3.91、7.81、15.63、31.25、62.5、125、250、500、1 000、2 000、4 000 ng/mL。之后加入封闭液稀释 2 000 倍的二抗 (Peroxidase AffniPure Goat Anti-Human IgG (H+L),Jackson,USA) 孵育。最后以 1×TMB 溶液 (eBioscience,USA) 显色, 并用终止液 (1 mol/L $H_2SO_4$)结束显色。用酶标仪(Bio-Rad,USA)在 450 nm 下检测样品吸光度。按照对照组标准品质量浓度与吸光度的关系制作标准曲线,以此曲线函数计算出其它实验组样品的抗体质量浓度。

### 1.9 蛋白质合成抑制剂与分泌抑制剂的处理

在 12 孔板中接种 HEK 293 E-F-HyHEL10 细胞,培养 24 h 后更换为含有蛋白质合成抑制剂或运输抑制剂的无血清培养基处理细胞。蛋白质分泌抑制剂选用 1.25 μg/mL 布雷菲德菌素 A(brefeldin A, BioLegend,USA)[14],蛋白质合成抑制剂选用 100 μg/mL 放线菌酮(cycloheximide,Cell Signaling Technology, USA)[15],分别处理不同时间。药物处理结束后收集细胞,用 BD Accuri C6(BD,USA)流式细胞分析仪分析胞内抗体累积量。以 BFA 处理为例,对抗体胞内累积水平进行量化分析,用如下公式计算:

$$累积倍数=\frac{BFA\ 处理组-亲本细胞组}{BFA\ 对照组-亲本细胞组}。$$

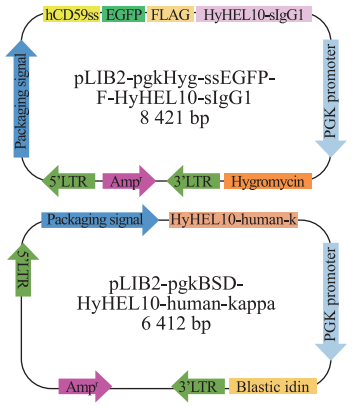
公式中采用相应样品的 EGFP 绿色荧光信号强度值进行计算,定义 HEK 293 细胞样品的信号值为“亲本细胞组”, 未经 BFA 处理的 HEK 293 E-F-HyHEL10 细胞样品信号值被定义为“BFA 对照组”。依照抗体累积倍数与处理时间关系作图, 同时取培养基上清液进行 ELISA,分析胞外抗体分泌量。

## 2 结果与分析

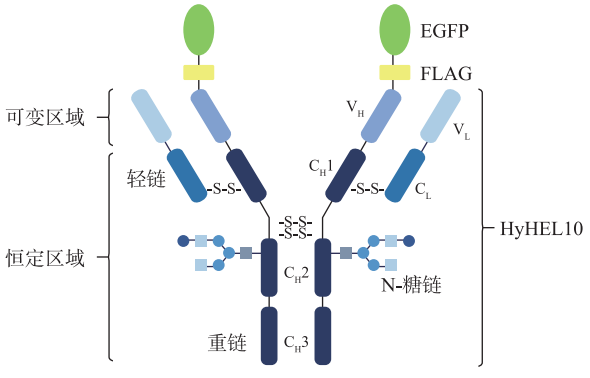
### 2.1 重组型抗体表达载体的验证

为了构建一个可用于监测抗体分泌和累积情况的稳定表达细胞株,作者首先设计构建了 2 个逆转录病毒重组表达载体(图 1(a)),共同表达重组型抗体 EGFP-FLAG-HyHEL10。选取的模式抗体 HyHEL10,即抗蛋清溶菌酶抗体(anti-Hen egg white lysozyme antibody),是一种表征良好的抗体,具有人源 IgG1 亚型。其中重组抗体重链的 N 端融合有一个人源 CD59 的内质网定位信号肽(hCD59ss),一个增强型绿色荧光蛋白单体 (mEGFP), 以及一个 FLAG 标签(图 1(b))。在分泌运输过程中,抗体的 C 端通常参与识别运载受体。因此,为保持 C 端恒定域的原有功能, 作者将内质网定位信号肽引导的 mEGFP 和 FLAG 标签均融合在抗体重链的 N 端。共同转染表达 HyHEL10 轻链和重链的载体时,细胞可表达成熟的分泌型抗体。

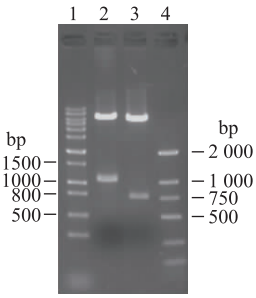
核酸凝胶电泳结果显示,双酶切验证重组抗体表达载体 pLIB2-pgkHyg-ssEGFP-F-HyHEL10-sIgG1 和 pLIB2-pgkBSD-HyHEL10-human-kappa 均得到两个片段, 其中重组抗体重链 (ssEGFP-F-HyHEL10-sIgG1) 大小为 2 094 bp, 抗体轻链 (HyHEL10-human-kappa)为 723 bp(图 1(c)),且测序结果与模板序列完全匹配。




(a)重组型抗体重链(上)和轻链(下)的逆转录病毒表达载体图谱




(b)重组型抗体E-F-HyHEL10的蛋白结构




1. 1 kb plus Marker;2. pLIB2-pgkHyg-ssEGFP-F-HyHEL10-sIgG1双酶切验证;3. pLIB2-pgkBSD-HyHEL10-human-kappa双酶切验证;4. 2 000 bp Marker

(c)重组质粒的酶切验证

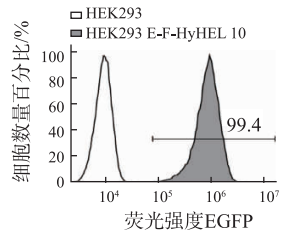
**图 1　重组型抗体表达载体的构建**

**Fig. 1　Construction of vectors for recombinant immunoglobulin expression**

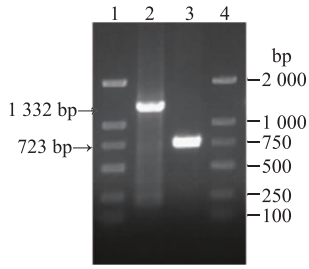
## 2.2　HEK 293 E-F-HyHEL10 稳定表达细胞株的构建

用 HEK 293T 细胞分别表达的含有抗体重链和轻链的逆转录病毒转染 HEK 293 细胞,从而构建稳定表达 EGFP-FLAG-HyHEL10 的 HEK 293 细胞株。用流式细胞术分析每株单克隆细胞株的抗体表达量,依据 EGFP 荧光信号的强度,最终选取具有中等抗体表达水平的 4 号细胞株进行后续实验(图 2(a))。核酸凝胶电泳结果显示,PCR 扩增 4 号细胞株基因组可得到正确大小的抗体重链和轻链 DNA 片段(图 2(b)),证明抗体重链和轻链的表达基因已正确整合入受体细胞基因组。

作者进一步采用蛋白质印记法验证 HEK 293 E-F-HyHEL10 No.4 细胞株的胞内裂解样品及培养基上清液样品中抗体的表达情况。由于还原条件下抗体重链、轻链间的二硫键被打断,Western 印记分析结果可以检测到还原态下约 75 000 的重组抗体重链(ssEGFP-F-HyHEL10-sIgG1),以及约 27 000 的抗体轻链(HyHEL10-human-kappa)。同时也可检测到非还原态下 200 000 左右的重组抗体全长(图 2(c))。蛋白质印迹法在胞内裂解样品及培养基上清液样品中均可检测到正确大小的重组抗体,说明 HEK 293 E-F-HyHEL10 No.4 细胞株可以正确表达并分泌重组抗体。此外,作者推测细胞裂解样品中被检测出的其他条带应该是未完全折叠且滞留在内质网(ER)中的抗体重链,只有正确折叠聚合的抗体才可被分泌至培养基中。

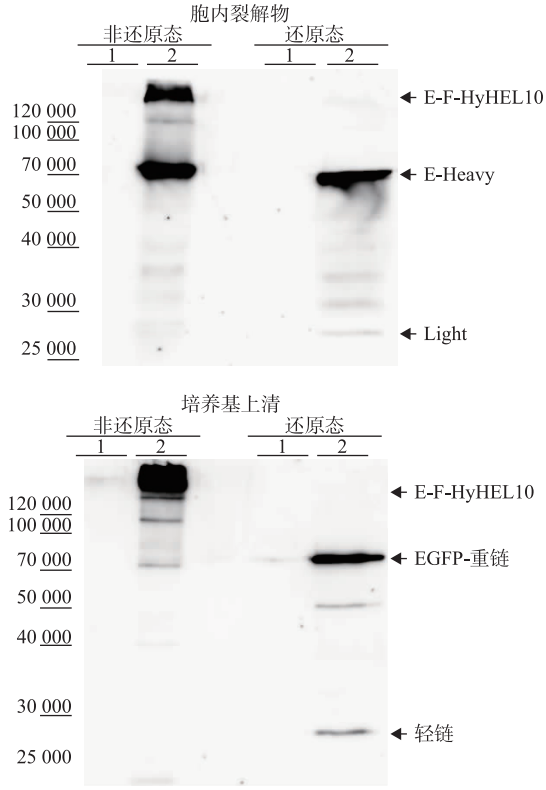



(a)流式分析HEK 293 E-F-HyHEL10 No.4的抗体表达水平




1、4:2 000 bp Marker;2:基因组PCR扩增抗体重链;3:基因组PCR扩增抗体轻链。

(b)HEK 293 E-F-HyHEL10 No.4基因组PCR扩增重组抗体重链和轻链




(c)免疫印迹法验证HEK 293 E-F-HyHEL10 No.4的细胞内、外抗体表达水平

**图 2　构建 HEK 293 E-F-HyHEL10 稳定表达细胞株**

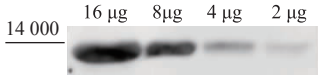
**Fig. 2　Establishment of HEK 293 cells expressing an EGFP-fused antibody**

## 2.3　EGFP 融合型抗体功能的检测

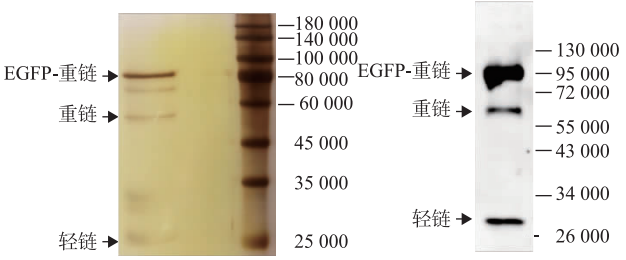
由于表达的重组型抗体重链的 N 端融合有 EGFP 绿色荧光蛋白和 FLAG 标签,且成熟的抗体

N 端是识别相应抗原的抗原结合域，故对表达的重组型抗体是否能够依旧维持其生物功能进行了确认。实验中使用鸡蛋清溶菌酶（HEL）作为 E-F-HyHEL10 重组抗体的抗原。蛋白质印记结果显示出 14 000 的 HEL(图 3(a))，说明重组型抗体可以识别相应的抗原，抗体 N 端融合的两个标签并不影响抗体功能的发挥。

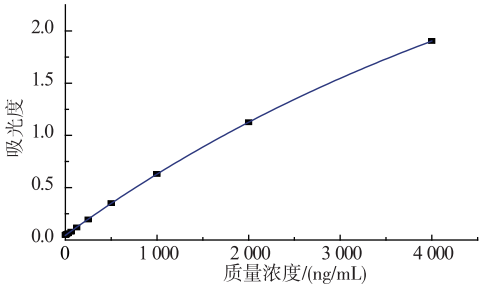
为了进一步验证重组型抗体的功能性，作者从低血清培养基上清液中纯化出 E-F-HyHEL10 标准样品(图 3(b))。用纯化后稀释至不同浓度的 E-F-HyHEL10 孵育经 HEL 铺板的免疫 96 孔板，并进行酶联免疫吸附测定，依据样品显色后的吸光度值与抗体加样量拟合绘制曲线。ELISA 结果显示，随着抗体加样浓度的提高样品吸光度值也相应提高，由此表明 E-F-HyHEL10 与 HEL 的结合量与抗体本身的加样量有关(图 3(c))。此结果进一步证明 EGFP 融合型抗体仍具有良好的功能活性。



(a)免疫印迹法验证E-F-HyHEL10重组型抗体的功能



(b)银染法(左)和免疫印迹法(右)分析E-F-HyHEL10重组型抗体纯化产物



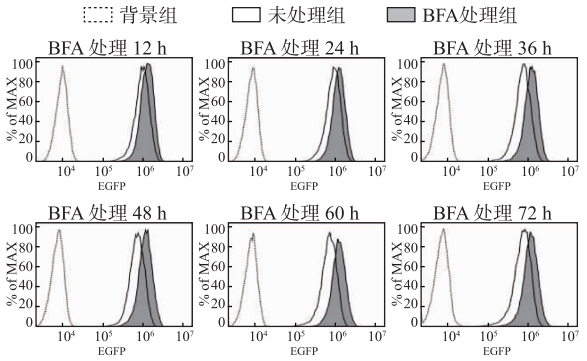
(c)酶联免疫吸附测定E-F-HyHEL10与抗原的结合

**图 3　重组型抗体的功能验证**

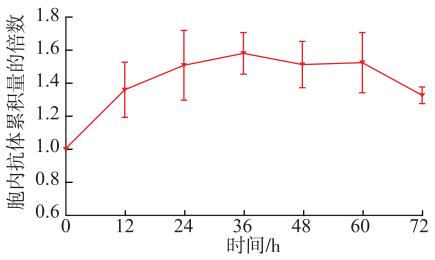
**Fig. 3　EGFP-fused antibody is functional**

## 2.4　蛋白质分泌运输抑制剂对重组抗体表达和分泌的影响

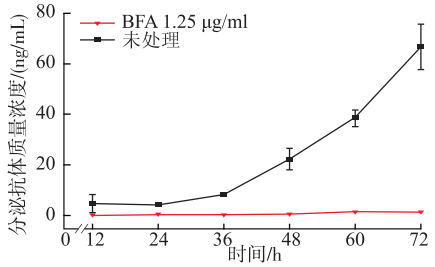
布雷菲德菌素 A(BFA)可通过抑制外壳蛋白复合体 I(coat protein complex I,COPI)的形成间接抑制蛋白质从内质网(endoplasmic reticulum,ER)到高尔基体的分泌运输[16]。为了监测抗体的分泌情况，作者使用布雷菲德菌素 A 作为蛋白质分泌运输抑制剂，依照 1.9 中的试验方法处理 HEK 293 E-F-HyHEL10 细胞。流式细胞分析结果表明，BFA 处理后胞内抗体累积量有明显提升(图 4(a))。进一步对抗体胞内累积水平进行量化分析，如图 4(b)所示，BFA 处理 36 h 后抗体的胞内累积量达到最大值，是对照组的 1.6 倍。取培养基上清液进行酶联免疫吸附测定重组抗体的胞外分泌量，结果显示 BFA 作为有效的蛋白质分泌抑制剂对抗体分泌至胞外有显著的抑制作用，因为几乎无法在培养液上清样品中检测到分泌的重组抗体(图 4(c))。此结果与流式细胞分析结果相吻合。



(a)流式分析BFA处理后细胞内的抗体累积量



(b)定量分析BFA处理下抗体的胞内累积量



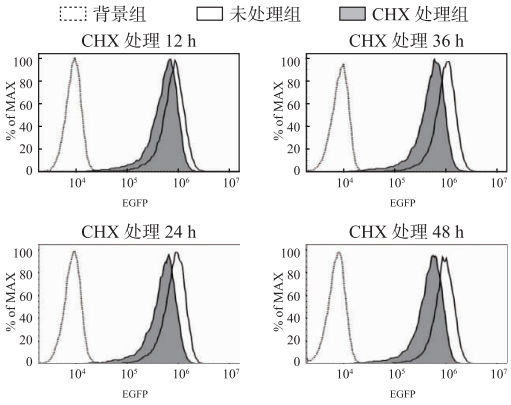
(c)酶联免疫吸附测定BFA处理下抗体的胞外分泌水平

**图 4　布雷菲德菌素 A(BFA)对抗体表达细胞株的处理**

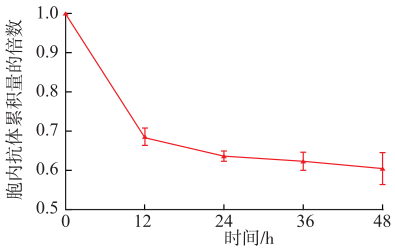
**Fig. 4　Treatment of brefeldin A (BFA) on HEK 293 E-F-HyHEL10 cells**

### 2.5 蛋白质合成抑制剂对重组抗体表达和分泌的影响

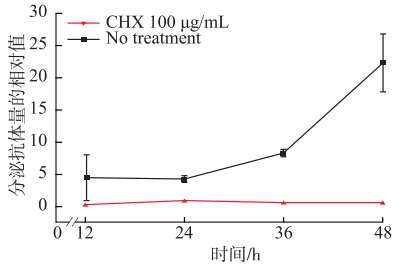
使用放线菌酮（CHX）处理 HEK 293 E-F-HyHEL10 细胞,流式细胞分析结果显示,CHX 处理后的细胞中抗体累积量明显降低(图 5(a))。使用 1.9 中的定量计算公式同样对 CHX 处理样品进行量化分析，在 CHX 处理 12 h 后抗体的胞内累积量急剧下降至对照组的 0.7 倍，并在后续处理的35 h 内逐渐维持在 0.5 倍的水平(图 5(b))。ELISA 结果显示，无法在 CHX 处理的培养液上清液样品中检测到分泌的重组抗体(图 5(c))。这两个结果共同证明,放线菌酮作为蛋白合成抑制剂抑制了抗体的合成,使得抗体无法在胞内合成并累积,更无重组抗体分泌到胞外。




(a)流式分析CHX处理后细胞内的抗体累积量




(b)定量分析CHX处理下抗体的胞内累积量




(c)酶联免疫吸附测定CHX处理下抗体的胞外分泌水平

**图 5　放线菌酮(CHX)对抗体表达细胞株的处理**

**Fig. 5　Treatment of cycloheximide（CHX）on HEK 293 E-F-HyHEL10 cells**

## 3 结　语

截至目前,与细胞株基因工程改造的相关研究主要关注在以下方面:通过改造启动子或引入基因扩增系统以提高基因转录水平；通过优化表达原件以改善蛋白质翻译水平从而提高产量等[17-18]。尽管针对蛋白质折叠和运输的基因工程改造是优化的主要内容，但相应的机理研究工作仍是各项工业优化的基础。哺乳动物细胞中,抗体首先在内质网中合成,经过正确的蛋白质糖基化和折叠后被运送到高尔基体。抗体上的糖链会在高尔基体中被进一步修饰改造，并被分拣入反式高尔基网而最终分泌至培养基中。针对这一抗体分泌运输途径开展研究的最大阻碍是缺乏可以灵活检测抗体分泌运输的表达细胞株。

作者构建了可稳定表达 E-F-HyHEL10 重组型抗体的 HEK 293 细胞表达系统,这一表达系统可被成功地用于灵活检测抗体表达及分泌水平。该系统具有良好的抗体表达量及分泌量,同时稳定维持了抗体的功能活性。研究结果表明，布雷菲德菌素 A 和放线菌酮处理细胞,对抗体的胞内累积和胞外分泌途径均有积极影响,说明本抗体表达系统可灵敏地响应蛋白质分泌抑制剂和蛋白质合成抑制剂的扰动,进而证明本研究中构建的抗体表达系统具有灵活表征胞内胞外抗体分泌及表达情况的特性,可实现抗体表达、累积和分泌水平的准确监测。

本研究构建的可监测抗体分泌的稳定表达细胞株，未来可用于筛选鉴定与抗体分泌相关的因子。比如通过用化学药物对细胞的处理鉴定出可作用于抗体分泌的化学药物。新一代基因编辑技术 CRISPR/Cas9，是现今十分高效的基因编辑工具[19],已有研究运用 CRISPR/Cas9 基因敲除文库进行基因组筛选[20]。本研究构建的重组抗体监控系统中亦可引入 CRISPR/Cas9 基因敲除文库,用于筛选与抗体折叠、分泌相关的基因。此外,可将研究中构建的逆转录病毒重组表达载体系统引入 HAP1 人源单倍体细胞株[21],构建重组抗体单倍体细胞表达系统,并利用 HAP1 细胞的单倍体基因组优势进行正向遗传学筛选。作者已先期构建了用于筛选抗体分泌相关因子的 HAP1 E-F-HyHEL10 稳定表达细胞株（未发表）。用这一可监控细胞株筛选获得关键性因子后,未来可将这些因子应用于改造重组型抗体表达细胞株以提高生物药品的产量。

## 参考文献:

[1] WALSH G. Biopharmaceutical benchmarks 2014[J]. **Nature biotechnology**, 2014, 32(10): 992-1000.

[2] ELVIN J G, COUSTON R G, VAN D E R WALLE C F. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2013, 440(1): 83-98.

[3] LAKOS G, SO S L, FEKETE A, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody isotypes in rheumatoid arthritis: association with disease duration, rheumatoid factor production and the presence of shared epitope[J]. **Clinical and Experimental Rheumatology**, 2008, 26(2): 253.

[4] PAS S D, STREEFKERK R H, PRONK M, et al. Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients[J]. **Journal of Clinical Virology**, 2013, 58(4): 629-634.

[5] MAVERAKIS E, KIM K, SHIMODA M, et al. Glycans in the immune system and the altered glycan theory of autoimmunity: a critical review[J]. **Journal of Autoimmunity**, 2015, 57: 1-13.

[6] CHU L, ROBINSON D K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2001, 12(2): 180-187.

[7] JAYAPAL K P, WLASCHIN K F, HU W, et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting[J]. **Chemical Engineering Progress**, 2007, 103(10): 40.

[8] WENG Zhibing, SHAO Chunhua, HU Hui. Study on high level expression of cetuximab in vitro culture by different ventilationand stirring conditions in CHO cells[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 1): 74-78.(in Chinese)

[9] GRAHAM F, SMILEY J, RUSSELL W, et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5[J]. **Journal of General Virology**, 1977, 36(1): 59-72.

[10] BALDI L, HACKER D L, ADAM M, et al. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives[J]. **Biotechnology Letters**, 2007, 29(5): 677-684.

[11] PADLAN E A, SILVERTON E W, SHERIFF S, et al. Structure of an antibody-antigen complex: crystal structure of the HyHEL-10 Fab-lysozyme complex[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1989, 86(15): 5938-5942.

[12] KONDO H, SHIROISHI M, MATSUSHIMA M, et al. Crystal structure of anti-hen egg white lysozyme antibody (HyHEL-10) Fv-antigen complex local structural changes in the protein antigen and water-mediated interactions of Fv-antigen and light chain-heavy chain interfaces[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1999, 274(39): 27623-27631.

[13] FUJITA M, MAEDA Y, RA M, et al. GPI glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi[J]. **Cell**, 2009, 139(2): 352-365.

[14] GOODRIDGE H S, SHIMADA T, WOLF A J, et al. Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells[J]. **The Journal of Immunology**, 2009, 182(2): 1146-1154.

[15] SCHNEIDER-POETSCH T, JU J, EYLER D E, et al. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin[J]. **Nature Chemical Biology**, 2010, 6(3): 209-217.

[16] HELMS J B, ROTHMAN J E. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF[J]. **Nature**, 1992, 360(11): 352-354.

[17] GOPALKRISHNAN R, CHRISTIANSEN K, GOLDSTEIN N, et al. Use of the human EF-1α promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells[J]. **Nucleic Acids Research**, 1999, 27(24): 4775-4782.

[18] MAKRIDES S C. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells[J]. **Protein Expression and Purification**, 1999, 17(2): 183-202.

[19] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. **Science**, 2013, 339(6121): 819-823.

[20] WANG T, WEI J J, SABATINI D M, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system[J]. **Science**, 2014, 343 (6166): 80-84.

[21] CARETTE J E, RAABEN M, WONG A C, et al. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1 [J]. **Nature**, 2011, 477(7364): 340-343.