

### 【国家自然科学基金专题述评】

组上约有 50 400 个 MAR 片段<sup>[10]</sup>,目前只有个别 MAR 片段用于构建表达载体,提高转基因表达水平<sup>[11]</sup>。

研究表明,MAR 能提高 CHO 表达系统转基因的表达水平及降低转化株转基因表达水平差异<sup>[12-14]</sup>。目前,已有 4 个 MAR 片段被证实能够提高 CHO 细胞中转基因表达及阳性克隆细胞数<sup>[15-16]</sup>。MAR 提高转基因表达具备位置效应、叠加效应和距离效应<sup>[12,14-15]</sup>。

**2.2 泛在染色质开放元件(ubiquitous chromatin opening element,UCOE)** UCOE 是一种阻止异染色质扩散的隔离元件,不含甲基化 CpG 岛,可消除整合位置依赖效应和维持染色质的开放形态,以此增加 DNA 转录的可行性<sup>[17-18]</sup>。将 UCOE 整合进表达载体能显著提高抗体在 CHO 细胞的表达量<sup>[17]</sup>,UCOE 还可增加高产克隆细胞株的比例<sup>[19]</sup>。有研究还发现另一种非编码富集 GC 的 DNA 片段,其为一种新型的 UCOE,在目的基因的侧向插入富集 GC 片段可以提高重组蛋白的表达<sup>[20]</sup>。

**2.3 特定位点重组** 传统的稳定转染方法是外源基因随机整合到染色质上,而随机整合所导致的位置效应决定了大部分克隆的表达水平较低;而且在这些载体上,目的基因的表达与筛选基因的表达通常是分离的,也导致出现大量的假阳性克隆。特定位点重组能使表达基因实现目的基因在基因组中转录活跃区(或称热点)的整合,从而发展高产稳定的克隆。与传统的同源重组相比,重组酶的使用能大大提高哺乳动物细胞系中的重组效率。这种方法需要首先建立 1 个标记的宿主细胞系,构建 1 个含有报告基因表达盒的载体,表达盒侧翼含有能被特定的重组酶识别的 1 个短顺式作用 DNA 靶序列,DNA 靶序列通过稳定转染,随机整合到基因座的不同位点。随后,在稳定转染的细胞克隆中筛选报告基因高表达和单拷贝整合的细胞克隆。由此有效筛选出报告基因整合进基因组位点,从而促进报告基因的高转录细胞克隆。报告基因整合进基因组热点的概率较低,仅有 0.1%<sup>[21]</sup>。标记的表达量较高的报告基因的宿主细胞系被筛选出以后,用 1 个包括目的基因和相同(或相似)DNA 靶序列载体以及另外 1 个包含重组酶的表达载体,将其共转染到标记的宿主细胞中,导致整合的报告基因和目的基因之间的链式重组,从而提高在标记的宿主细胞中将目的基因整合入基因热点中的概率。

Cre 和 Flp 是来自 P1 噬菌体和酿酒酵母中的 2 个特异位点酪氨酸重组酶,通常被用来鉴别和重组它们各自的短顺式作用 DNA 靶序列:34 bp loxP 位

点和 48 bp Flp 重组目标(FRT)。Cre / loxP 体系首次用于 CHO 细胞中人类单克隆抗体的生产。KAMEYAMA 等<sup>[22]</sup>通过使用多重 Cre-介导整合过程与突变 loxPs 序列,反复插入多个基因到同一个靶位点,人工造成基因扩增。Flp-InTM 细胞株(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)是用 Flp 介导的基因组中 25 个抗体表达盒整合到特定 FRT 标记位点,来表达人类多克隆抗 RhD 抗体<sup>[23]</sup>。然而,位点专一性重组的可逆性是 Cre 和 Flp 重组酶普遍存在的缺点,由于表达盒的交换,造成产生新的识别位点。

另一个位点专一性重组技术是使用整合酶,例如  $\lambda$  整合酶和  $\phi$ C31 整合酶,其能够靶向 attP 和 attB 2 个不同的序列(分别附着在噬菌体和细菌位点上)。一旦识别附着位点是事先整合到标记宿主细胞的基因组中的位点,这种整合酶催化重组事件会改变盒式交换中的 attP 和 attB 位点<sup>[24-26]</sup>。由于整合酶不能识别改变的位点,因此,重组是不可逆的。

**2.4 内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site,IRES)** 目的基因和选择标记基因可以通过单独的载体共转染哺乳动物细胞,以此达到共表达的目的。这种方法转染效率低,而且筛选能够表达目的蛋白的概率非常低<sup>[27]</sup>。目的基因和选择标记基因在同一个载体上表达能够部分提高筛选目的蛋白的概率<sup>[28]</sup>。然而,在一个载体上使用多个启动子可能会导致干扰转录,在稳定转染中,一个活性转录单元会抑制另一个活性转录单元<sup>[29]</sup>。

以上这些问题可以通过 IRES 元件的应用来解决。已有许多已报道的 IRES 元件,大致分为细胞或病毒 IRES<sup>[30]</sup>。多个基因的表达(如选择标记基因和目的基因)可以通过在 2 个基因之间插入 IRES 元件进行连接。这种情况允许 2 个基因依赖于同一个启动子、转录到同一个 mRNA 中。当上游基因的转录起始为 5'端时,在 mRNA 上的 IRES 会允许 5'端作为下游基因的转录起始。因此,2 种不同的蛋白质可以从同一个 mRNA 中翻译出来。

通过使用 IRES 连接多个基因进行表达,有以下 2 个优点<sup>[31-32]</sup>:首先,单一的启动子能够用于驱动多顺反子 mRNA 的转录,确保连接的基因保持更高的表达一致率。已经证明其有利于蛋白质异二聚体的成功表达(如抗体)。其次,通过 IRES 表达载体设计下游的选择标记基因时,选择标记基因的表达依赖于上游目的基因的成功转录。因此,这样可以减少或消除目的基因之外的选择标记基因的发生。

**2.5 选择标记的衰减** 当选择严谨性很高时,由于在基因组转录活性位点表达载体的基因扩增和整

合,筛选出的细胞克隆将会有高的转录水平<sup>[33]</sup>。而严谨性选择能够通过增加药物浓度来实现,然而这种方法由于药物浓度较高,细胞生长缓慢。另一种方法就是进行选择标记的衰减。

有2种方法可以削弱选择标记基因。第1种策略是通过选择标记基因的突变降低其活性。目前已证明,通过选择标记基因——新霉素磷酸转移酶Ⅱ的突变,能够提高单克隆抗体产量,使其高达1.4、14.6和16.8倍<sup>[31,34]</sup>。第2种削弱选择标记基因的策略是通过调控选择标记的基因表达水平来实现。有多种方法可用来实现这个目标。选择标记基因的密码子去优化,是通过宿主细胞不常用的偏爱密码子降低选择标记及基因的翻译效率,从而导致蛋白表达的减少<sup>[35]</sup>。

3 展望

除了具备高效的表达载体之外,培养基及CHO细胞遗传缺陷株的构建也是高效CHO表达系统建立的关键因素。近年来,越来越多的生物制药公司开始采用无动物来源的成分替代血清培养CHO细胞。对CHO细胞进行遗传改造,构建更接近人源糖基化的CHO细胞,改进治疗性重组蛋白的治疗安全性和提高治疗性重组蛋白的治疗效果,是建立生产治疗性重组蛋白的CHO表达系统的关键和基础。

参考文献:

[1] DESCHENES I, FINKLE C D, WINOCOUR P D. Effective use of BCH-2763, a new potent injectable direct thrombin inhibitor, in combination with tissue plasminogen activator (tPA) in a rat arterial thrombolysis model[J]. *Thromb Haemest*, 1998, 80(1): 186-191.

[2] BLOT J, FASANO C, DOS S C. From orthoclone to denosumab, the fast growing market of monoclonal antibodies[J]. *Med Sci(Paris)*, 2009, 25(12): 1177-1182.

[3] LAI T, YANG Y, NG S K. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production[J]. *Pharmaceuticals( Basel)*, 2013, 6(5): 579-603.

[4] BANDARANAYAKE A D, ALMO S C. Recent advances in mammalian protein production[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(2): 253-260.

[5] BUTLER M, MENESES-ACOSTA A. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells[J]. *Appl Microbi Biotechnol*, 2012, 96(4): 885-894.

[6] 陶维红, 秦民民, 张哲如. CHO细胞株开发技术策略探讨[J]. *生物技术进展*, 2014, 4(6): 394-399.

[7] JAYAPAL K R, WLASCHIN K F, HU W S, et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells: 20 years and counting[J]. *Chem Eng Prog*, 2007, 103(10): 40-47.

[8] GHADERI D, ZHANG M, HURTADO-ZIOLA N, et al. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2012, 28: 147-175.

[9] CHUSAINOW J, YANG Y S, YEO J H, et al. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(4): 1182-1196.

[10] HARRAGHY N, BUCETA M, REGAMEY A, et al. Using matrix attachment regions to improve recombinant protein production[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 801: 93-110.

[11] WANG T Y, YANG R, QIN C, et al. Enhanced expression of transgene in CHO cells using matrix attachment region[J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(10): 1279-1283.

[12] WANG T Y, ZHANG J H, JING C Q, et al. Positional effects of the matrix attachment region on transgene expression in stably transfected CHO cells[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34(2): 141-145.

[13] GIROD P A, ZAHN-ZABAL M, MERMOD N. Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 91(1): 1-11.

[14] WANG F, WANG T Y, TANG Y Y, et al. Different matrix attachment regions flanking a transgene effectively enhance gene expression in stably transfected Chinese hamster ovary cells[J]. *Gene*, 2012, 500(1): 59-62.

[15] ZHANG J H, WANG X Y, WANG T Y, et al. Distance effect of matrix attachment region on transgene expression in stably transfected Chinese hamster ovary cells[J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(10): 1937-1943.

[16] KIM J D, YOON Y, HWANG H Y, et al. Efficient selection of stable Chinese hamster ovary (CHO) cell lines for expression of recombinant proteins by using human interferon  $\beta$  SAR element[J]. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(3): 933-937.

[17] BENTON T, CHEN T, MCENTEE M, et al. The use of UCOE vectors in combination with a preadapted serum free, suspension cell line allows for rapid production of large quantities of protein[J]. *Cytotechnology*, 2002, 38(1/2/3): 43-46.

[18] DE POORTER J J, LIPINSKI K S, NELISSEN R G, et al. Optimization of short-term transgene expression by sodium butyrate and ubiquitous chromatin opening elements (UCOE) [J]. *J Gene Med*, 2007, 9(8): 639-648.

[19] YE J, ALVIN K, LATIF H, et al. Rapid protein production using CHO stable transfection pools[J]. *Biotechnol Prog*, 2010, 26(5): 1431-1437.

[20] JIA Q, WU H, ZHOU X, et al. A "GC-rich" method for mammalian gene expression: a dominant role of non-coding DNA GC content in regulation of mammalian gene expression[J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(1): 94-100.

[21] LITTLE P. Genetics. Small and perfectly formed[J]. *Nature*, 1993, 366(6452): 204-205.

[22] KAMEYAMA Y, KAWABE Y, ITO A, et al. An accumulative site-specific gene integration system using Cre recombinase-mediated cassette exchange[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(6): 1106-1114.

可以清晰地看到它们的区别。通过比较<sup>1</sup>H-NMR 和<sup>13</sup>C-NMR 谱,可以看到化合物 9 和 10 有明显的化学位移的不同并在 C-1 位的区别最大,在化合物 9 中 C-1 为[ $\delta_{\text{C}}$  91.8,  $\delta_{\text{H}}$  4.53(d)],在化合物 10 中 C-1 为[ $\delta_{\text{C}}$  96.0,  $\delta_{\text{H}}$  5.52(t)],与文献报道独一味素 B 的数据基本一致<sup>[10]</sup>,确定化合物 10 为独一味素 B。

参考文献:

[1] 付宏征,刘世旺,林文翰. 糙苏的化学成分[J]. 药学报, 1999,34(4):297-300.

[2] 赵静,杨秀伟,付宏征,等. 糙苏的化学成分研究[J]. 中草药, 1999,30(2):90-93.

[3] 杨永利,郭守军,孙坤,等. 中药糙苏亲水性成分的研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版),2004,40(2):67.

[4] 田光辉,刘存芳. 秦巴山区野生糙苏化学成分的研究[J]. 安徽

农业科学,2008,36(12):5047-5049.

[5] 马养民,汪洋. 植物环烯醚萜类化合物生物活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):234-243.

[6] LIN S,CHEN T,LIU X H,*et al.* Iridoids and Lignans from *Valeriana Jatamansi* [J]. *J Nat Prod*,2010,73(4):632-638.

[7] ZHAO Y X,WANG P C,RAN X H,*et al.* Two new iridoids from the roots of *valeriana officinalis* [J]. *J Chin Chem Soc*,2011,58(5):659-662.

[8] GUO S J,GAO L M,CHENG D L. Iridoids from *Phlomis umbrosa* [J]. *Pharmazie*,2001,56(2):178-180.

[9] YOUNG M C M,BRAGA M R,GOTTLIEB H E,*et al.* Fungitoxic non-glycosidic iridoids from *alibertia macrophylla* [J]. *Phytochemistry*,1992,31(10):3433-3455.

[10] SANG Y L,HAO Y J,YANG S S. Chemical constituents of *lamio-phlomis rotata* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*,2008,39(11):1622-1624.

( 本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟 月)

( 上接第 163 页)

[23] WIBERG F C,RASMUSSEN S K,FRANSEN T P,*et al.* Production of target-specific recombinant human polyclonal antibodies in mammalian cells [J]. *Biotechnol Bioeng*,2006,94(2):396-405.

[24] SMITH M C,THORPE H M. Diversity in the serine recombinases [J]. *Mol Microbiol*,2002,44(2):299-307.

[25] RUSSELL J P,CHANG D W,TRETIAKOVA A,*et al.* Phage Bxb1 integrase mediates highly efficient site-specific recombination in mammalian cells [J]. *Biotechniques*,2006,40(4):460,462,464.

[26] CAMPBELL M,CORISDEO S,MCGEE C,*et al.* Utilization of site-specific recombination for generating therapeutic protein producing cell lines[J]. *Mol Biotechnol*,2010,45(3):199-202.

[27] WURM F M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*,2004,22(11):1393-1398.

[28] FUSSENEGGER M,BAILEY J E,HAUSER H,*et al.* Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells[J]. *Trends Biotechnol*,1999,17(1):35-42.

[29] BEBBINGTON C R,RENNER G,THOMSON S,*et al.* High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a

glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker [J]. *Biotechnology (NY)*,1992,10(2):169-175.

[30] BAIRD S D,TURCOTTE M,KORNELUK R G,*et al.* Searching for IRES[J]. *RNA*,2006,12(10):1755-1785.

[31] HO S C,BARDOR M,FENG H,*et al.* IRES-mediated tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines [J]. *J Biotechnol*,2012,157(1):130-139.

[32] TRILL J J,SHATZMAN A R,GANGULY S. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells[J]. *Curr Opin Biotechnol*,1995,6(5):553-560.

[33] GROSS G,HAUSER H. Heterologous expression as a tool for gene identification and analysis[J]. *J Biotechnol*,1995,41(2/3):91-110.

[34] SAUTTER K,ENENKEL B. Selection of high-producing CHO cells using NPT selection marker with reduced enzyme activity [J]. *Biotechnol Bioeng*,2005,89(5):530-538.

[35] WESTWOOD A D,ROWE D A,CLARKE H R. Improved recombinant protein yield using a codon deoptimized DHFR selectable marker in a CHEF1 expression plasmid [J]. *Biotechnol Prog*,2010,26(6):1558-1566.

( 本文编辑:王 燕)