

HSV-IgM 人-鼠嵌合抗体制备及稳定细胞株构建工艺开发

崔亚敏, 田晓平, 孙静静, 王志强, 赵巧辉*, 李桂林

郑州伊美诺生物技术有限公司, 河南 郑州 450016

崔亚敏, 田晓平, 孙静静, 王志强, 赵巧辉, 李桂林. HSV-IgM 人-鼠嵌合抗体制备及稳定细胞株构建工艺开发[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3887-3898.

CUI Yamin, TIAN Xiaoping, SUN Jingjing, WANG Zhiqiang, ZHAO Qiaohui, LI Guilin. Preparation of HSV-IgM human-mouse chimeric antibody and development of stable recombinant cell line[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3887-3898.

摘要: 为实现体外大规模制备单纯疱疹病毒 HSV-IgM (HSV1, HSV2)人鼠嵌合抗体, 本研究通过 RNA 连接酶介导的 cDNA 末端快速扩增(RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends, RLM-RACE)技术获取其对应杂交瘤细胞基因序列, 构建嵌合抗体至真核表达载体, 在 CHO-S 细胞中稳定表达所需目的蛋白。同时优化稳定细胞株筛选工艺, 对细胞池构建阶段和单克隆筛选阶段的加压条件进行摸索与探究, 最后目的抗体采用蛋白 L 亲和纯化法进行纯化并进行生物活性检测; 最终成功制备 899 kDa 和 909 kDa 的稳定高表达重组 IgM 抗体(HSV1, HSV2)细胞株。结果表明, 最适筛选压力为 20P200M (一轮加压)和 50P1000M (二轮加压); 使用加压培养基进行单克隆筛选抗体表达量较高, HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 单克隆最终表达量分别为 1 620 mg/L 和 623 mg/L。本研究为 HSV1 和 HSV2 的 IgM 系列重组抗体质控品开发以及体外高表达分泌 IgM 亚型抗体提供理论与实践基础。

关键词: 人鼠嵌合 IgM 抗体; CHO-S 细胞; 构建工艺; 表达

Preparation of HSV-IgM human-mouse chimeric antibody and development of stable recombinant cell line

CUI Yamin, TIAN Xiaoping, SUN Jingjing, WANG Zhiqiang, ZHAO Qiaohui*, LI Guilin

Zhengzhou Immuno Bio-Tech Co., Ltd., Zhengzhou 450016, Henan, China

Abstract: In order to achieve large-scale production of HSV-IgM (HSV1, HSV2) human-mouse chimeric antibody *in vitro*, the gene sequence of the corresponding hybridoma cell was

*Corresponding author. Tel: +86-371-67122637, E-mail: zhaoqiaohui@autobio.com.cn

Received: 2022-11-16; Accepted: 2023-02-09; Published online: 2023-02-20

harvested by RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends (RLM-RACE) technique to clone the chimeric antibody into eukaryotic expression vectors, and express the target proteins in CHO-S cells. At the same time, the screening process of stable cell lines was optimized, and the pressure conditions of pool construction stage and monoclonal screening stage were explored. Finally, the target protein was purified by protein L affinity purification method and the biological activity was detected. The recombinant IgM antibodies, HSV1 and HSV2, weighted at 899 kDa and 909 kDa respectively, were prepared. The optimal screening pressure was 20P200M (the first phase of pressure) and 50P1000M (the second phase of pressure). The final titer for the monoclonal expression of HSV1-IgM and HSV2-IgM was 1 620 mg/L and 623 mg/L, respectively. This study may facilitate the development of quality control products of HSV1 and HSV2 IgM series recombinant antibodies as well as efficient expression of IgM subtype antibodies *in vitro*.

Keywords: human-mouse chimeric IgM antibody; CHO-S cell; construction technology; expression

TORCH 是妊娠并发症相关的几种病原体, 包括弓形虫(*Toxoplasma*)、其他病毒如水痘带状疱疹病毒(*varicella-zoster virus*)、灵长类红细胞细小病毒(1-B19V)、风疹病毒(*rubella virus*)、巨细胞病毒(*cytomegalovirus*)和单纯疱疹病毒(*herpes simplex virus*, HSV)^[1-2]。其中单纯疱疹病毒分为 2 种血清型, 包括单纯疱疹病毒 1 型(HSV1)和单纯疱疹病毒 2 型(HSV2)。原发性受感染的孕妇大多无症状或只有轻微的症状。然而, 病原体经胎盘、围产期或产后传播可严重影响未出生或新生儿^[3]。HSV1 主要引起腰部以上部位(如眼、口、唇的皮肤粘膜以及中枢神经系统的)感染, HSV2 主要引起生殖器部位的皮肤粘膜及新生儿感染, 并与女性外阴癌和宫颈癌的发生相关。后遗症包括早产、异常、死产、胎儿生长受限、器官损伤和慢性出生后感染等。因此 HSV 检测在 TORCH 优生优育系列检测中十分必要^[4-5]。

HSV-IgM 抗体(HSV1, HSV2)作为阳性质控品在体外诊断中有着重要作用^[6]。市场上常以收

集的高值大样血浆或者把特异性的单抗和人 IgM 偶联得到人 IgM-特异性抗体的复合物形式存在, 然而事实中, 临床高值较难收集会导致阳性资源匮乏, 且偶联复合物也常出现稳定性问题^[7-8]。

随着生物制药行业在最近 20 年的迅速发展, 特别是基于哺乳动物细胞表达的产品市场份额不断扩大, 分子构建和稳定细胞株筛选作为一个产品研发的起始部分, 显得极为重要^[9-10]。一株稳定高产的工程细胞株能显著增加单位体积产量, 降低产品的生产成本。其中 CHO 细胞已进化为制造重组蛋白治疗药物的最典型的哺乳动物细胞系, 由于其稳健性和相对较高的生产能力(1-10 g/L)而被广泛应用于生物技术领域^[10]。许多生物制药生产的 CHO 细胞系来源于 CHO-DG44、CHO-DUKX-B11、CHO-S 和 CHO-K1 细胞系^[9-12]。CHO-S 细胞系是一种稳定的非整倍体细胞系, 其工作原理是基于二氢叶酸还原酶(*dihydrofolate reductase*, DHFR)筛选平台, 尽管该野生型细胞系具有基础水平的 DHFR

活性。使用基于增加嘌呤霉素和甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)水平的双相选择系统,以产生一个稳定的、能够产生高水平单抗的细胞池^[13]。然而目前研究中均是关于 IgG 类抗体进行的研究探索,关于重组 IgM 抗体筛选压力的选择尚未见报道。因此,利用 CHO-S 细胞为宿主,构建高表达人鼠嵌合 IgM 抗体,通过优化细胞株筛选工艺,确定最佳嵌合 IgM 抗体筛选压力,得到稳定高表达细胞株,是极为迫切且有重要意义的。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞株、菌种及载体质粒

所需杂交瘤细胞株均由本实验室研制并保存,CHO-S 细胞株为实验室长期保存细胞株,载体质粒 pCHO1.0-Fc 由实验室前期改造获得(湖南丰晖生物科技有限公司购买的 pCHO1.0 基础上改造);大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top 10 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.2 主要试剂

5'-Full RACE Kit 购自 TaKaRa 公司;限制性核酸内切酶(*EcoR* I、*Avr* II、*Bst*Z17 I、*Bsi*W I、*EcoR* V、*Pac* I、*Rru* I)、T4 DNA Ligase、转染试剂 FreeStyle™ MAX、CD FortiCHO 培养基、谷氨酰胺、puromycin、MTX 均购自 Thermo 公司;质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司;Protein L 亲和层析凝胶购自 GE 公司;PCR 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;AutoLumo A2000 PLUS 化学发光分析仪原厂配套试剂盒:HSV1/HSV2 IgM 检测试剂盒(磁微粒化学发光法)。

1.1.3 仪 器

PCR 仪(Thermo, Veriti Thermal Cycler),琼脂糖水平电泳仪(北京六一, DYCP-32B),台式离心机(Sigma, 3-30K),生物安全柜(ESCO, QT-129);细胞摇床(科耐 ISF1-XC),细胞计数仪(上海睿钰生物 IC1000);二氧化碳培养箱(Thermo, YQT-280),单克隆成像仪(Molecular Devices, YQT-484),AKTA purifier (AKTA purifier™ UPC10),酶标仪(安图, LUMO 型),全自动化学发光测定仪(安图, AutoLumo A2000 Plus)。

1.2 方 法

1.2.1 目的基因获取与表达载体构建

按照 Trizol 试剂说明书操作步骤,提取所需杂交瘤细胞总 RNA、反转录为 cDNA 后按照 5'-Full RACE 试剂盒标准操作步骤完成所需目的基因获取(参照试剂盒说明书),具体操作步骤可参照前期作者已报道的方法^[14]。

使用目的基因对应的 HF/HR 引物扩增从鼠杂交瘤细胞中获取的重链可变区基因(VH),用目的基因对应的 LF/LR 引物扩增轻链可变区基因(VL);随后重、轻链可变区分别通过 *Avr* II/*EcoR* I 和 *EcoR* V/*Bsi*W I 酶切位点构建至实验室 pCHO1.0-Fc 载体(已含有 IgM 亚型轻重链恒定区基因片段,其中轻链亚型为 Kappa 型)中。此构建过程中用到的引物见表 1,具体构建过程见图 1。

1.2.2 质粒提取与线性化处理

使用无内毒素质粒大抽试剂盒提取构建好的质粒,将质粒进行线性化酶切(*Rru* I 酶, 37 °C, 2 h),加 3 mol/L CH₃COONa (pH 5.2)混匀,无水乙醇离心后用 1 mL 75%的乙醇清洗沉淀,重复 6 次,室温干燥后用无菌水溶解。最后使用 NanoDrop One 微量紫外可见分光光度计(Thermo)测定质粒浓度和吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

| Primer name | Sequence (5'→3') |
|-------------|--|
| HSV1-HF | AACGGTTCGGGCCGCTAGGGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGCGCCGAGGTGCAGCTGAAGCAG |
| HSV1-HR | TAACATAGAGTATAATATAGATGAGGAGACGGTGACTGA |
| HSV1-LF | CTCGAGCTCAAGCTTGATATCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGCGCCGACATCCAGCTGACTCAG |
| HSV1-LR | TATCATGTCTGGATCGAAGCCTTCAGCTCCAGCTTGGT |
| HSV2-HF | AACGGTTCGGGCCGCTAGGGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGCGCCGAGGTGCAGCTGAAGGAG |
| HSV2-HR | TAACATAGAGTATAATATAGATGAGGAGACGGTGACCGTGATGTTGTGATGACCCAG |
| HSV2-LF | CTCGAGCTCAAGCTTGATATCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGCGCC |
| HSV2-LR | TATCATGTCTGGATCGAAGCTTTGATTTCCAGCTTGGT |

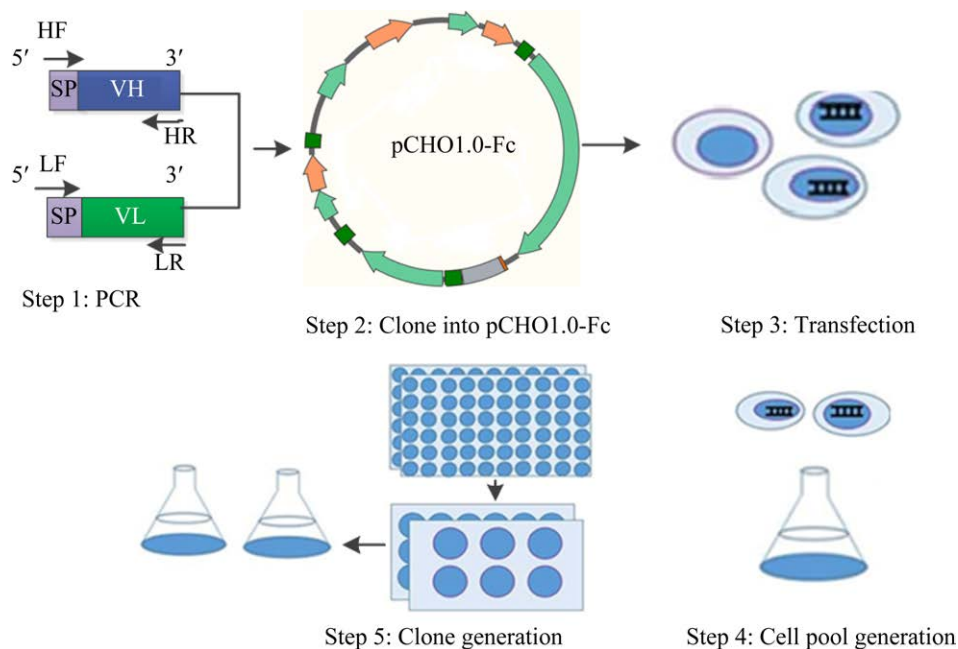


图 1 细胞株构建流程

Figure 1 Process for constructing cell lines.

1.2.3 细胞转染及稳定细胞池构建

转染前 1 d, 将 CHO-S 细胞以 5×10^5 cells/mL 的密度接种到 30 mL CD FortiCHO+8 mmol/L L-谷氨酰胺培养基中, 置于 37 °C、8% CO₂、100 r/min 摇床中培养; 转染当天, 按照 FreeStyle™ MAX 转染试剂盒说明书操作, 待细胞转染 48 h

后, 使用不同浓度的 puromycin (5、10、20 μg/mL) 和对应不同浓度的 MTX (50、100、200 nmol/L) 筛选系统对细胞进行加压筛选。静置培养 7 d 后传代至 125 mL 摇瓶。当细胞活率大于 90% 且密度大于 1×10^6 细胞/mL 时, 第一阶段筛选完成; 而后选择 30 μg/mL puromycin+500 nmol/L MTX

和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin +1 000 nmol/L MTX 筛选系统对细胞进行第二阶段加压筛选,每 3 天进行传代,待细胞活率达到 90%以上结束筛选。

1.2.4 抗体蛋白 Fed-batch (补料分批)评估

将稳定细胞株(活度 $\geq 90\%$),按 3×10^5 细胞/mL 密度接种 30 mL 至 125 mL 培养瓶中,第 3、5、7、9、11 天加补料(5% Feed A+0.5% Feed B),第 4、6、8、10 天测定葡萄糖浓度,补加葡萄糖使其浓度维持在 5 g/L。直至培养物存活率降至 50%以下收获。

1.2.5 稳定细胞株单克隆筛选

利用有限稀释法,配制克隆培养基:CD-FortiCHO 培养基+1% anti clumping+6 mmol/L L-谷氨酰胺,2 个 IgM 项目(HSV1, HSV2)同时选择不加压(仅克隆培养基)和加压(克隆培养基基础上添加 200 nmol/L MTX)两种方式、细胞均按照 0.5 个 cell/孔接种至 96 孔板(分别铺 30 块),静置培养 14 d,期间使用单克隆成像仪进行拍照观察单克隆集落生长情况并计算单克隆形成率;细胞上清进行酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)筛选,将表达量最高的前 150 个克隆转至 24 孔板,依次 24 孔板到 6 孔板放大,经 6 孔板等密度评估后将表达量最高的前 15 个单克隆转至 125 mL 摇瓶进行 Fed-batch 评估(参照 1.2.4)。

1.2.6 Protein L 柱纯化与聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测

将 IgM 重组抗体细胞上清(HSV1, HSV2)分别经 0.45 μm 滤膜过滤后,Protein L 填料柱子用水和平衡缓冲液(0.02 mol/L PBS, pH 7.4)平衡后上样,上样结束后再次平衡,用解离缓冲液(0.1 mol/L 柠檬酸钠, pH 2.3)洗脱蛋白,收集解离峰,分别换算蛋白表达量。

1.2.7 磁微粒化学发光法检测抗体反应性

HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 抗体采用磁微粒化学发光试剂盒检测,按照试剂盒说明书操作,先用试剂盒配套校准品设置定标程序检测,经线性

回归拟合曲线后,将待测抗体设置样品检测程序检测,检测其对应发光值与浓度值。

2 结果与分析

2.1 重组质粒酶切鉴定

分别使用 HSV1 和 HSV2 目的基因特异引物 HF/HR、LF/LR 扩增出包含信号肽以及对应抗体重、轻链可变区的基因片段(VH 与 VL),PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析,可见 400 bp 左右的特异性片段(图 2A),大小与预期一致,经序列分析(表 2),HSV1 和 HSV2 重链可变区基因长度均为 354 bp,轻链可变区基因长度分别为 320 bp 和 333 bp。

分别使用 *Avr II/BstZ17 I* 和 *EcoR V/Pac I* 对 HSV1-pCHO1.0-Fc 和 HSV2-pCHO1.0-Fc 质粒进行酶切鉴定,HSV-1/HSV-2 IgM 重链全长片段大小约为 1 800 bp,轻链全长片段大小约为 750 bp,如图 2B 所示,符合预期。且通过 *Rru I* 分别对 HSV1-pCHO1.0-Fc 和 HSV2-pCHO1.0-Fc 质粒酶切线性化后,跑胶验证大小符合预期(图 2C),即环状 DNA (未酶切的质粒)电泳速度比线性 DNA (酶切后质粒)快。

2.2 高表达细胞池筛选

分别对 HSV1-IgM 和 HSV-2-IgM 进行加压筛选。其中一轮加压中:使用 4 种压力(5P50M、10P100M、20P200M 和 40P400M;P 代表 puromycin 单位 $\mu\text{g}/\text{mL}$,M 代表 MTX 单位 nmol/L)。由细胞生长状态可见,增加筛选压力后细胞活率逐渐下降,第 7 天细胞活率最低,随后逐步开始恢复。在 5P50M 筛选压力下细胞恢复时间最短(13 d),40P400M 筛选压力下,HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 均出现细胞死亡现象。20P200M 对比 10P100M 筛选压力,细胞恢复时间更长。这表明筛选压力越小,细胞恢复越快,压力浓度越大,细胞越难恢复(图 3A)。且通过对一轮加压后的

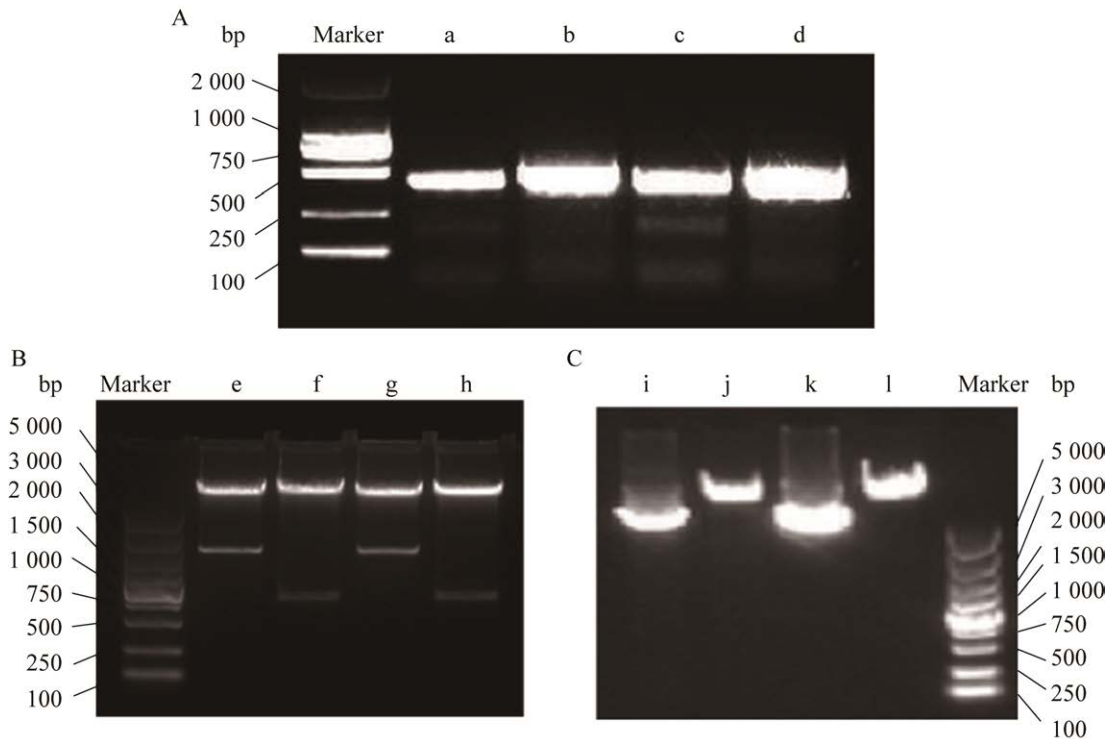


图 2 重组质粒的鉴定 A: PCR 扩增结果. a: HSV1-VH; b: HSV1-VL; c: HSV2-VH; d: HSV2-VL. B: 重组质粒鉴定. e: *Avr II/BstZ17 I* 酶切 HSV1-pCHO1.0-Fc 质粒; f: *EcoR V/Pac I* 酶切 HSV1-pCHO1.0-Fc 质粒; g: *Avr II/BstZ17 I* 酶切 HSV2-pCHO1.0-Fc 质粒; h: *EcoR V/Pac I* 酶切 HSV2-pCHO1.0-Fc 质粒. C: 转染用质粒的酶切线性化. i: 酶切前质粒 HSV1-pCHO1.0-Fc; j: 酶切后质粒 HSV1-pCHO1.0-Fc; k: 酶切前质粒 HSV2-pCHO1.0-Fc; l: 酶切后质粒 HSV2-pCHO1.0-Fc

Figure 2 Identification of recombinant plasmids. A: Results of PCR amplification. a: HSV1-VH; b: HSV1-VL; c: HSV2-VH; d: HSV2-VL. B: Identification of recombinant plasmids. e: HSV1-pCHO1.0-Fc digested by *Avr II/BstZ17 I*; f: HSV1-pCHO1.0-Fc digested by *EcoR V/Pac I*; g: HSV2-pCHO1.0-Fc digested by *Avr II/BstZ17 I*; h: HSV2-pCHO1.0-Fc digested by *EcoR V/Pac I*. C: Enzymatic linearization of plasmids for transfection. i: HSV1-pCHO1.0-Fc undigested; j: HSV1-pCHO1.0-Fc digested; k: HSV2-pCHO1.0-Fc undigested; l: HSV2-pCHO1.0-Fc digested.

表 2 HSV1 和 HSV2 单抗可变区的序列

Table 2 Variable region in the amino acid sequences of HSV1 and HSV2 monoclonal antibody

| Variable region | Sequence of amino acid |
|-----------------|--|
| HSV1 VH | EVQLKQSGPGLVAPAQSL SITCTVSGFSLTSYGVSWVRQPPGQGLEWLGVIWADGSRDYHSTLISRL SISKDNSKSKVFLKLNLSLQTDDTATYYCAKSNQDYAYFDVWGAGTSVTVSS |
| HSV1 VL | DIQLTQSPSSLSASLGGKVTITCKSSQDINEYIAWYQCKPGKGPRLINYSALQPGIPSRFSGSGSGR DYSFISISNLEPEDFATYFCLQADDLLTFGGGKLELK |
| HSV2 VH | QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTSYGVSWIRQPPGKGLEWLGVIWADGSTKYHSALISRLT LNKDNSKRHVFLKLNLSLQTDDTATYYCAKSNYDAGAFDVWGAGTTVTVSS |
| HSV2 VL | DVVMVTQPLTSLVTFGQPASISCKSSQCLLHSDGKTYLNWLLQRPQSPQRLIFLVSQLDGVPDRF TGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYYCGQGFHRTFGGGTKLEIK |

VH: Heavy chain variable region; VL: Light chain variable region.

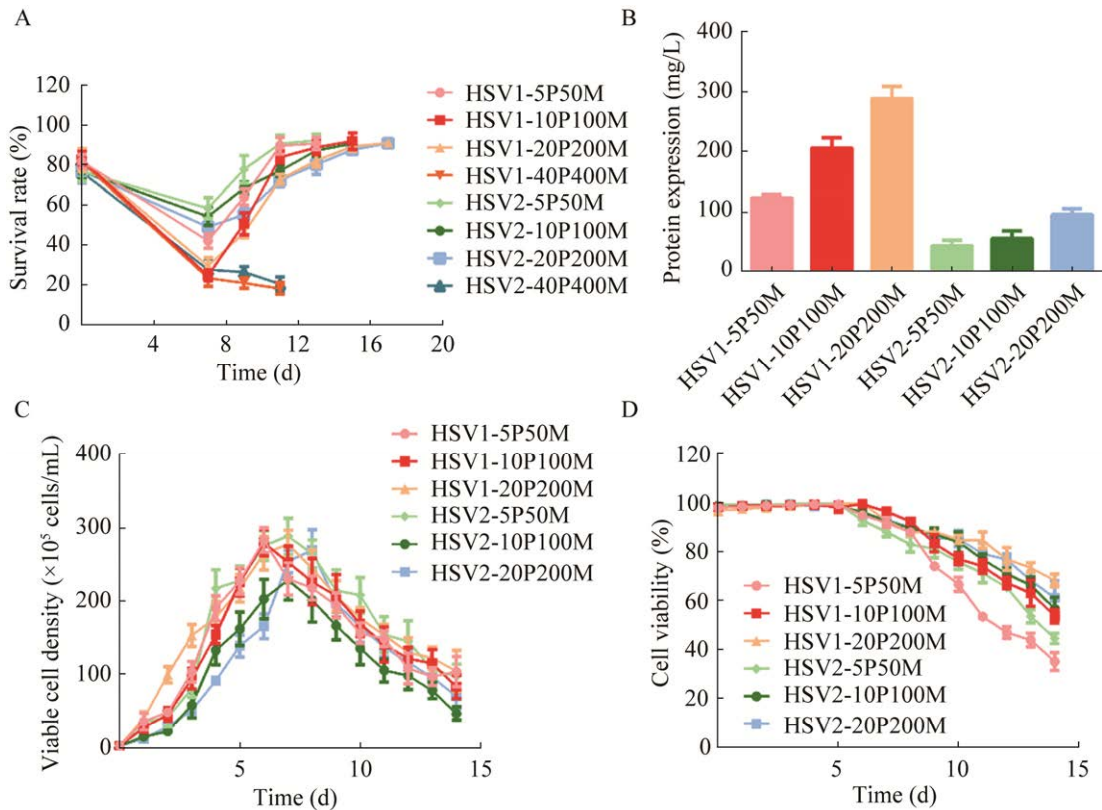


图3 细胞株的一轮加压培养情况及嵌合抗体的表达量 A: 细胞存活率恢复曲线. B: 不同加压条件下蛋白表达量. C: Fed-batch 评估过程细胞密度. D: Fed-batch 评估过程细胞活率

Figure 3 Culture of cell line and the expression of chimeric antibodies with the first phase of pressure selection. A: Survival rate of cells. B: Titer of chimeric antibodies. C: Viable cell density during fed-batch culture. D: Cell viability during fed-batch culture.

细胞进行 Fed-batch 评估发现: 细胞密度均出现先升高后降低趋势, 第 7-8 天细胞密度达到最高, 且压力越高, Fed-batch 评估中细胞活率维持时间较长; HSV1/HSV2 IgM 一轮加压均在 20P200M 筛选压力下平均表达量最高, 分别为 289.3 mg/L 和 95 mg/L, 表明随着压力增加, 蛋白表达量出现增高趋势, 更有利于筛选高表达细胞株(图 3B-3D)。

HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 在 20P200M 最适压力基础上进行二轮加压, 且同时进行两种压力摸索: 30P500M 和 50P1000M。结果显示二轮加压对比一轮加压细胞恢复时间较快, 同样呈现压

力越小越容易恢复的趋势(图 4A)。同样, 表达量与加压浓度呈正相关, 即压力越高, 表达量越高, HSV1/HSV2 IgM 二轮加压后的细胞群表达量平均值分别为 402 mg/L 和 253 mg/L(图 4B)。细胞生长曲线分析表明: 在蛋白评估过程中, 细胞密度均呈现先升高后降低的趋势, 且压力越高, 细胞活率下降较为缓慢, 这与一轮加压结果吻合(图 4B-4D)。

2.3 单克隆筛选与抗体表达量评估

利用有限稀释法对 HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 表达量最高的两个细胞群(20P200M-50P1000M)进行单克隆筛选, 同时使用加压和不加压两种培

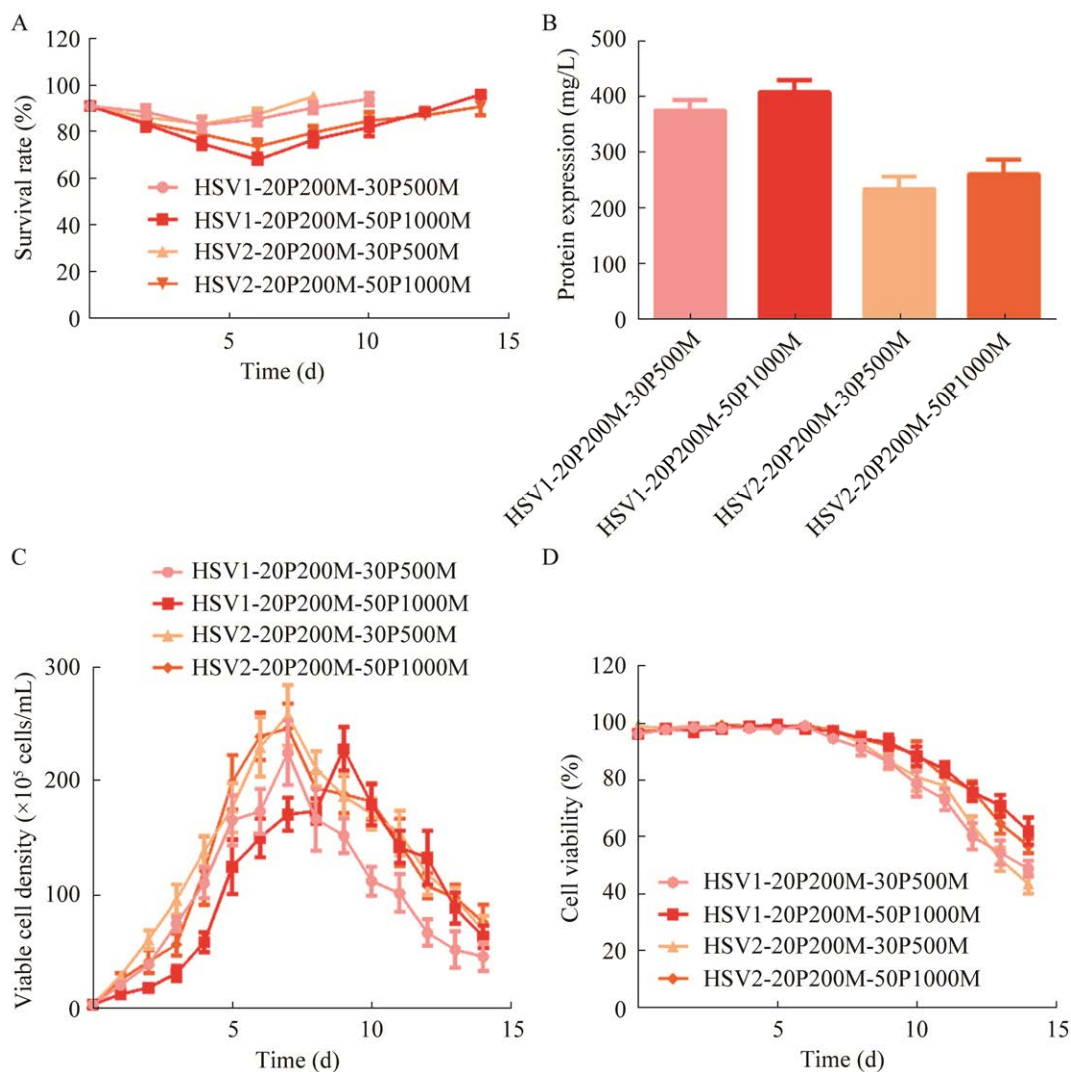


图4 细胞株的二轮加压培养情况及嵌合抗体的表达量 A: 细胞活率恢复曲线. B: 不同加压条件下蛋白表达量. C: Fed-batch 评估过程细胞密度. D: Fed-batch 评估过程细胞活率

Figure 4 Culture of cell line and the expression of chimeric antibodies with the second phase of pressure selection. A: Survival rate of cells. B: Titer of chimeric antibodies. C: Viable cell density during fed-batch culture. D: Cell viability during fed-batch culture.

培养基。结果显示：按照克隆效率=(显示集落生长的孔数)/(接种孔数 \times 每孔接种细胞数) \times 100%计算，单克隆形成率分别为：32% (HSV1 不加压)、45% (HSV1 不加压)、28% (HSV1 加压)、43% (HSV2 不加压)。这表明细胞在不加压力状态下更容易恢复；但通过对目的抗体单克隆表达量分析：使用加压培养基(200 nmol/L MTX)筛选出的单克隆表达量要显著高于不加压状态，HSV1-IgM 最

高单克隆表达量为 1 620 mg/L；HSV2-IgM 最高单克隆表达量为 623 mg/L (图 5)。

2.4 SDS-PAGE 与 HPLC 鉴定抗体蛋白大小与纯度

根据 SDS-PAGE 还原型与非还原型条带分析 HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 终筛选的单克隆抗体纯度(图 6A-6B)，结果显示：目的蛋白抗体重链分子量大小约为 65 kDa，轻链分子量大小

为 25 kDa 左右, 与预期相符; HPLC 检测显示: HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 抗体大部分为多聚体形式存在, 存在少部分单体形式(200 kDa 左右), 其中 HSV1-IgM 聚体所占的比例(峰面积占比 58.6%)对比 HSV2-IgM (51.4%)较高(图 6C)。

2.5 目的抗体反应性检测

根据试剂盒判断标准: 浓度值 ≥ 10 AU/mL 即为阳性。本实验所制备的 HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 嵌合抗体检测结果如表 3 所示, HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 检测浓度平均值分别为 407 807 AU/mL 和 156 890 AU/mL, 反应性强, 满足作为阳性质控品反应性要求。

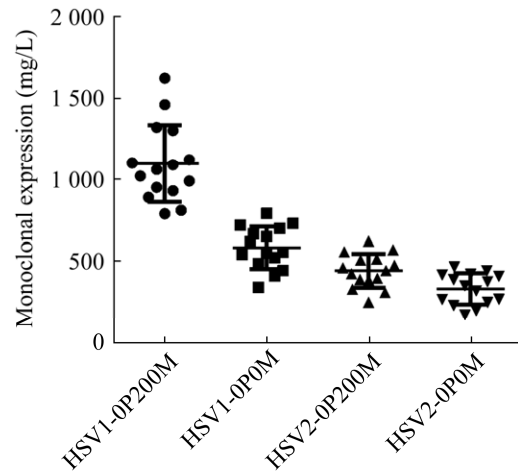


图 5 目的抗体单克隆表达量

Figure 5 Monoclonal expression of target antibody.

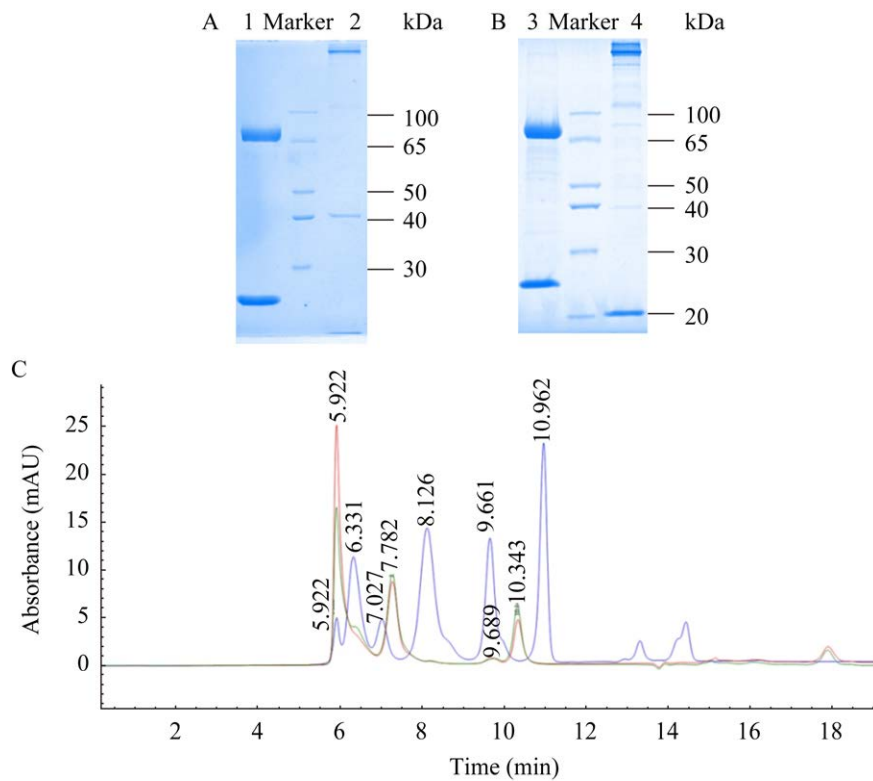


图 6 纯化后 HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 的 SDS-PAGE 与 SEC-HPLC 分析 A: SDS-PAGE 电泳. 1: HSV1-IgM 还原型条带; 2: HSV1-IgM 非还原型条带. B: SDS-PAGE 电泳. 3: HSV2-IgM 还原型条带; 4: HSV2-IgM 非还原型条带. C: SEC-HPLC 分析. 红色: 目的蛋白(HSV1-IgM); 绿色: 目的蛋白(HSV2-IgM); 蓝色: marker. 从左到右条带大小依次是 1 340, 670, 300, 150, 45, 17, 1 kDa

Figure 6 SDS-PAGE and SEC-HPLC profile of purified HSV1-IgM and HSV2-IgM. A: SDS-PAGE. 1: Reduced HSV1-IgM sample; 2: Non-reduced HSV1-IgM sample. B: SDS-PAGE. 3: Reduced HSV2-IgM sample; 4: Non-reduced HSV2-IgM sample. C: SEC-HPLC. Red line: HSV1-IgM sample; Green line: HSV2-IgM sample; Blue line: 1 340 kDa, 670 kDa, 300 kDa, 150 kDa, 45 kDa, 17 kDa, 1 kDa.

表3 目的抗体反应性

Table 3 Reactivity of target antibody

| | OD ₄₅₀ | Concentration (AU/mL) |
|----------|-------------------|-----------------------|
| HSV1-IgM | 18 688 568 | 411 028 |
| | 18 431 457 | 404 587 |
| HSV2-IgM | 7 275 229 | 161 688 |
| | 6 794 571 | 152 093 |

3 讨论

单纯疱疹病毒属于疱疹病毒科 α 病毒亚科双链 DNA 病毒, 根据抗原性不同分为 1 型和 2 型, 即 HSV1 和 HSV2, 两型核苷酸序列有 50% 同源性。单纯疱疹病毒在全球广泛分布, 人群中感染极为普遍, 潜伏和复发感染者较多。患者和带毒者是该病的传染源, 可通过皮肤、粘膜的直接接触或性接触途径进入机体。因此对 HSV1 和 HSV2 的检测具有重要的临床意义^[15]。本文研制的单纯疱疹病毒 1 型和 2 型(HSV1, HSV2)重组抗体, 可作为磁微粒化学发光试剂盒质控品, 利用捕获法来检测人血清或血浆中的 HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 抗体。

在过去的几十年里, 为了提高抗体产量(通常在 1-5 g/L), 研究者们致力于研究培养基成分以及反应器优化工艺来提高 CHO 细胞 fed-batch 产能^[16-18]。这些在 IgG 亚型抗体上取得显著的成绩, 然而对于更加复杂的结构, 比如 IgM 抗体, 目前未见相关报道。考虑 IgM 亚型抗体为五聚体, 较 IgG 亚型抗体普遍表达量较低^[19-20]。本研究使用了一种基于二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)的策略来产生一个能够产生高水平单抗的 CHO-S 稳定细胞池, 采用基于增加嘌呤霉素和 MTX 浓度的双相选择策略来选择稳定转染的细胞池, 且在稳定细胞池构建阶段以及单克隆筛选阶段进行了不同压力摸索, 确定最适合 IgM 亚型的筛选压力。结果显示: 在细胞池构建阶段, 一轮加压 20P200M (puromycin 20 μ g/mL, MTX

200 nmol/L)、二轮加压 50P1000M 细胞生长状态最佳且表达量较高(HSV1 IgM 达到 379.3 mg/L, HSV2 IgM 达到 253 mg/L); 在单克隆筛选阶段, 使用加压培养基比不加压培养基在 fed-batch 培养工艺中分泌的单抗量要高(HSV1-IgM 最高达到 1 620 mg/L, HSV2-IgM 最高达到 623 mg/L)。

IgM 单体由两条重链(HC: IgM 中称为 μ 链)和两条轻链(LC)组成, 通过连接链(JC)可形成五聚体分子(950 kDa 大小), 无连接链(JC)主要是以六聚体形式(1 150 kDa)存在。此外, 每个 HC 上有 5 个糖基化位点, 这使 IgM 抗体高度糖基化。由于其大小、复杂性和高糖基化水平, IgM 抗体重组表达仍是目前瓶颈^[21]。然而由于其在医学应用方面的潜在价值, 在过去的几年里, IgM 类抗体吸引了越来越多的生物技术学家的关注和研究, 因此突破其生产瓶颈是非常必要的^[22-26]。本研究制备人鼠嵌合 HSV1-IgM 和 HSV2-IgM 抗体, 并初步探索其在 CHO-S 稳定细胞株表达系统中不同加压条件对蛋白表达的影响, 这不仅对 IgM 抗体表达提供了一定指导, 还对单纯疱疹病毒感染的免疫情况以及是否初次感染的检测有着重要的意义。

REFERENCES

- [1] RAMAMURTHY M, RAJENDIRAN P, SARAVANAN N, SANKAR S, ARULIAH R, NANDAGOPAL B, SRIDHARAN G. Standardization of an in-house multiplex real-time polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Toxoplasma gondii*, Rubella virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus 1 and 2, and *Treponema pallidum* infection among pregnant women[J]. Indian Journal of Public Health, 2021, 65(4): 369-374.
- [2] FITZPATRICK D, HOLMES NE, HUI LS. A systematic review of maternal TORCH serology as a screen for suspected fetal infection[J]. Prenatal Diagnosis, 2022, 42(1): 87-96.
- [3] AGGARWAL R, BANSAL D, NARU J, SALARIA M, RANA A, MINZ RW, TREHAN A, MARWAHA RK.

- HSV-1 as well as HSV-2 is frequent in oral mucosal lesions of children on chemotherapy[J]. *Supportive Care in Cancer*, 2014, 22(7): 1773-1779.
- [4] NATH P, ALAMGIR KABIR M, DOUST SK, RAY A. Diagnosis of herpes simplex virus: laboratory and point-of-care techniques[J]. *Infectious Disease Reports*, 2021, 13(2): 518-539.
- [5] CHOUDHRY S, RAMACHANDRAN VG, DAS S, BHATTACHARYA SN, MOGHA N. Serological profile of HSV-2 in patients attending STI clinic: evaluation of diagnostic utility of HSV-2 IgM detection[J]. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 2009, 52(3): 353-356.
- [6] GOLROKH MOFRAD M, SADIGH ZA, AINECHI S, FAGHIHLOO E. Detection of human papillomavirus genotypes, herpes simplex, varicella zoster and cytomegalovirus in breast cancer patients[J]. *Virology Journal*, 2021, 18(1): 25.
- [7] BORDEA M, SAMASCA G, ALDEA C, LUPAN I, COSTACHE C. Prevalence of serum specific antibodies to TORCH agents in a cohort of children using DiaSorin “flash” chemiluminescence technology[J]. *Clinical Laboratory*, 2021, 67(8): 1959-1961.
- [8] REINHART D, DAMJANOVIC L, KAISERMAYER C, SOMMEREGGER W, GILI A, GASSELHUBER B, CASTAN A, MAYRHOFER P, GRÜNWALD-GRUBER C, KUNERT R. Bioprocessing of recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO expression hosts favor either MAb production or biomass synthesis[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(3): 1700686.
- [9] XU NN, MA C, OU JF, SUN WW, ZHOU LF, HU H, LIU XM. Comparative proteomic analysis of three Chinese hamster ovary (CHO) host cells[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 124: 122-129.
- [10] XIAO S, AHMED W, MOHSIN A, GUO MJ. Continuous feeding reduces the generation of metabolic byproducts and increases antibodies expression in Chinese hamster ovary-K1 cells[J]. *Life*, 2021, 11(9): 945.
- [11] MAHMOUDIAN J, NAZARI M, GHODS R, JEDDI-TEHRANI M, OSTAD SN, GHAHREMANI MH, VAFAEI S, AMIRI MM, ZARNANI AH. Expression of human placenta-specific 1 (PLAC1) in CHO-K1 cells[J]. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2020, 12(1): 24-31.
- [12] ROSINI E, de VITO A, PONTI F, SCALDAFERRI D, POLLEGIONI L, ACQUATI F. Expression and purification of the human tumor suppressor protein RNASET2 in CHO-S cells[J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 174: 105675.
- [13] SHERSHNEVA NN, MARDANLY SS, KLENYAEV IN, SAMOSADOVA PV. Development of immunofluorescent diagnostics for the determination of IgM and IgG antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2[J]. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2021, 66(5): 285-290.
- [14] 崔亚敏, 田晓平, 赵巧辉, 李桂林. 不同信号肽对人鼠嵌合 CMV-IgM 分泌表达的影响[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(6): 1223-1231.
- CUI YM, TIAN XP, ZHAO QH, LI GL. Effects of different signal peptides on the secretion of human-mouse chimeric CMV-IgM[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(6): 1223-1231 (in Chinese).
- [15] MATSUNAGA R, TSUMOTO K. Addition of arginine hydrochloride and proline to the culture medium enhances recombinant protein expression in *Brevibacillus choshinensis*: the case of RBD of SARS-CoV-2 spike protein and its antibody[J]. *Protein Expression and Purification*, 2022, 194: 106075.
- [16] 叶星, 陈继军, 王建锋, 安晨, 宋兰兰, 李晓进, 毛晓燕. 抗破伤风毒素单克隆抗体细胞培养基的筛选与优化[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34(8): 955-962.
- YE X, CHEN JJ, WANG JF, AN C, SONG LL, LI XJ, MAO XY. Screening and optimization of cell culture medium for monoclonal antibody against tetanus toxin[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2021, 34(8): 955-962 (in Chinese).
- [17] SHARKER SM, RAHMAN A. A review on the current methods of Chinese hamster ovary (CHO) cells cultivation for the production of therapeutic protein[J]. *Current Drug Discovery Technologies*, 2021, 18(3): 354-364.
- [18] CHROMIKOVA V, MADER A, STEINFELLNER W, KUNERT R. Evaluating the bottlenecks of recombinant IgM production in mammalian cells[J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(2): 343-356.
- [19] MADER A, CHROMIKOVA V, KUNERT R. Recombinant IgM expression in mammalian cells: a target protein challenging biotechnological production[J]. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2013, 4(4): 38-43.
- [20] KUMAR N, ARTHUR CP, CIFERI C, MATSUMOTO ML. Structure of the human secretory immunoglobulin M core[J]. *Structure*, 2021, 29: 564-571.

- [21] HENNICKE J, SCHWAIGERLEHNER L, GRÜNWALD-GRUBER C, BALLY I, LING WL, THIELENS N, REISER JB, KUNERT R. Transient pentameric IgM fulfill biological function—effect of expression host and transfection on IgM properties[J]. PLoS One, 2020, 15(3): e0229992.
- [22] BUNNOY A, NA-NAKORN U, SRISAPOOME P. Development of a monoclonal antibody specific to the IgM heavy chain of bighead catfish (*Clarias macrocephalus*): a biomolecular tool for the detection and quantification of IgM molecules and IgM⁺ cells in *Clarias* catfish[J]. Biomolecules, 2020, 10(4): 567.
- [23] ZHU WB, LIU ZH, ZHENG XL, LI J, LU KJ, JIANG X, ZHANG XJ, REN FF, ZHANG XM, XU JW, WU ZX, SUN M, DONG SZ. A broad and potent IgM antibody against tetra-EV-As induced by EVA71 and CVA16 co-immunization[J]. Vaccine, 2021, 39(44): 6510-6519.
- [24] BLOCKI FA, RADHAKRISHNAN S, van KEULEN VP, HECKMAN KL, CIRIC B, HOWE CL, RODRIGUEZ M, KWON E, PEASE LR. Induction of a gene expression program in dendritic cells with a cross-linking IgM antibody to the co-stimulatory molecule B7-DC[J]. The FASEB Journal, 2006, 20(13): 2408-2410.
- [25] SARAVANAN K, RAJENDRAN KV, GIREESH-BABU P, PURUSHOTHAMAN CS, MAKESH M. Molecular characterization and expression analysis of secretory immunoglobulin M (IgM) heavy chain gene in rohu, *Labeo rohita*[J]. Animal Biotechnology, 2020, 31(5): 413-425.
- [26] MCNABB L, ANDIANI A, BULAVAITE A, ZVIRBLIENE A, SASNAUSKAS K, LUNT R. Development and validation of an IgM antibody capture ELISA for early detection of Hendra virus[J]. Journal of Virological Methods, 2021, 298: 114296.

(本文责编 郝丽芳)