

## IMPROVEMENTS TO PAGE METHOD FOR DETECTING DNA

LI Hong Ye FAN Shu Guo

(South China Institute of Botany, CAS, Guangzhou, 510650)

LIU Yu Le CHEN Gang WANG Huan Yu

(Institute of Microbiology, CAS, Beijing, 100080)

## ABSTRACT

Some improvements to the routine PAGE method for detecting DNA, was introduced, including preparation of stored gel solution, pouring gel horizontally without sealing the edges, running the gel under higher voltage gradient, rapid staining and detection, and tactics of recovering silver stained DNA. This method is proved to be more simple and faster than previous ones and also reproducible.

Key words: PAGE Detecting DNA

## 经验交流

国产和进口 DMEM 培养基培养 CHO-C<sub>28</sub>工程细胞的质量评价

艾智武 吕东升

(卫生部武汉生物制品研究所 武汉 430060) (江苏省宜兴市塞尔生物化工厂 宜兴 214217)

陈文庆

孙燮钧

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

血源性乙型肝炎疫苗用于预防乙型肝炎病毒感染已有 20 多年的历史,但是这种血源性乙肝疫苗存在一些问题,如血源供应有限,具有潜在的危险性;且该疫苗总使 5%—10% 的人不能产生免疫应答<sup>[1]</sup>。为了克服这些缺点,国内的研究人员利用带有 HBsAg 基因片段的重组质粒转化二氢叶酸还原酶缺失的 CHO 细胞,从而获得能分泌 HBsAg 的重组细胞<sup>[2]</sup>,该细胞可进行大规模生产。目前已有较为成熟的生产工艺<sup>[3]</sup>,但为了今后的大规模生产作好准备,本着降低成本,提高收获率的原则,我们对国产 DMEM 培养基和进口 DMEM 培养基的质量进行了比较研究。

## 材料和方法

## (一) 材料

1. CHO-C<sub>28</sub>工程细胞 由中国预防医学科学院病毒学研究所提供。

2. 细胞培养基 (1) 进口 DMEM 培养基, GIBCO/BRL U. S. A., 葡萄糖含量为 4500mg/L (批号为 70K3465)。(2) 国产 DMEM 培养基, 宜兴市塞尔生物化工厂, 葡萄糖含量为 4500mg/L (批号为 960819、960820、970320)。

3. RPHA 试剂盒 用于检测细胞培养液中 HBsAg 的滴度(卫生部上海生物制品研究所生产)。

## (二) 方法

1. 细胞培养 利用两种 DMEM 培养基, 10L 转瓶培养 CHO-C<sub>28</sub>细胞。

2. HBsAg 滴度测定 采用反向血凝(RPHA)法测定细胞培养液的 HBsAg 滴度, 不小于 1:128 的收液为合格。

3. HBsAg 的纯化 收集到的细胞培养液分别经连续流高速离心去细胞碎片、硫酸铵沉淀、盐溶、两次 KBr 密度梯度离心、柱层析、除菌过滤。

4. HBsAg 蛋白含量测定 采用 Lowry 法测定<sup>[4]</sup>。

5. 杂蛋白的检测 采用 PAGE 银染法。

6. 特异多肽的检测 采用 SDS-PAGE 银染法。

7. 残留小牛血清含量检测 采用 ELISA 法。由本所质保处协作完成。

8. 硫酸铵沉淀收率及 HBsAg 纯化收率

沉淀收率 = 硫酸铵沉淀所得沉淀质量(g)/所用细胞收液量(L)

纯化收率 = 纯化后蛋白总量( $\mu\text{g}$ )/纯化所用细胞收液量(L)

分别用于判断硫酸铵的沉淀效果和两种 DMEM 培养基的收获率差异。

## 和分泌 HBsAg 的动态

CHO-C<sub>28</sub>细胞用两种 DMEM 培养基培养后,在显微镜下观察,细胞形态完整,在 10L 转瓶中培养 4—5 天都长成单层,细胞的生长和分泌 HBsAg 的结果见图 1,可以看出,细胞能持续稳定的表达 HBsAg,平均滴度是 1:128,时间长达 60 天。六批用于纯化的培养液中,9701、9703、9705 是批号为 960819、960820、970320 的国产 DMEM 培养基分别培养的细胞收液,9702、9704、9706 是进口 DMEM 培养基所培养的细胞收液;9701 与 9702、9703 与 9704、9705 与 9706 所收细胞培养液的细胞代数、培养时间基本相同,具有可比性。

## 结 果

### (一) 两种 DMEM 培养基培养的细胞生长

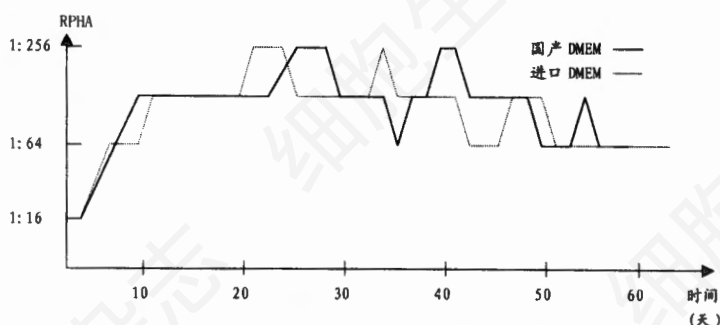


图 1 CHO-C<sub>28</sub>细胞转瓶培养 HBsAg 分泌动态

### (二) 硫酸铵沉淀后的效果

六批培养液经连续流高速离心后,上清按量加入饱和硫酸铵,边加边搅拌,然后放室温过夜,第二天离心去掉上清,所得的沉淀量及沉淀

收率见表 1,可以看出相比较的三组培养液中,国产 DMEM 的沉淀收率比对应的进口 DMEM 沉淀收率要高一些。

表 1 六批细胞培养收液经硫酸铵沉淀前后的结果

	收液量(L)	RPHA 滴度	沉淀量(g)	沉淀收率(g/L)
9701	46	1:128	362	7.87
9702	46	1:128	289	6.28
9703	200	1:128	1390	6.95
9704	200	1:128	1230	6.15
9705	180	1:256	1015	5.64
9706	180	1:256	907	5.04

(三) 相同条件下超速离心纯化的结果

硫酸铵沉淀盐溶后的上清经两次 KBr 密度梯度离心, 第二次离心的紫外监测图见图 2, 从离心图谱可以看出, 国产 DMEM 培养的细胞收液经离心后紫外监测图的图形宽而低, 进口 DMEM 培养的细胞收液经离心后的紫外监测图窄而高; 并经图形对照、密度对照、滴度对照三原则下收集的体积见表 2。

表 2 两次 KBr 密度梯度离心后的收量

批号	收液量(ml)
9701	240
9702	210
9703	370
9704	340
9705	380
9706	360

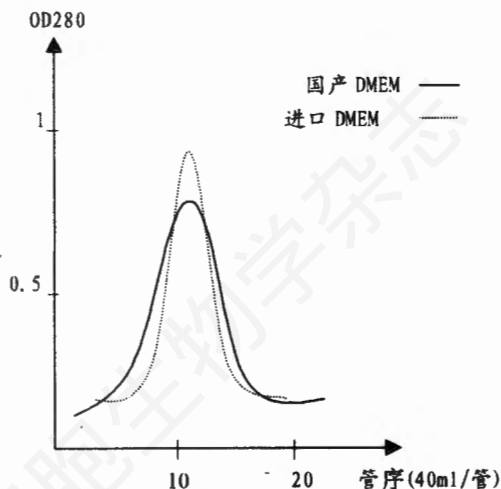


图 2 两次 KBr 密度梯度离心图谱比较

(四) 相同条件下柱层析的结果

两次 KBr 密度梯度离心后所收集的液体, 在相同的条件下经过 Sepharose CL 4B 柱层析, 其紫外监测图出现三个峰, 据文献报道, 图中第一峰为 DNA 峰, 第二峰为 HBsAg 峰, 第三峰为残留小牛血清成分, 三组样品的柱层析图相似, 其中国产 DMEM 的 HBsAg 峰高而宽, 进口 DMEM 的 HBsAg 峰低而窄(图 3)。

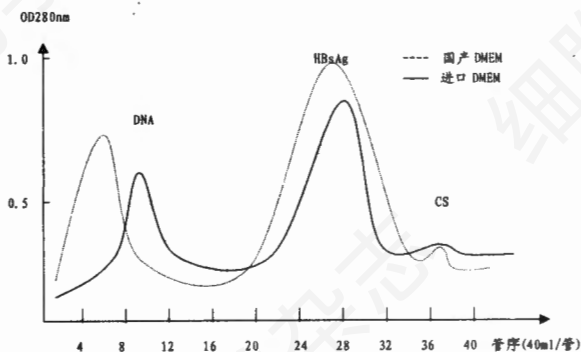


图 3 柱层析纯化后的样品曲线

柱层析后通过比较滴度、密度及图形收集到的液体经超滤浓缩、除菌过滤后, 取样测定蛋白总量, 并进行鉴定。在 SDS-PAGE 上呈现三条主带, 分别为 23Kd、27Kd、30Kd(图 4), 其中 23Kd、27Kd 是两条特异性条带, 30Kd 是 23Kd 含有-N-和-O-连接的两种糖化方式的多肽, 也是 HBsAg 特异性成分; PAGE 检测发现样品

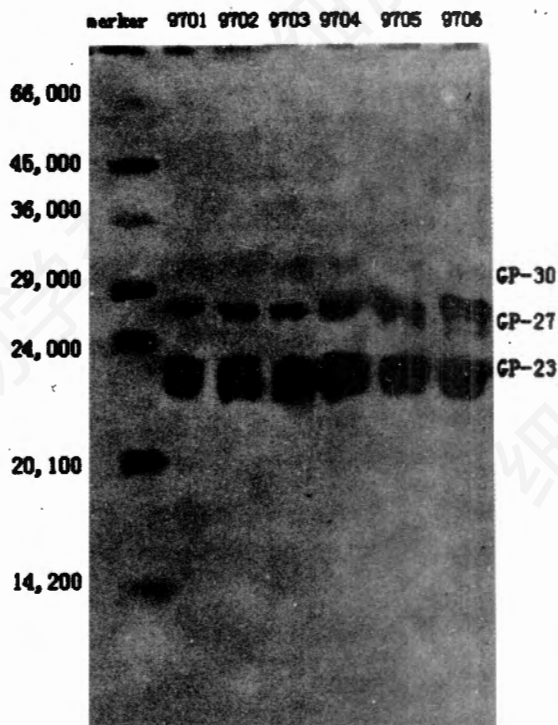


图 4 SDS-PAGE 及银染

蛋白停留在浓缩胶内,分离胶内无杂蛋白带出现(图5),符合基因工程乙肝疫苗制造及检定规程的标准;残余小牛血清含量也均符合WHO规定(见表3)。从计算出的纯化率可以看到,国产DMEM培养基培养的细胞收液之收获率不低于进口DMEM的收获率。

## 讨 论

在一定范围内,提高硫酸铵饱和度,增加沉淀收率有利于增大纯化收率。但是细胞收液的pH值可直接影响到沉淀收率,因pH偏酸性的细胞收集液加入硫酸铵后pH降低更多,导致严重的共沉淀现象,干扰了盐析效果<sup>[5]</sup>。

合适的比重范围和容量比例是获得区带离心成功的重要保证。HBsAg的密度为1.2~1.22g/ml,牛血清密度略高于HBsAg,DNA密度略低于HBsAg<sup>[6]</sup>。相同梯度液容量配比的样品经超速离心纯化后,进行密度对体积的回归分析( $d=a*v+b$ , $d$ -密度, $a$ -斜率, $v$ -出样体积, $b$ -常数),见图6。有资料报道,斜率越

大,表明密度变化越大,等密度区带就越窄,反之等密度区带就越宽;等密度区带越窄,DNA与HBsAg碰撞的机会越多,结合形成大颗粒的数目越多,大颗粒在柱层析时下样较快,因而就出现国产DMEM培养的细胞收液之样品层析图中DNA峰与HBsAg峰间距大一些(见图3)<sup>[7,8,9]</sup>。

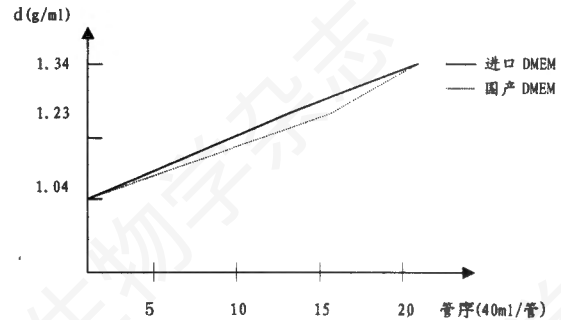


图6 超速离心时不同区域密度梯度变化

从图6的斜率变化可知,在密度小于1.23g/ml的区域,国产DMEM培养的收液之DNA和HBsAg等密度区带略宽于进口的,在密度大于1.23g/ml的区域内,前者的牛血清成分的等密度区带略窄于进口的,这说明国产DMEM培养的细胞收液的离心样品中DNA与HBsAg的分离效果好一些,但牛血清杂质的分离差一些。不过,两种培养基培养的细胞收液经硫酸铵沉淀后的样品在超速离心纯化时的线形梯度保持较好,从而较好地摆脱了DNA及牛血清对层析收率的影响。无论是国产DMEM培养的细胞收液纯化产品,还是进口DMEM培养的细胞收液纯化产品,其检测结果都符合基因工程乙肝疫苗制造及检定规程的标准。从计算出的纯化率可以看出,国产DMEM培养的细胞收液之收获率不低于进口DMEM的收获率,这为以后扩大生产规模,降低生产成本、用国产DMEM培养基替代进口DMEM培养基提供可靠依据。

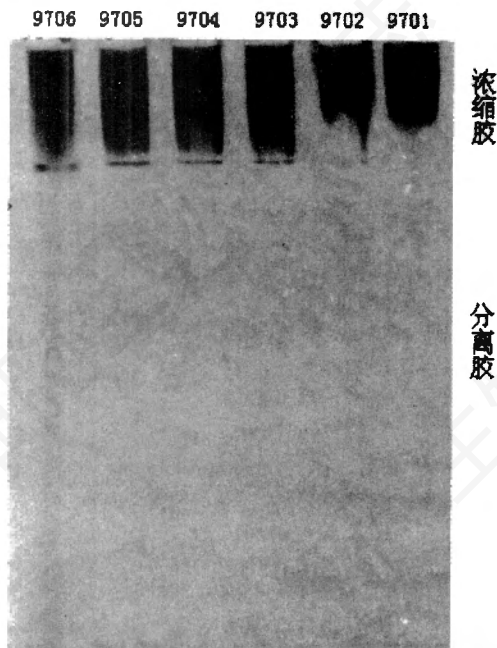


图5 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染

表 3 六批收液的最后结果

	总蛋白量( $\mu\text{g}$ )	纯化收率( $\mu\text{g/L}$ )	PAGE 结果	SDS-PAGE 结果	残留小牛血清( $\mu\text{g/ml}$ )
9701	24150	525.0	无多肽带出现	23Kd. 27Kd. 30Kd	35.8
9702	23529	511.5	无多肽带出现	23Kd. 27Kd. 30Kd	40.5
9703	102160	510.8	无多肽带出现	23Kd. 27Kd. 30Kd	42.6
9704	100140	500.7	无多肽带出现	23Kd. 27Kd. 30Kd	45.5
9705	113436	630.2	无多肽带出现	23Kd. 27Kd. 30Kd	36.0
9706	113202	628.9	无多肽带出现	23Kd. 27Kd. 30Kd	38.2

## 摘 要

我们用 10L 转瓶培养能高效表达 HBsAg 的重组中国仓鼠卵巢细胞(CHO-C<sub>28</sub>细胞株),在相同的培养条件下比较国产和进口 DMEM 培养基的质量。结果表明,两种 DMEM 培养的细胞之生长及分泌的 HBsAg 之滴度没有显著改变,国产 DMEM 培养的细胞收液的沉淀收率略高于进口 DMEM 的,前者的最后收率也不低于后者。两种 DMEM 培养的细胞收液经纯化后,HBsAg 的各项指标都符合基因工程乙肝疫苗制造及检定规程的标准,从试验结果可以看出,用国产 DMEM 培养基替代进口 DMEM 培养基是完全有可能的。

关键词: CHO-C<sub>28</sub>细胞株 DMEM HBsAg 纯化

## 参 考 文 献

- [1] Yap I, et al., 1992, *Vaccine*, 10(7):439.
- [2] 任贵方等, 1987, *病毒学报*, 3(4):313.
- [3] 哺乳动物细胞分泌乙型肝炎病毒表面抗原基因工程疫苗的研制与小试(科研成果资料), 1990.
- [4] 中国生物制品规程(1995年修订), 中国人口出版社.
- [5] 武力等, 1992, *生物制品年刊*, 99.
- [6] 梅雅芳等, 1990, *病毒学报*, 6(4):305.
- [7] 周国林等, 1992, *微生物与免疫学进程*, 24(2):37.
- [8] 周国林等, 1996, *生物制品年刊*, 35.
- [9] 张英等, 1997, *生物制品年刊*, 1.

## QUALITY EVALUATION OF CHO-C<sub>28</sub> RECOMBINANT CELLS CULTURED IN DOMESTIC AND FOREIGN OF DMEM

AI Zhi Wu LU Dong Sheng et al

(Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan 430060)

## ABSTRACT

The recombinant Chinese Hamster Ovary cell-CHO-C<sub>28</sub>, which could express and excrete HBsAg in high titer, was cultured in 10L roller bottles with both domestic and foreign medium of Delbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM). The comparative result showed that the cell growth as well as HBsAg titer was not significantly different with these two media. The amount and the recovery rate of precipitate by the approach with domestic DMEM was higher than that of foreign medium, respectively, the final recovery rate of products by the acquisition with domestic medium was not less than that of foreign DMEM. The purified HBsAg products could meet all of the Requirements for Recombinant Hepatitis B Vaccine manufacture and Quality Control. It was concluded that it was reliable to use domestic DMEM instead of foreign medium in the production.

Key words: CHO-C<sub>28</sub> cell line DMEM HBsAg Purification