

# HEK293F 细胞在不同无血清瞬转培养基中生长和单抗表达情况的研究

Henry Yu, Wayne Xu, Danting Fang, Shanpin Chen, Allan Gong  
QuaCell Biotechnology, Co., Ltd. • Cell Culture R&D Department

## 介绍

在生物制药行业中，瞬转系统在外源蛋白表达上具有快速、高效、经济的特点，使得该技术普遍运用在蛋白结构分析、蛋白互助作用研究、抗原表达、抗体分析评价等领域。然而许多瞬转表达体系在操作及目的产物表达量上存在一定的不足，研究人员开始对更简便的实验操作，更高的蛋白表达量都有了新的期待。本研究通过对两款不同的商业化无血清培养基 Wayne293™ Transfection Medium 与 FreeStyle™293 Expression Medium (Gibco) 的比较，以期挑选出其中在细胞生长、转染效率及单抗表达水平三方面综合性能更加的一款，用于进一步的瞬转系统优化。

## 材料和方法

### 实验材料

宿主细胞: FreeStyle™293-F cells (Thermo Fisher)

培养基: Wayne293™ Medium (QuaCell Cat.# A21501),

FreeStyle™293 Expression Medium (Gibco),

OptiPRO SFM (Gibco)

转染试剂: PEI (Polysciences)

### 细胞培养方法

使用 HEK293F 细胞，以  $0.5 \times 10^6$  cells/mL 密度复苏至体积为 30mL 的瞬转培养基中进行连续培养。实验采用 125mL 细胞培养瓶 (Corning) 作为生物反应器，培养总体积为 30mL，培养基中葡萄糖的含量维持在 6g/L，具体的生物反应器培养参数如表 1。

表 1. 生物反应器培养参数

生物反应器	125mL 细胞培养瓶
工作体积	30mL
摇床转速	125rpm/min
温度	37°C
CO2 浓度	5%

### 细胞转染方法

#### 1. 细胞驯化

将 HEK293F 细胞分别传代至 Wayne293™ 及 FreeStyle™293 培养基中，按上述细胞培养方法培养 3 天后传代。传代 2 次后，分别以 92% Wayne293™ 培养基 + 8% DMSO (Sigma) 及 90% FreeStyle™ 培养基 + 10% DMSO 作为冻存介质，冻存细胞备用。

#### 2. 细胞培养物准备

分别复苏冻存细胞至 Wayne293™ 及 FreeStyle™293 培养基中，按上述细胞培养方法培养 3 天后，使用相应的培养基稀释至  $1 \times 10^6$  cells/mL。

#### 3. 转染

按照两个产品说明书各自的要求，分别以 PBS 及 OptiPRO SFM 制备 PEI-DNA 转染混合液，逐滴加入至上述细胞培养物中，边滴加边摇匀。

#### 4. 培养及收获

按上述细胞培养方法继续培养 5-7 天，收集上清，检测表达产物。

### 检测分析方法

在培养期间对培养物进行取样并分析细胞生长、活率、形态、细胞代谢和营养消耗情况。在摇瓶培养阶段的细胞形态取样后用显微镜观察。计数及活率测定使用细胞计数仪 (Countstar)；单抗表达量通过 Human IgG ELISA (KHB) 检测；报告基因表达观察使用荧光倒置显微镜 (Olympus)。

## 实验结果与分析:

### 实验一. 细胞生长情况的对比

HEK293F 细胞分别在 Wayne293™ 及 FreeStyle™293 培养基中进行连续 7 天的 batch 培养后，细胞生长情况如图 1 所示；细胞计数过程中观察到的细胞结团情况如图 2 所示。

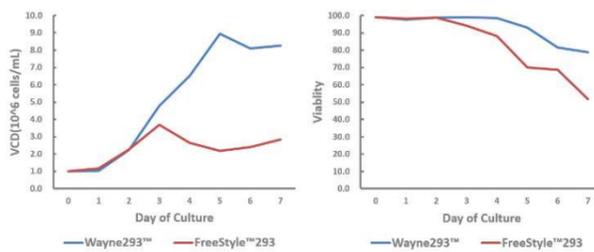


图 1. HEK293F 在两种商业化培养基中的生长情况

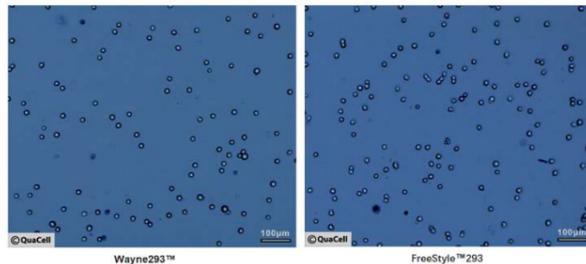


图 2. HEK293F 在两种商业化培养基中培养 3 天后的结团情况

结果分析: 相较于 FreeStyle™293, HEK293F 细胞在 Wayne293™ 中有明显较高的细胞密度 ( $10 \times 10^6$  cells/mL) 和保持较高的活率 (D7 viability > 80%)。HEK293F 细胞培养第三天的细胞计数照片, 在 Wayne293™ 培养基中的悬浮细胞比 FreeStyle™293 中的更少出现结团。

### 实验二. 转染效率的对比

向培养在 Wayne293™ 及 FreeStyle™293 培养基中的等量 HEK293F 细胞中, 转染等量的带 EGFP 荧光报告基因的质粒 (pKS001-CMV-EGFP, ~10Kb), 继续培养后 24 小时将细胞置于荧光倒置显微镜下观察, 结果如图 3 所示。

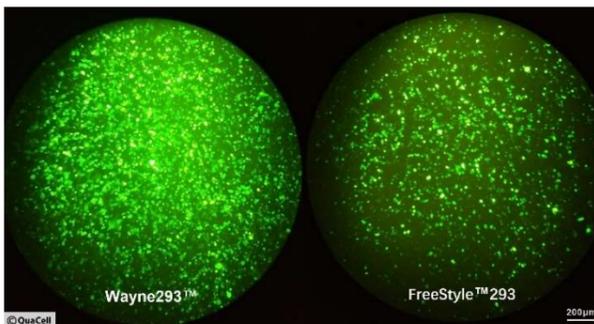


图 3. HEK293F 在两种商业化培养基中转染后 24h GFP 表达情况

结果分析: HEK293F 细胞在 Wayne293™ 中的荧光数量和强度明显高于, 说明在前者中的转染效率更高。

### 实验三. 单抗瞬转表达的对比

为了测试两种商业化培养基中 HEK293F 细胞的单抗瞬时表达能力, 我们选取了 3 个公开的单抗序列, 即 PD-1#1 (Nivolumab)、PD-1#2 (Pembrolizumab)、PD-L1 (Atezolizumab), 分别连接到同一个质粒骨架 (pKS001-CMV) 上, 分别在两种培养基中转染至 HEK293F 细胞中。Day5 及 Day7 分别取培养上清检测抗体表达量, 结果如图 4 所示。

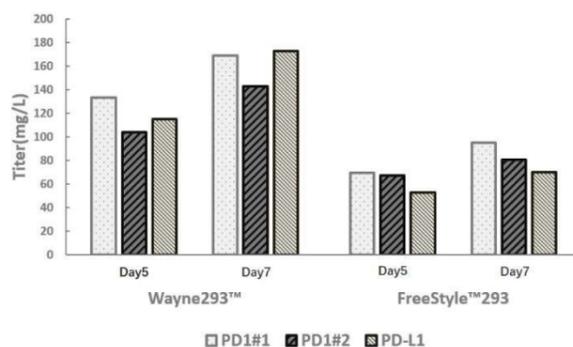


图 4. 三个不同单抗序列在两种商业化培养基中的瞬时表达情况

结果分析: HEK293F 细胞在 Wayne293™ 中进行单抗的瞬时表达, 三种单抗

Day5 及 Day7 的表达量均较 FreeStyle™293 中的高。

### 实验四. 连续传代测试

将 HEK293F 细胞分别在 Wayne293™ 及 FreeStyle™293 培养基中进行连续传代培养, 每间隔 1 天传代一次, 传代接种密度为  $0.5 \times 10^6$  cells/mL, 传代 20 次。生长曲线如图 5 所示。每隔 4 天冻存细胞, 连续传代培养结束后同时复苏, 分别在相应的培养基中瞬转表达同一单抗 PD-1#1 (Nivolumab)。转染后继续培养 5 天, 表达量如图 6 所示。

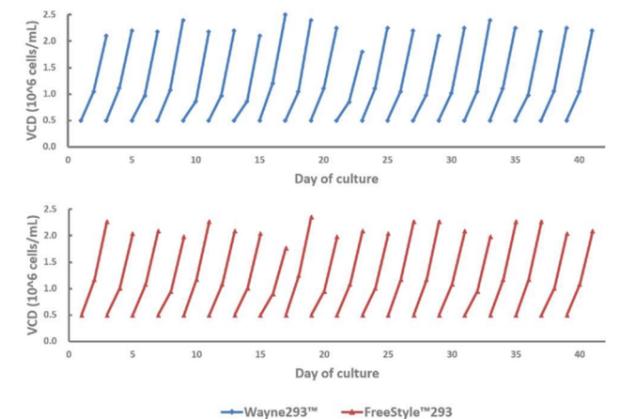


图 5. HEK293F 在两种商业化培养基中连续传代的生长情况

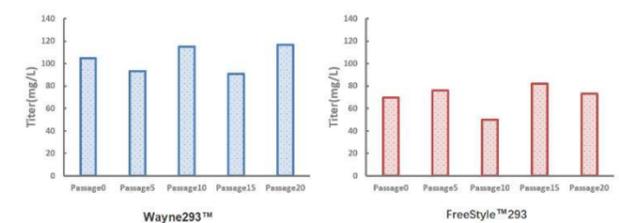


图 6. 两种商业化培养基中不同代次细胞的单抗表达情况

结果分析: HEK293F 细胞在两种商业化培养基中连续传代 20 次, 细胞生长及瞬转表达单抗能力都比较稳定。

## 结论和讨论

使用 HEK293 系列细胞瞬转表达单抗和重组蛋白技术被广泛运用, 瞬转表达系统相较于稳定转染的方法有着操作简单、收获时间短、灵活便捷等优势。但是不断优化瞬转表达体系, 使得细胞生长、转染、表达均有更好表现, 一直都是生物药研发人员不懈追求的方向。因此, 我们使用 HEK293F 细胞对在两款商业化培养基中的细胞生长、转染效率、单抗表达量等方面进行了多层次的对比。与目前被广泛使用的 FreeStyle™293 Expression Medium 相比, 新配方 Wayne293™ Transfection Medium 在连续传代中的表现与之相近, 但在细胞最高密度上有近 4 倍的提升 (峰值  $10 \times 10^6$  cells/mL), 同时细胞活率的维持时间更长 (D7 viability > 80%)、结团更少, 转染效率及单抗表达量也更高。综上所述, Wayne293™ Transfection Medium 的使用有助于改善 HEK293F 细胞的生长及单抗表达, 可以提供更为高效的瞬时表达解决方案。

## 参考文献

- Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 51, 187-200 (2005).
- Stepanenko, A. A. & Dmitrenko, V. V. HEK293 in cell biology and cancer research: Phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene* 569, 182-190 (2015).
- Jäger, V. et al. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* 13, (2013).
- Watanabe, H. et al. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 47044-47051 (2002).
- Srivastava, A., Durocher, Y. & Gamain, B. Expressing full-length functional PfEMP1 proteins in the HEK293 expression system. *Methods Mol. Biol.* 923, 307-319 (2013).
- Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F. & Zhang, X. Engineering CAR-T cells. *Biomark. Res.* 5, 22 (2017).
- Jackson, H. J., Rafiq, S. & Brentjens, R. J. Driving CAR T-cells forward. *Nature Reviews Clinical Oncology* 13, 370-383 (2016).
- Srivastava, S. & Riddell, S. R. *Engineering*