

研究报告

MG-132 提高 TNFR-Fc 融合蛋白在 CHO 细胞中表达的研究*

温家明¹ 聂艳峰^{1,2} 梁翰章¹ 黄雯茜¹ 雷云¹ 谢秋玲¹ 裴运林² 熊盛^{1**}

(1 暨南大学药学院 生物医药研究院 & 基因药物国家工程中心 广州 510632 2 广东丸美生物科技股份有限公司 广州 510530)

摘要 目的:在不影响细胞活力的前提下,通过抑制人肿瘤坏死因子受体-Fc(TNFR-Fc)融合蛋白的降解,提高其在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中的产量和质量。方法:通过在细胞培养过程中加入全蛋白质合成抑制剂 Cycloheximide、溶酶体抑制剂 Leupeptin、蛋白酶体抑制剂 MG-132,验证 TNFR-Fc 融合蛋白在 CHO 细胞的降解途径;免疫印迹(Western blot)方法检测在细胞内 TNFR-Fc 融合蛋白的变化,酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测分泌表达的 TNFR-Fc 融合蛋白的含量。Protein A 亲和层析纯化细胞培养液上清,高效液相色谱(HPLC)检测重组蛋白的纯度,并通过阻断肿瘤坏死因子 α (TNF α)诱导的 L929 细胞毒作用来检测纯化的 TNFR-Fc 蛋白的活性。结果:TNFR-Fc 在 CHO 细胞内,经泛素蛋白酶体途径降解,稳定表达 TNFR-Fc 的 CHO 细胞培养过程中添加 50 μ mol/L MG-132,可以使 TNFR-Fc 融合蛋白的分泌表达量提高 42.35%,纯化后,二聚体比例提高 28.60%,并且纯化后目的蛋白的比活性也增加。结论:在不影响细胞活力、蛋白质生物学活性的前提下,添加蛋白酶体抑制剂 MG-132 提高 TNFR-Fc 融合蛋白在 CHO 细胞中的表达量,为进一步研究从抑制蛋白质降解途径来提高重组蛋白在 CHO 细胞中的表达量提供了现实依据。

关键词 MG-132 TNFR-Fc 降解 CHO 细胞 泛素化 提高表达

中图分类号 Q816

蛋白质药物中的单克隆抗体 Abs 和 Fc 融合蛋白在市场上高达 60 多亿美元的销售额^[1],而 CHO 细胞是良好的外源蛋白表达宿主,上市药物中多由其表达^[2,3]。细胞培养过程中,死亡细胞裂解后会分泌蛋白酶,该蛋白酶能降解分泌到上清液中的蛋白质,从而降低目的蛋白的表达量;Robert 等^[4]研究发现,高活率的细胞也会分泌一种称为 Cathepsin-D 的蛋白酶来降解蛋白质,从而影响目的蛋白的质量。细胞内主要有两种

蛋白质降解途径,即溶酶体途径和泛素蛋白-酶体途径。泛素由 76 个氨基酸组成并广泛存在于生物体内的蛋白质,泛素分子能够结合底物蛋白诱导其经泛素-蛋白酶体途径降解^[5]。一些研究发现泛素存在于细胞培养液上清液和细胞裂解物中,这说明泛素可能在动物细胞大规模培养过程中有着很重要的作用^[6]。MG-132 是一种蛋白酶体抑制剂,能结合蛋白酶体 20S 亚基的活性位点,从而抑制其活性^[7]。本实验旨在研究 TNFR-Fc 融合蛋白在细胞内的稳定性及降解途径,并探讨在不影响 CHO 细胞活力和重组蛋白活性的前提下,通过蛋白质降解抑制剂抑制 TNFR-Fc 蛋白降解,提高其在 CHO 细胞中的产量。

收稿日期:2015-03-11 修回日期:2015-06-18

* 国家重大新药创制科技重大专项(2012ZX09103301-033, 2012ZX09202301-001),广东省战略性新兴产业核心技术攻关项目(2012A080800008),广东省重大科技专项(2012A080202014)资助项目

**通讯作者,电子邮箱:xsh_jnu@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与培养基

稳定表达 TNFR-Fc 融合蛋白 CHO 细胞、小鼠成纤维细胞株 L929 为实验室保存。

1.2 主要试剂及仪器

无血清培养基 Pro CHO5 (Lonza), CD CHO Medium、DMEM 培养基、谷氨酰胺 (Gibco), MG-132 (Selleck), cycloheximide、leupetin (ENZO Life Science), 羊抗人 Fc、羊抗人 Fc-HRP (Abcam), 次黄嘌呤、胸腺嘧啶、放线菌素 D、鼠抗 β -actin (Sigma), 鼠 IgG-HRP (Cell Signal Technology), 驴抗羊-HRP (Santa), Enbrel (惠氏公司), 5ml 柱体积 Protein A 层析柱 (博格隆), TSK gel G3000SWXL 凝胶色谱柱 (TOSOH)。

一次性旋转管 Tubespin (瑞士 TPP 公司), 箱式摇床 ISF-4-W (瑞士科耐公司); 纯化设备 AKTA Avant25 (GE healthcare), 高效液相色谱仪 MltiMate3000 (Dionex)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 CHO 细胞接种到 Pro CHO 5 培养基 (包含 4mmol/L 谷氨酰胺, 0.68mg/L 次黄嘌呤和 0.194mg/L 胸腺嘧啶), 接种密度为 1×10^6 cells/ml, 接种体积为 10ml 于透气生物反应器 50ml Tubespin 管中, 培养温度为 37℃, 转速为 180r/min, CO₂ 浓度为 6%, 3~4 天传代一次。

1.3.2 细胞实验 降解途径研究: MG-132 粉末溶于 DMSO 配制成 20 ~ 40mmol/L 保存浓度, -80℃ 保存。细胞密度达到对数生长期 (约 6×10^6 cells/ml), 离心并用新鲜培养基重悬, 接种密度为 5×10^6 cells/ml, 培养体积为 10ml, 加入图 1 所示的 20 μ mol/L MG-132、CHX (cycloheximide) 20 μ g/ml、LEU (Leupeptin) 50 μ mol/L, 2 平行管并每 4h 取样, 免疫印迹分析 TNFR-Fc 融合蛋白表达变化。

MG-132 浓度筛选: 细胞密度达到对数生长期 (约 6×10^6 cells/ml), 离心并用新鲜培养液重悬, 接种密度为 1×10^6 cells/ml, 培养体积为 10ml, 2 平行管, 每两天取样并按比例加入台盼蓝, 用血计数板计数, 记录细胞密度、细胞活率。D5 加入图 2 所示的 MG-132 浓度和 10% (V/V) 补料培养基 CD CHO Medium, D8 收集上清液并纯化分析^[8]。

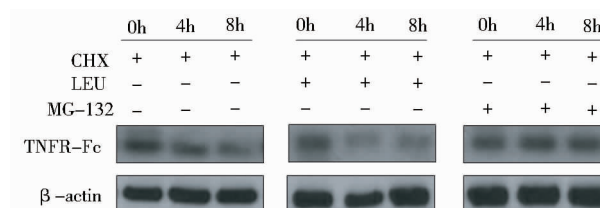


图 1 TNFR-Fc 融合蛋白的降解途径

Fig. 1 Degradation pathway of TNFR-Fc fusion protein

Immunoblotting analysis of TNFR-Fc in lysates of CHO cells treatment with cycloheximide (CHX), CHX and Leupeptin (LEU) or CHX and MG-132. β -actin is used as loading control

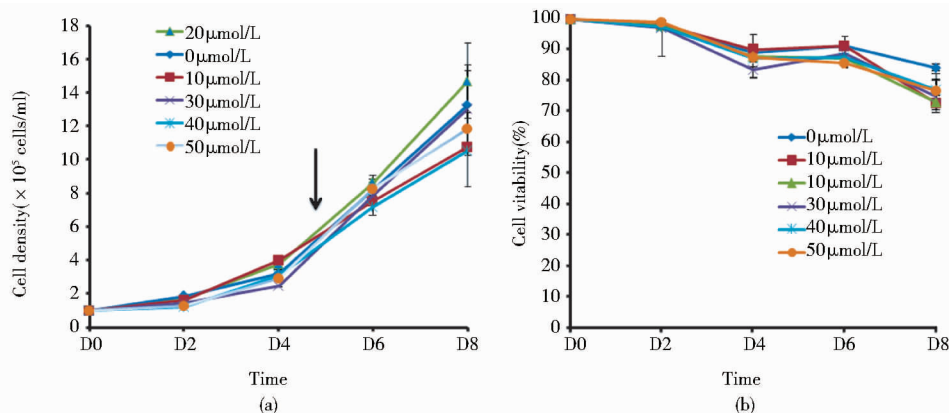


图 2 细胞生长情况

Fig. 2 CHO cell growth density (a) and vitality rate (b)

Arrow represents adding MG-132 on D5

1.3.3 胞内 TNFR-Fc 的 Western blot 检测 收集细胞,加入 SDS 裂解液(碧云天),裂解 30min,BCA 试剂盒(Thermo)测定蛋白质浓度,制备 5%~12% 丙烯酰胺凝胶(MD Bio),上样 30 μ g/孔,转移到 NC 膜(Millipore)上,TBST 洗 10min \times 3 次,5% 脱脂奶粉封闭 1h,TBST 洗 10min \times 3 次,一抗(β -actin 稀释 1:30 000;羊抗人 Fc 稀释 1:20 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗 10min \times 3 次,二抗(抗鼠 IgG-HRP 稀释 1:10 000;抗羊 IgG-HRP 稀释 1:20 000)孵育 1h,TBST 洗 10min \times 3 次,加入 ECL 发光液(Millipore),X 射线胶片(柯达)显影。

1.3.4 胞外 TNFR-Fc 的 ELISA 检测 以羊抗人 IgG-Fc 包被 96 孔酶标板,4 $^{\circ}$ C 过夜,2% BSA 在 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h,PBST(pH 7.4,0.1% 吐温-20)洗 3 次,稀释并加入待测样品及依那西普(Enbrel)标准品 37 $^{\circ}$ C 下 1h,PBST 洗 3 次,加入碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗人 IgG 于 37 $^{\circ}$ C 下 1h,PBST 洗 3 次,PNPP 显色 15min,3mol/L NaOH 终止反应,在 405nm 波长下读取吸光值。通过标准品做标准曲线,计算样品中 TNFR-Fc 融合蛋白的含量,每个样品设 3 个复孔,取平均值^[9]。

1.3.5 胞外 TNFR-Fc 的纯化与 HPLC 检测 蛋白质纯化:将培养液离心 5000r/min \times 10min,取上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤,用 rProtein A(博格隆,5ml)进行亲和层析。亲和层析磷酸盐平衡缓冲液 20mmol/L PB(pH 7.0);洗脱缓冲液为 100mmol/L 甘氨酸(pH 3.2),流速为 1.5ml/min。

HPLC 检测:收集洗脱峰回调 pH 至 7.0,流动相为 pH 7.0 的 500mmol/L PB,流速为 0.5ml/min,测定结果并分析 14~15min 峰(二聚体)所占比例^[10]。

1.3.6 纯化的 TNFR-Fc 活性检测 将 L929 细胞在含有 10% 胎牛血清 FBS 的 DMEM 培养基中培养,经胰酶消化后重悬,使细胞数为 2×10^5 cells/ml,加入 96 孔细胞培养板,每孔 100 μ l,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养过夜。另取新的 96 孔培养板,将纯化后的 TNFR-Fc 融合蛋白,与阳性药依那西普 Enbrel 从 1.25mg/ml 系列稀释后,加入重组人 TNF α 和放线菌素 D 至终浓度分别为 1ng/ml 和 2 μ g/ml,37 $^{\circ}$ C 放置 30min 后,转移到相应的细胞孔中,每孔 50 μ l,37 $^{\circ}$ C 培养 24h。每孔加入 10 μ l 的 WST-8 显色液,37 $^{\circ}$ C 培养 2.5h,450nm 波长处测定,EC₅₀ 计算采用 Origin 8.0 软件的生长曲线模拟,显著性分析采用 SPSS 19.0 软件的独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 TNFR-Fc 的降解途径

利用全蛋白质合成抑制剂来研究蛋白质的降解途径已有报道^[11-12]。加入全蛋白质合成抑制剂 CHX 处理 CHO 细胞 0h、4h、8h 后,细胞内 TNFR-Fc 融合蛋白水平不断降低,说明 TNFR-Fc 融合蛋白在细胞内存在降解(图 1 左边 3 个泳道);CHX 和溶酶体抑制剂 Leupeptin 处理 CHO 细胞不同时间,并不能抑制 TNFR-Fc 融合蛋白的降解(图 1 中间 3 个泳道),CHX 和泛素蛋白酶体抑制剂 MG-132 共同处理 CHO 细胞后,显著抑制了 TNFR-Fc 融合蛋白的降解(图 1 右边 3 个泳道),说明 MG-132 能够抑制 TNFR-Fc 经泛素蛋白酶体途径降解。综上所述,TNFR-Fc 在 CHO 细胞内存在降解,并且是通过泛素蛋白酶体途径降解的。

2.2 MG-132 对细胞生长的影响

确定了细胞内的 TNFR-Fc 融合蛋白经过泛素-蛋白酶体途径降解后,接下来研究该途径的抑制剂 MG-132 对细胞生长的影响。细胞进入对数期加入蛋白酶抑制剂 MG-132 后,低浓度 0~20 μ mol/L 的 MG-132 对 CHO 细胞的密度和活率没有影响[图 2(a)],其中在 20 μ mol/L 时密度达到最高值。高浓度 30~50 μ mol/L 的 MG-132 降低了细胞的最大密度,主要是抑制了细胞的泛素蛋白酶体的活性,导致胞内待降解的无功能蛋白质的累积影响细胞的生长。当细胞活率低于 80% 时[图 2(b)],收集细胞沉淀和上清液。

2.3 MG-132 对胞内和胞外 TNFR-Fc 表达的影响

细胞内累积的 TNFR-Fc 的量与加入的 MG-132 量与时间呈正相关[图 3(a)]。细胞外的 TNFR-Fc 在低浓度 MG-132 处理时表达量下降,这说明细胞外的 TNFR-Fc 融合蛋白分泌量减少[图 3(b)],结合图 3(a)和(b),可得到如下结论:加入 50 μ mol/L 的 MG-132 抑制蛋白质降解,在细胞内累积很多[图 3(a)],TNFR-Fc 融合蛋白在 CHO 细胞内大量合成;但是,分泌到胞外的蛋白质并未明显增加,说明 TNFR-Fc 在细胞内大量降解。加入 MG-132 后,未及时降解的蛋白质没有信号肽修饰而在细胞内累积,但是,加入 50 μ mol/L MG-132 后,分泌到胞外的蛋白质量(相对于加入 0 μ mol/L MG-132 组)提高了 42.35%,推测 MG-132 作为蛋白质降解抑制剂同时也作为化学伴侣协助蛋白质折叠^[13-14]。

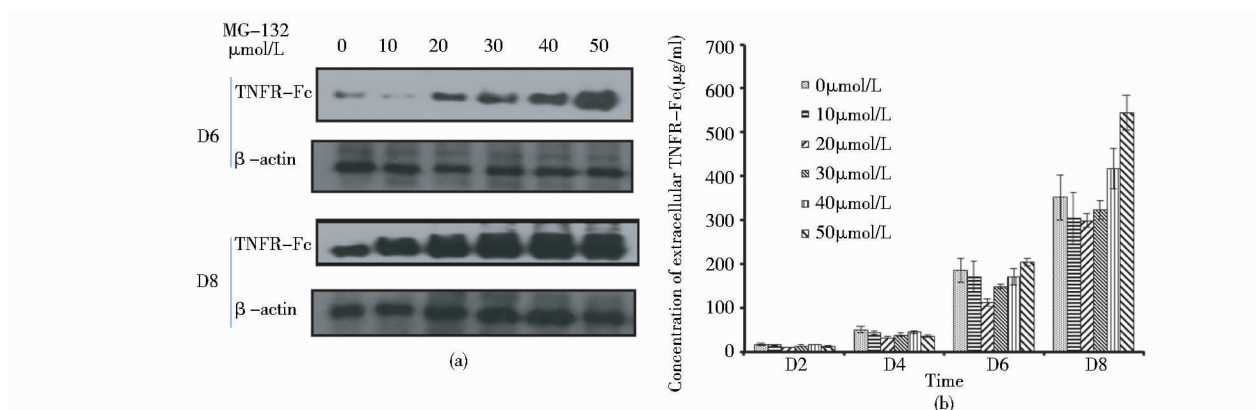


图3 TNFR-Fc 融合蛋白胞内胞外的表达

Fig. 3 Intracellular and extracellular expression of TNFR-Fc

(a) Western blot of intracellular expression of TNFR-Fc on D6/8 (b) ELISA of extracellular expression of TNFR-Fc on D2/4/6/8

2.4 MG-132 对纯化的 TNFR-Fc 质量的影响

经过 rProtein A 亲和层析得到纯 TNFR-Fc 融合蛋白后,二聚体是其活性形式,HPLC 检测其二聚体含量。从图 4(a)的 HPLC 的结果可以看出,序号 7 为阳性药物 Enbrel,出峰时间为 15.3min,均为二聚体。而在加入 MG-132 浓度

为 $0\mu\text{mol/L}$ 、 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $20\mu\text{mol/L}$ 的条件下,细胞分泌表达的 TNFR-Fc 融合蛋白以多聚体(11 ~ 13min 峰)和二聚体(15min 峰)形式存在,以二聚体为主;随着 MG-132 加入量的提高,相对于 $0\mu\text{mol/L}$ 处理组, $50\mu\text{mol/L}$ 处理下二聚体的比例提高了 28.60% [图 4(b)]。

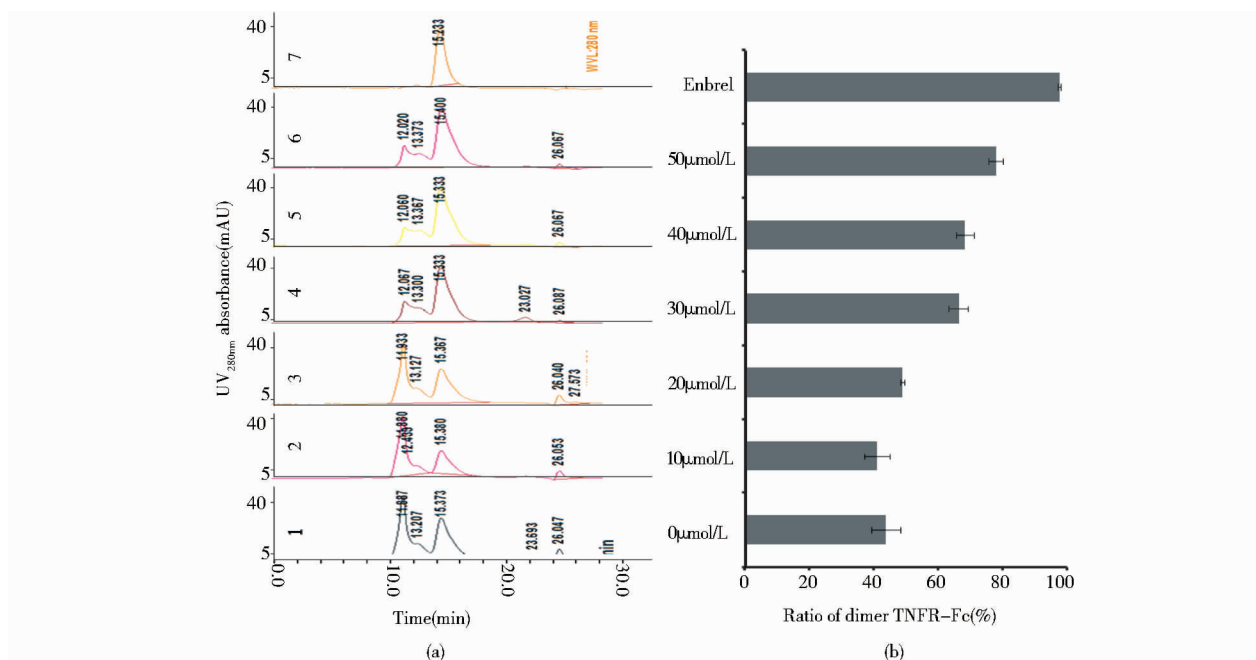


图4 纯化后的 TNFR-Fc 融合蛋白

Fig. 4 Quantity of purified TNFR-Fc fusion protein

(a) HPLC of purified TNFR-Fc fusion protein 1 ~ 6; Represent treated with MG-132 of $0\mu\text{mol/L}$, $10\mu\text{mol/L}$, $20\mu\text{mol/L}$, $30\mu\text{mol/L}$, $40\mu\text{mol/L}$, $50\mu\text{mol/L}$; 7: Represent Enbrel (b) The ratio of dimer of TNFR-Fc fusion protein

2.5 MG-132 对 TNFR-Fc 体外活性的影响

经过纯化后,在阻断 $\text{TNF}\alpha$ 诱导的 L929 细胞毒作用, EC_{50} 为生长曲线 $\text{OD}_{405\text{nm}}$ 下最大吸光值和最小吸光值

的平均值所对应的 TNFR-Fc 浓度, EC_{50} 比较结果为阳性对照组 Enbrel $< 50\mu\text{mol/L}$ 组 $< 0\mu\text{mol/L}$ 组。这与 TNFR-Fc 融合蛋白活性成分二聚体的含量呈正相关,与

理论符合。统计学分析,TNFR-Fc 活性在 $50\mu\text{mol/L}$ 处理组 (EC_{50} 均值为 2.86ng/ml) 与 $0\mu\text{mol/L}$ 对照组 (EC_{50} 均值为 3.79ng/ml) 的差异无显著性意义 ($P>0.05$)。

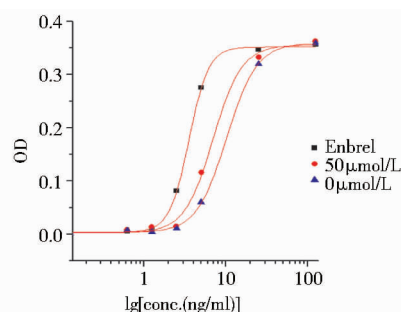


图5 L929 细胞毒作用下的生长曲线

Fig. 5 Growth curve of cytotoxic L929 cell

Effects of purified TNFR-Fc fusion protein inhibited cytotoxicity induced by TNF- α in L929 cell

3 讨论

影响动物细胞高效表达外源蛋白的因素有目的基因(整合位点、拷贝数、筛选标志等)、蛋白质序列、细胞系、细胞培养条件等^[15-16]。其中 Strotbek 等^[17]通过筛选宿主细胞基因组中的 microRNA,把筛选到的 microRNA 通过瞬时转染到宿主细胞,提高 CHO 细胞生产人免疫球蛋白 IgG 的能力。而 Liu 等^[18]通过基因工程重组技术,利用锌指酶特异性识别 DNA 序列的特点设计了锌指酶蛋白结合到重组质粒的启动子上,让工程细胞更高效表达目的蛋白;Fan 等^[19]利用锌指核酸酶技术敲除 CHO 细胞的谷氨酰胺合成酶,在表达载体上含有该酶基因与目的基因,在培养基不添加谷氨酰胺的压力来促进细胞表达外源蛋白。黄芬等^[20]通过在中国仓鼠卵巢细胞中过表达热休克蛋白 70 (HSP-70) 来提高其表达抗体的能力,但并未做提高表达量后抗体的活性检测。总体上看,各方面技术的应用都致力于提高动物细胞表达蛋白的水平。

TNFR-Fc 融合蛋白是糖基化复杂的蛋白质,翻译后修饰不当会引起活性的降低和多聚体的形成。所以,蛋白的质量上做了 HPLC 检测,TNFR-Fc 融合蛋白主要的活性成分为二聚体,即图 4(a) 中的 15min 峰(13min 峰为多聚体,26min 峰为溶剂峰),随着加入 MG-132 浓度的增加,蛋白质的二聚体比例升高。雷云等^[9]以依那西普、注射用 TNFR-Fc 作为对照,检测动物细胞表达 TNFR-Fc 的 EC_{50} 分别为 1.73ng/ml 、 1.79ng/ml 、 1.64ng/ml 。而本实

验,TNFR-Fc 融合蛋白 EC_{50} 为 $2\sim3\text{ng/ml}$,与对照组差异无显著性意义 ($P>0.05$)。

通过在细胞培养过程中添加蛋白酶抑制剂,防止目的蛋白降解来提高表达量的方法尚未见报道。目前,加入蛋白酶抑制剂使大量蛋白质在细胞内累积[图 3(a)],但是,只要能分泌出细胞的蛋白质都具有良好的活性(图 5)。重新利用这些累积的蛋白质是提高表达量的途径之一,降低培养温度使合成速率减缓,利于胞内蛋白质折叠组装分泌。再者,泛素蛋白酶降解途径的分子机制有待进一步阐明,如特异降解 TNFR-Fc 的泛素蛋白 E3 连接酶、TNFR-Fc 泛素化位点。最后,在宿主细胞过表达利于细胞运输蛋白的信号肽,从而提高目的蛋白产量的方法也值得探究。

参考文献

- [1] Birch J R, Racher A J. Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, 58(5-6): 671-685.
- [2] 王志明,高健,李耿. 治疗性单克隆抗体药物的现状及发展趋势. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(6): 117-124.
Wang Z M, Gao J, Li G. The status quo and development trend of the therapeutic monoclonal antibody drugs. *China Biotechnology*, 2013, 33(6): 117-124.
- [3] Aggarwal R S. What's fueling the biotech engine-2012 to 2013. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(1): 32-39.
- [4] Robert F, Bierau H, Rossi M, et al. Degradation of an Fc-fusion recombinant protein by host cell proteases: identification of a CHO Cathepsin-D protease. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(6): 1132-1141.
- [5] Wang Q M, Dai J X, Sun S H. Advance of mechanism and function of ubiquitin system. *Progress in Biotechnology*, 2001, 21(6): 66-69.
- [6] Dorai H, Ganguly S. Mammalian cell-produced therapeutic proteins: heterogeneity derived from protein degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 30C: 198-204.
- [7] Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, et al. Differential inhibition of calpain and proteasome activities by eptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *Journal of Biochemistry*, 1996, 119(3): 572-576.
- [8] Wang Y T, Lei Y, Huang L, et al. Scale-up of procedure for culture of recombinant CHO cells expressing tumor necrosis factor receptor-Fc in rotary shaker and determination of biological activity of expressed product. *Chin J Biologicals*, 2012, (5): 611-614, 622.
- [9] 雷云,谢奎,洪刚,等. 表达人肿瘤坏死因子受体 II-Fc 的 CHO-DG44 细胞的培养温度优化研究. *中国药学杂志*, 2013, 48(2): 90-96.

- Lei Y, Xie K, Hong G, et al. Optimization of the culture temperature of recombinant CHO-DG44 cells expressing tumor necrosis factor receptor-Fc. *Chin Pharm J*, 2013, 48(2):90-96.
- [10] Zhao Z Q, Zhao L L, Sui H Q. Method for separating and removing oligomer in TNFR-Fc fusion protein; China, 201010268403, CN102382190A. 2012-03-21.
- [11] Chen W, Xiong S, Li J, et al. The ubiquitin E3 ligase SCF-FBXO24 recognizes deacetylated nucleoside diphosphate kinase A to enhance its degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 2015, 35(6):1001-1013.
- [12] Zhao J, Wei J, Mialki R K, et al. F-box protein FBXL19-mediated ubiquitination and degradation of the receptor for IL-33 limits pulmonary inflammation. *Nature Immunology*, 2012, 13(7):651-658.
- [13] Rajan R S, Tsumoto K, Tokunaga M, et al. Chemical and pharmacological chaperones: application for recombinant protein production and protein folding diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 2011, 18(1):1-15.
- [14] Rodriguez J, Spearman M, Huzel N, et al. Enhanced production of monomeric interferon- β by CHO cells through the control of culture conditions. *Biotechnology Progress*, 2005, 21(1):22-30.
- [15] Wu H T, Hu Y L, Chen S, et al. The factors influencing the high-level expression of recombinant protein in CHO cells. *China Biotechnology*, 2004, 24(8):1-5.
- [16] Gramer M J. Product quality considerations for mammalian cell culture process development and manufacturing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2014, 139:123-166.
- [17] Strothbek M, Florin L, Koenitzer J, et al. Stable microRNA expression enhances therapeutic antibody productivity of Chinese hamster ovary cells. *Metabolic Engineering*, 2013, 20:157-166.
- [18] Liu P Q, Chan E M, Cost G J, et al. Generation of a triple-gene knockout mammalian cell line using engineered zinc-finger nucleases. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 106(1):97-105.
- [19] Fan L, Kadura I, Krebs L E, et al. Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knockout cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(4):1007-1015.
- [20] 黄芬, 安小平, 李存, 等. 过表达热休克蛋白 70 提高 CHO 细胞表达抗体的能力. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(9):8-13.
Huang F, An X P, Li C, et al. Overexpression of heat shock protein-70 enhances production of antibody in Chinese Hamster Ovary cells. *China Biotechnology*, 2011, 31(9):8-13.

MG-132 Improve the Production of TNFR-Fc Fusion Protein in CHO Cells

WEN Jia-ming¹ NIE Yan-feng^{1,2} LIANG Han-zhang¹ HUANG Wen-xi¹ LEI Yun¹

XIE Qiu-ling¹ PEI Yun-lin² XIONG Sheng¹

(1 College of Pharmacy, Institute of Biomedicine & National Engineering Research Center of Genetic Medicine,

Jinan University, Guangzhou 510632, China)

(2 Guangdong Marubi Biotechnology Company Limited, Guangzhou 510530, China)

Abstract Objective: Try to improve the production and quality of TNFR-Fc fusion protein in CHO cells by inhibiting protein degradation. Methods: The stability and degradation pathways of TNFR-Fc in CHO cells were investigated by measuring the cell density and survival rate with additional lysosome inhibitor (Leupeptin) and ubiquitin-proteasome inhibitor (MG-132), respectively. The qualities of the total and extracellular TNFR-Fc expression were detected by Western blot and ELISA. Extracellular TNRF-Fc was purified by Protein A Affinity Chromatography. The protein purity was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), while the enzyme activity of TNFR-Fc was assessed by measuring the inhibition level toward the cytotoxicity of L929 cell induced by TNF α . Results: TNFR-Fc was determined to be degraded via the ubiquitin-proteasome pathway; Adding 50 μ mol/L MG-132 when cell culture, the production of total TNFR-Fc and dimer TNFR-Fc were improved 42.35% and 28.60%, respectively. Moreover, purified TNFR-Fc exhibited good bioactivity and the EC₅₀ is 2.86ng/ml. Conclusion: MG-132 adding when cell culture may become a competent strategy to improve the recombinant protein production of CHO cells expression system.

Key words MG-132 TNFR-Fc degradation CHO cell Ubiquitination Improve production