

不同启动子和 MAR 组合对重组 CHO 细胞 转基因表达的影响*

李琴¹, 王小引², 赵春澎², 田政伟², 徐丹华², 王天云², 张俊河^{2△}

1. 新乡医学院 分析测试实验室(新乡 453003); 2. 新乡医学院 生物化学与分子生物学教研室(新乡 453003)

【摘要】 目的 分析不同启动子与核基质结合区(MAR)组合对中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中转基因表达的影响。方法 将β-珠蛋白 MAR(*gMAR*)与人巨细胞病毒早期启动子(*CMV-IE*)、猿猴空泡病毒 40(*SV40*)启动子组合,构建两种不同启动子与 *gMAR* 组合的表达载体。转染 CHO 细胞,48 h 后观察增强型绿色荧光蛋白(*eGFP*)的瞬时表达情况;G418 筛选稳定转化的细胞株,流式细胞术分析稳定 CHO 细胞 *eGFP* 基因的表达水平,实时荧光定量 PCR(qPCR)分析 *eGFP* 基因的相对拷贝数。结果 不含 *gMAR* 的表达载体,*CMV-IE* 启动子 *eGFP* 表达明显强于 *SV40* 启动子;*gMAR* 能提高 *CMV-IE* 启动子 *eGFP* 表达水平,但在 *SV40* 启动子中并未表现出提高作用。两侧含 *gMAR* 的表达载体比一侧含有 *gMAR* 的表达载体 *CMV-IE* 启动子 *eGFP* 表达荧光强;G418 加压筛选后,含 *SV40* 启动子的 *gMAR* 表达载体 *eGFP* 基因表达不稳定,荧光逐渐减弱,因此,后期只对稳定表达 *eGFP* 基因的 *CMV-IE* 启动子表达载体进行流式细胞术和 qPCR 分析。流式细胞术检测结果显示,一侧含有与两侧含有 *gMAR* 的 *CMV-IE* 启动子表达载体 *eGFP* 基因表达量比不含 *gMAR* 的表达载体分别提高 9.85 倍和 12.94 倍;qPCR 结果显示,以不含 *gMAR* 的载体的 *eGFP* 基因拷贝数为 1,一侧含有与两侧含有 *gMAR* 的 *CMV-IE* 启动子表达载体 *eGFP* 基因相对拷贝数为 3.68 和 9.25。**结论** *CMV-IE* 启动子活性强于 *SV40* 启动子;*gMAR* 能提高 *CMV-IE* 启动子外源基因的表达水平,其机制可能与增加基因拷贝数相关。

【关键词】 核基质结合区 CMV 启动子 SV40 启动子 CHO 细胞

Effects of Different Promoters and MAR Combinations on Transgene Expression of Recombinant CHO Cells LI Qin¹, WANG Xiao-yin², ZHAO Chun-peng², TIAN Zheng-wei², XU Dan-hua², WANG Tian-yun², ZHANG Jun-he^{2△}. 1. Analysis & Test Laboratory, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China

△ Corresponding author, E-mail: zjh@xxmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To analyze the effects of different promoters and matrix attachment region (MAR) on the expression of transgene in Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Methods** The expression vector was constructed by the combination of beta globin MAR (*gMAR*) with the human cytomegalovirus immediate-early promoter (*CMV-IE*) and simian virus 40 (*SV40*) promoter. These vectors were transfected into CHO cells, after 48 h, the transient expression of enhanced green fluorescent protein (*eGFP*) was observed; G418 was used to screen stably transformed cell lines, and the expression level of *eGFP* in CHO cells was analyzed by flow cytometry. The relative copy numbers of *eGFP* were analyzed by qPCR. **Results** Without *gMAR* expression vector, the expression of *eGFP* which was driven by *CMV-IE* promoter was stronger than that of *SV40* promoter; *gMAR* could increase the expression level of *eGFP* driven by *CMV-IE* promoter, but did not show any enhancement in *SV40* promoter. The expression level of *eGFP* which containing *gMAR* on both sides was stronger than that of *gMAR* on one side driven by *CMV-IE* promoter; After G418 screening, the expression level of *eGFP* containing *gMAR* driven by *SV40* promoter was unstable, the fluorescence gradually weakened, therefore, we only analyzed the expression vector stably expressing the *eGFP* gene driven by *CMV-IE* promoter by flow cytometry and qPCR. Compared with the expression vector without *gMAR* containing *CMV-IE* promoter, flow cytometry showed that the expression levels of *eGFP* on one and both sides with *gMAR* were increased by 9.85-fold and 12.94-fold, respectively; The result of qPCR showed that the copy number of the *eGFP* gene without *gMAR* was set to 1, the copy number of the *eGFP* gene in the expression vector driven by *CMV-IE* with *gMAR* on one side and both sides were 3.68-fold and 9.25-fold, respectively. **Conclusion** The activity of *CMV-IE* promoter is stronger than that of *SV40* promoter. *gMAR*

* 国家自然科学基金(No. U1604193) 资助

△ 通信作者, E-mail: zjh@xxmu.edu.cn

can enhance the expression levels of transgene, which may be related to the increase of gene copy number.

[Key words] Matrix attachment region CMV-IE promoter SV40 promoter CHO cell

随着基因工程技术和大规模动物细胞培养技术的应用和不断发展,中国仓鼠卵巢细胞(CHO)表达系统已经成为生物技术药物最重要的表达或生产系统,并被广泛应用于抗体、重组蛋白药物和疫苗等产品的研发和生产中,接近 70% 的重组蛋白是用 CHO 细胞生产^[1-3]。在细胞长期培养过程中,重组蛋白产率和稳定性会受质粒载体的组分和整合位点的影响^[4-5],可能导致基因拷贝丢失、转录失活、基因沉默等。在表达载体中插入如核基质结合区(MAR)、内部核糖体进入位点(IRES)、遍在染色质开放元件(UCOEs)等顺式作用元件来调控转录活性,能够增加目的基因的表达水平^[6-11]。

MAR 是存在于真核细胞染色质中的一段与核基质特异结合的 DNA 序列。MAR 可以通过边界效应提高转基因表达水平,同时也能降低不同转化株之间的表达水平差异^[12-16]。截止目前,文献已经报道了数个 MAR 片段可以用来提高 CHO 细胞中的转基因表达水平和阳性克隆细胞数^[17-24]。此外, MAR 在提高转基因表达时具有“位置效应”、“叠加效应”及“距离效应”^[16,23-25]。虽然目前 MAR 详细的作用机制尚不清楚,但 MAR 功能或活性会受到载体组分的影响,DNA 序列本身并不能使 MAR 激活,而 MAR 活性可能与它们富含 AT 碱基或组蛋白修饰等阶调控 DNA 形成的特定构象相关^[26]。

启动子是表达载体的重要组成部分。哺乳动物细胞中重组蛋白高水平表达常用的高效启动子有人巨细胞病毒早期启动子(CMV-IE),以及猿猴空泡病毒 40(SV40)启动子^[27-28]。但有报道称启动子本身容易受到干扰,导致长期培养下重组蛋白产率下降或不稳定^[29-33]。为进一步分析不同启动子与 MAR 组合对 CHO 中转基因表达的影响,本研究构建了 SV40 和 CMV-IE 2 种不同启动子与含 β -珠蛋白 MAR(*gMAR*)质粒的表达载体,观察在 CHO 细胞中,不同启动子与 *gMAR* 相互作用对增强型绿色荧光蛋白(eGFP)表达水平和稳定性的影响,这将有助于在设计质粒表达载体时选择适用于稳定高产重组蛋白的有效顺式作用元件。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 连接

酶、dNTP 均购自大连宝生物公司;pIRES-neo2 载体、pCAT[®]3-Control Vector、pEGFP-C1 保存于本实验室,质粒提取和凝胶回收试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司;Lipofectamine[®] 3000 基因转染试剂盒购自 Invitrogen 公司;基因组 DNA 提取试剂盒、1% 青链霉素购自上海碧云天生物公司;DMEM+F12 细胞培养基、胎牛血清、G418 均购自美国 Gibco 公司;CHO 细胞购自北京协和医学院细胞所;其他常规试剂均购自上海生工公司,引物合成也由上海生工公司完成。

1.2 方法

1.2.1 不同启动子含 *gMAR* 载体的构建 基因引物序列见附表。PCR 扩增 *gMAR*[(GenBank No. L22754) 840~2 999 bp 之间的片段]、*eGFP* 报告基因(来源于 pEGFP-C1)和 SV40 启动子(来源于 pCAT[®]3-Control Vector)。以 pIRES-neo2 为基础载体(含 CMV-IE 启动子),*eGFP* 报告基因插入到其多克隆位点得到 pIRES-CMV-IE-*eGFP* 载体;将 SV40 启动子替换 pIRES-CMV-IE-*eGFP* 载体上的 CMV-IE 启动子,构建 pIRES-SV40-*eGFP* 载体;为实现定向克隆,将酶切位点 *Nru* I / *Mlu* I (TCGCGA, ACGCGT), *Xho* I / *Swa* I (CTCGAG, ATTTAAAT) 分别加入到引物的 5' 端(图 1)。将扩增的 *gMAR* 分别克隆到 pIRES-SV40-*eGFP* 和 pIRES-CMV-IE-*eGFP* 载体启动子上游,以及 pIRES-CMV-IE-*eGFP* 载体启动子 polyA 下游,构建表达载体 pIRES-SV40-*eGFP-gMAR*、pIRES-CMV-IE-*eGFP-gMAR*1 和 pIRES-CMV-IE-*eGFP-gMAR*2。

附表 基因引物序列

Table Primer sequences

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Product/ bp
<i>eGFP</i>	P1	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT	717
	P2	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	
SV40 promoter	P3	GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATA	202
	P4	AAGCTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCT	
<i>gMAR</i>	P5	AATATATCTCTGATAAAATGTCTA	2 160
	P6	GGATCCTCCCATTCGGCTCTCTGA	

1.2.2 细胞培养及转染 CHO-S 细胞培养于 DMEM+F12 培养基中,其中含有 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素,在 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞贴壁生长达 90% 时,用 0.25% 胰蛋

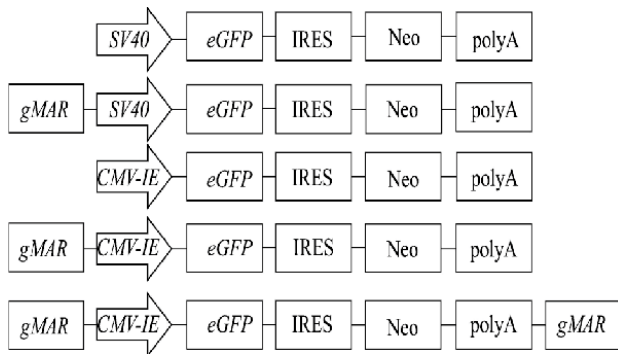


图 1 表达载体示意图

Fig 1 Expression vector of schematic illustration

SV40: Simian virus 40 promoter; CMV-IE: Cytomegalovirus immediate-early promoter; gMAR: Betaglobin MAR; IRES: Internal ribosome entry sites; eGFP: Enhanced green fluorescent protein

白酶消化收集细胞,以 2×10^6 /孔接种于 24 孔板内,次日各表达载体分别进行转染,以不转染表达载体的 CHO-S 细胞为阴性对照, pIRES-CMV-IE-eGFP 和 pIRES-SV40-eGFP 为阳性对照,不同批次的各表达载体分别单独转染 3 次,转染方法按照 Lipofectamine 3000 基因转染试剂盒说明书进行。

1.2.3 瞬时 eGFP 转基因表达水平分析 转染 48 h 后,荧光倒置显微镜观察细胞 eGFP 的表达情况,分析瞬时转染效率。

1.2.4 稳定转染条件下 eGFP 转基因表达水平分析 采用 G418 筛选稳定转化的细胞株。首先选取质量浓度为 $800 \mu\text{g/mL}$ 的 G418 培养液,经过加压筛选 2 周后,待阴性对照细胞全部死亡,改为质量浓度为 $500 \mu\text{g/mL}$ G418 培养液维持培养,待稳定转化的多克隆细胞形成后,转入培养瓶内继续培养,待细胞浓度约 10^6 mL^{-1} 时,收集细胞,流式细胞术检测 eGFP 表达量,以平均荧光强度(MFI)表示,分析稳定细胞 eGFP 表达情况。

1.2.5 稳定转染条件下 eGFP 转基因的相对拷贝数分析 应用实时荧光定量 PCR(qPCR)进行拷贝数分析。分别提取不含 gMAR 及含 gMAR 表达载体转染的 CHO 细胞稳定株的基因组 DNA,以此作为模板,根据 eGFP 基因序列及内参片段甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因序列用 Primer 5.0 设计引物,eGFP 引物:P1: $5'$ -CTACGTCCAGGAGCGC ACCATCT- $3'$; P2: $5'$ -GTTCTTCTGCTTGTCGG CCATGATAT- $3'$; GAPDH 引物:P3: $5'$ -GTCTT TCTTCTGCCGTTCTC- $3'$; P4: $5'$ -ACCAGCCTC

ATTAGGTTTGT- $3'$ 。采用 SYBER Green I 荧光染料法用荧光定量 PCR 仪测定 eGFP 基因的相对拷贝数。PCR 扩增体系设为 $10 \mu\text{L}$,采用 pikorealm 96 实时 PCR 系统(赛默飞世尔科技、美国)配备的 pikoreal 软件 2.2 进行分析。PCR 程序: 95°C 预变性 5 min, 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s,40 个循环,所有样品重复 3 次。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算 eGFP 基因的相对拷贝数,其数值表示目的基因拷贝数相对于内参基因拷贝数的相对倍数。

1.2.6 统计学方法 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瞬时 eGFP 转基因的表达

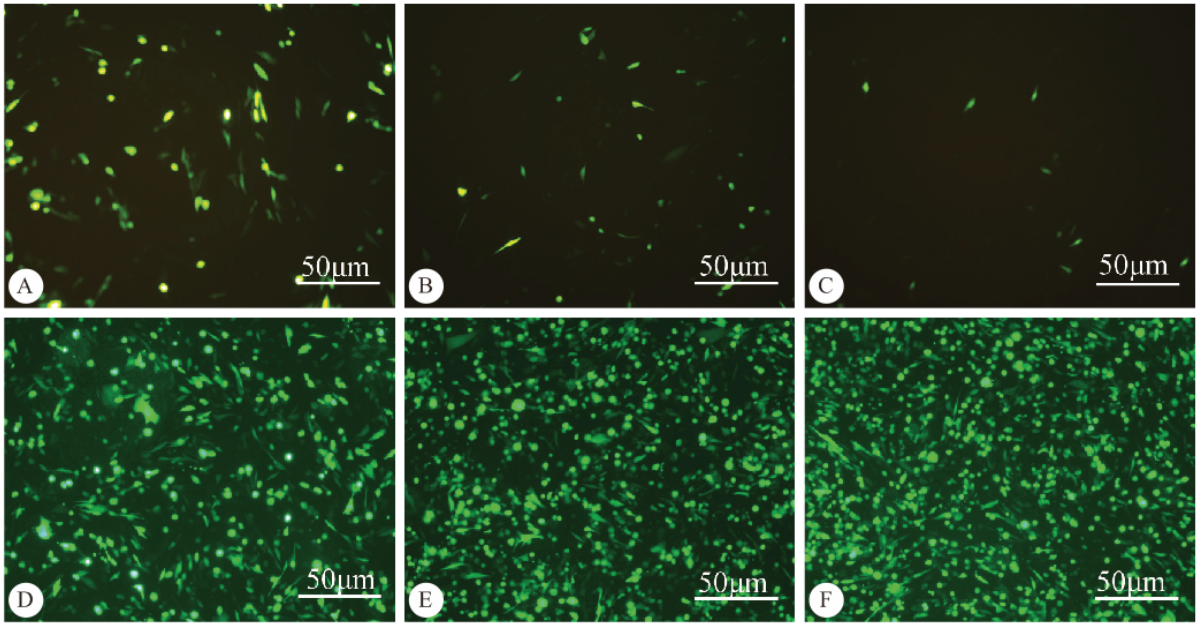
见图 2。转染 CHO 细胞 48 h,可见 SV40 启动子的表达载体(图 2A、2B、2C)中 eGFP 荧光明显弱于含 CMV-IE 启动子的载体(图 2D、2E、2F); gMAR 并不能明显提高 SV40 启动子载体的转染效率和表达水平(图 2B、2C)。在 CMV-IE 启动子载体中两侧含 gMAR 的 eGFP 荧光比一侧含 gMAR 稍强(图 2E、2F)。

2.2 稳定转染条件下 eGFP 转基因的表达

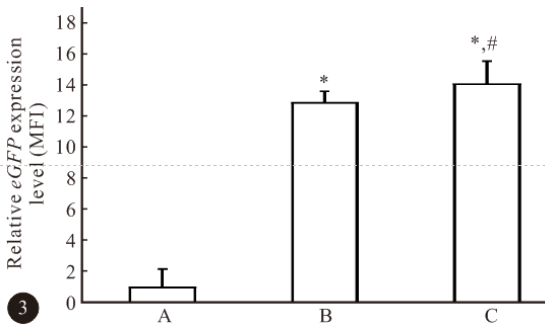
G418($800 \mu\text{g/mL}$)加压筛选后,含 SV40 启动子的 gMAR 表达载体(pIRES-SV40-eGFP-gMAR) eGFP 基因表达不稳定,荧光逐渐减弱(图 2C),因此,后期只对稳定表达 eGFP 基因的 CMV-IE 启动子表达载体(pIRES-CMV-IE-eGFP-gMAR)进行评估。结果显示,含 gMAR 载体(pIRES-CMV-IE-eGFP-gMAR1 和 pIRES-CMV-IE-eGFP-gMAR2)的 eGFP 表达量比不含 gMAR 的表达载体(pIRES-CMV-IE-eGFP)分别平均提高 9.85 倍和 12.94 倍,两侧含 gMAR(pIRES-CMV-IE-eGFP-gMAR2)比一侧含 gMAR 表达载体(pIRES-CMV-IE-eGFP-gMAR1)高 1.29 倍,不同载体转染的细胞 eGFP 含量差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。

2.3 稳定转染条件下 eGFP 转基因的相对拷贝数

qPCR 实验结果显示,将不含 gMAR 的对照载体(pIRES-CMV-IE-eGFP)的基因拷贝数设为 1,则 $5'$ 端含 gMAR 表达载体(pIRES-CMV-IE-eGFP-gMAR1) eGFP 基因相对拷贝数为 3.68,两侧含 gMAR 的表达载体(pIRES-CMV-IE-eGFP-gMAR2)拷贝数为 9.25 ($P < 0.01$),见图 4。

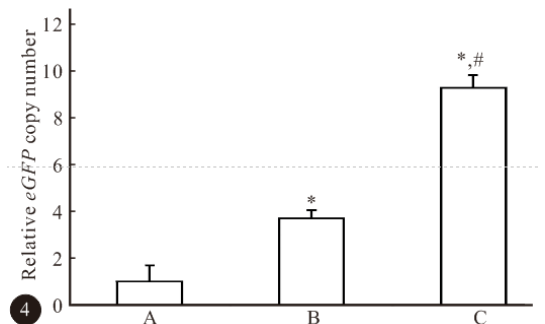
图 2 *eGFP* 基因瞬时表达Fig 2 Transient expression of *eGFP* gene

A; pIRES-SV40-*eGFP* expression vector; B; pIRES-SV40-*eGFP-gMAR* expression vector; C; Fluorescence of pIRES-SV40-*eGFP-gMAR* expression vector after screening 7 d with G418; D; pIRES-CMV-IE-*eGFP* expression vector; E; Expression vector containing one *gMAR* at the 5' site (pIRES-CMV-IE-*eGFP-gMAR*1); F; Expression vector containing two *gMAR* flanking the *eGFP* expression cassette (pIRES-CMV-IE-*eGFP-gMAR*2)

图 3 *eGFP* 基因稳定表达Fig 3 Stable expression of *eGFP* gene

MFI: Median fluorescence intensity; A; pIRES-CMV-IE-*eGFP*; B; pIRES-CMV-IE-*eGFP-gMAR*1; C; pIRES-CMV-IE-*eGFP-gMAR*2.

* $P < 0.01$, vs. pIRES-CMV-IE-*eGFP*; # $P < 0.01$, vs. pIRES-CMV-IE-*eGFP-gMAR*1

图 4 *eGFP* 基因拷贝数分析Fig 4 Analysis of *eGFP* gene copy number

3 讨论

CHO 细胞具有准确的转录后修饰功能,其表达蛋白在分子结构、理化特性以及生物学功能方面更接近于天然蛋白分子,目前已成为生物技术药物最重要的表达或生产系统^[1-2,34]。然而,由于转基因在转染细胞后往往会发生随机整合,经常引起转基因沉默或表达水平低下^[35]。故构建有效的表达载体在哺乳动物细胞高效、稳定表达重组蛋白技术中占据着重要的位置。除感兴趣的基因外,质粒表

达载体的组成部分包括启动子、多聚腺苷酸化信号以及诸如 MAR 的顺式作用元件。

最近的研究发现,人 *gMAR*、 β -干扰素 MAR 及鸡溶菌酶 MAR 等均能促进基因表达^[23,25,36]。有研究表明,MAR 可与核基质结合成环,促使基因上游的调控序列和启动子靠近,驱动环中的 DNA 序列与核基质靠近,从而使启动子与核基质结合的 RNA 聚合酶及转录因子发生相互作用,进一步提高启动子的活力,增强了基因的转录水平^[37]。而利用强的哺乳动物病毒启动子如 SV40 和 CMV 也能

够达到高表达。本研究构建了具有 *CMV-IE* 和 *SV40* 两种启动子的含 *gMAR* 表达载体,分析启动子和 *gMAR* 不同组合对 *eGFP* 基因表达的影响。本研究结果显示,不论是否含有 *gMAR*,在含 *CMV-IE* 启动子的表达载体中的 *eGFP* 基因表达水平和稳定性均高于含 *SV40* 启动子的表达载体,这说明 *MAR* 提高外源基因表达依赖于表达载体中的启动子。

此外,有报道称 *CMV-IE* 启动子强效驱动作用主要归因于它位于 118~524 核苷酸之间的增强子元件,其增强子包含有如核因子 1(NF1)、环磷酸腺苷反应元件结合因子(CREB)、特异性蛋白 1(SP-1)、激活蛋白 1(AP-1)、E 二十六(ETS) 样转录因子 1(ELK-1)等多个转录因子结合位点^[38-40],外源基因高效表达除依赖载体中启动子的强弱外,基因序列、载体类型及所用细胞系等也是影响其表达的重要因素。本研究结果表明,无论在瞬时转染条件下还是在稳定筛选后,含 *gMAR* 元件的表达载体 *eGFP* 基因表达均高于不含 *gMAR* 的表达载体,且 *eGFP* 基因两侧含有 *gMAR* 的表达载体高于一侧含有 *gMAR* 的表达载体;qPCR 结果显示 *eGFP* 基因两侧含有 *gMAR* 的表达载体的拷贝数明显高于一侧含有 *gMAR* 的表达载体。以上结果表明,两侧含有 *gMAR* 的表达载体 *eGFP* 表达水平增高可能与 *eGFP* 拷贝数增多有关。在 *MAR* 提高转基因表达方面,本实验的结果可以为今后选择适宜的启动子提供一定的理论依据。同时我们也分析了转基因高表达的可能机制,为基因工程技术中重组蛋白高水平表达提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] HO SCL, TONG YW, YANG YS. Generation of monoclonal antibody-producing mammalian cell lines. *Pharm Bioprocess*, 2013, 1(1): 71-87.
- [2] WURM FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(11): 1393-1398.
- [3] JAYAPAL KP, WLASCHIN KF, HU WS, *et al.* Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem Eng Prog*, 2007, 103(10): 40-47.
- [4] HO SC, MARIATI, YEO JH, *et al.* Impact of using different promoters and matrix attachment regions on recombinant protein expression level and stability in stably transfected CHO cells. *Mol Biotechnol*, 2015, 57(2): 138-144.
- [5] KIM JY, KIM YG, LEE GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(3): 917-930.
- [6] LAI T, YANG Y, NG SK. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2013, 6(5): 579-603.
- [7] HO SC, BARDOR M, FENG H, *et al.* IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines. *J Biotechnol*, 2012, 157(1): 130-139.
- [8] LEY D, HARRAGHY N, LE FOURN V, *et al.* *MAR* elements and transposons for improved transgene integration and expression. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62784 [2016-10-21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062784>.
- [9] 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. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(1): 94-100.
- [10] ZHANG F, FROST AR, BLUNDELL MP, *et al.* Ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors. *Mol Ther*, 2010, 18(9): 1640-1649.
- [11] ARAKI Y, HAMAFUJI T, NOGUCHI C, *et al.* Efficient recombinant production in mammalian cells using a novel IR/*MAR* gene amplification method. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41787 [2016-10-21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041787>.
- [12] CHANG M, LIU R, JIN Q, *et al.* Scaffold/matrix attachment regions from CHO cell chromosome enhanced the stable transfection efficiency and the expression of transgene in CHO cells. *Biotechnol Appl Biochem*, 2014, 61(5): 510-516.
- [13] LEY D, HARRAGHY N, LE FOURN V, *et al.* *MAR* elements and transposons for improved transgene integration and expression. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62784 [2016-10-21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062784>.
- [14] GRANDJEAN M, GIROD PA, CALABRESE D, *et al.* High-level transgene expression by homologous recombination-mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(15): e104 [2016-10-21]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr436>.
- [15] SJEKLOCHA L, CHEN Y, DALY MC, *et al.* β -globin matrix attachment region improves stable genomic expression of the Sleeping Beauty transposon. *J Cell Biochem*, 2011, 112(9): 2361-2375.
- [16] WANG TY, ZHANG JH, JING CQ, *et al.* Positional effects of the matrix attachment region on transgene expression in stably transfected CHO cells. *Cell Biol Int*, 2010, 34(2): 141-145.
- [17] YU J, BOCK JH, SLIGHTOM JL, *et al.* A 5' beta-globin matrix-attachment region and the polyoma enhancer together confer position-independent transcription. *Gene*, 1994, 139(2): 139-145.

- [18] GIROD PA, NGUYEN DQ, CALABRESE D, *et al.* Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells. *Nat Methods*, 2007, 4(9):747-753.
- [19] WILLIAMS S, MUSTOE T, MULCAHY T, *et al.* CpG-island fragments from the HNRPA2B1/CBX3 genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells. *BMC Biotechnol*, 2005, 5: 17 [2016-10-21]. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-17>.
- [20] KIM JM, KIM JS, PARK DH, *et al.* Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions. *J Biotechnol*, 2004, 107(2):95-105.
- [21] DHANASEKHARAN K, BERDUGO-DAVIS C, LIU X, *et al.* Rapid development and scale-up through strategic partnership: case study of an integrated approach to cell line and process development for therapeutic antibodies. *Bioprocess Int*, 2014, 12(6):38-41.
- [22] SHIMIZU N, MIURA Y, SAKAMOTO Y, *et al.* Plasmids with a mammalian replication origin and a matrix attachment region initiate the event similar to gene amplification. *Cancer Res*, 2001, 61(19):6987-6990.
- [23] ZHANG JH, WANG XY, WANG TY, *et al.* Distance effect of matrix attachment regions on transgene expression in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(10):1937-1943.
- [24] KIM JD, YOON Y, HWANG HY, *et al.* Efficient selection of stable chinese hamster ovary (CHO) cell lines for expression of recombinant proteins by using human interferon beta SAR element. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(3):933-937.
- [25] WANG F, WANG TY, TANG YY, *et al.* Different matrix attachment regions flanking a transgene effectively enhance gene expression in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *Gene*, 2012, 500(1):59-62.
- [26] HARRAGHY N, CALABRESE D, FISCH I, *et al.* Epigenetic regulatory elements: recent advances in understanding their mode of action and use for recombinant protein production in mammalian cells. *Biotechnol J*, 2015, 10(7):967-978.
- [27] RITA COSTA A, ELISA RODRIGUES M, HENRIQUES M, *et al.* Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 74(2):127-138.
- [28] MORITZ B, BECKER PB, GÖPFERT U. CMV promoter mutants with a reduced propensity to productivity loss in CHO cells. *Sci Rep*, 2015, 5:16952 [2016-10-21]. <https://www.nature.com/articles/srep16952>. doi: 10.1038/srep16952.
- [29] PAREDES V, PARK JS, JEONG Y, *et al.* Unstable expression of recombinant antibody during long-term culture of CHO cells is accompanied by histone H3 hypoacetylation. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(7):987-993.
- [30] DORAI H, CORISDEO S, ELLIS D, *et al.* Early prediction of instability of chinese hamster ovary cell lines expressing recombinant antibodies and antibody-fusion proteins. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(4):1016-1030.
- [31] HE L, WINTERROWD C, KADURA I, *et al.* Transgene copy number distribution profiles in recombinant CHO cell lines revealed by single cell analyses. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(7):1713-1722.
- [32] KIM M, O'CALLAGHAN PM, DROMS KA, *et al.* A mechanistic understanding of production instability in CHO cell lines expressing recombinant monoclonal antibodies. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(10):2434-2446.
- [33] OSTERLEHNER A, SIMMETH S, GÖPFERT U. Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(11):2670-2681.
- [34] KIM JY, KIM YG, LEE GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(3):917-930.
- [35] CHUSAINOW J, YANG YS, YEO JH, *et al.* A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(4):1182-1196.
- [36] GIROD PA, ZAHN-ZABAL M, MERMOD N. Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 91(1):1-11.
- [37] SUN QL, ZHAO CP, CHEN SN, *et al.* Molecular characterization of a human matrix attachment region that improves transgene expression in CHO cells. *Gene*, 2016, 582(2):168-172.
- [38] NILLER HH, HENNIGHAUSEN L. Formation of several specific nucleoprotein complexes on the human cytomegalovirus immediate early enhancer. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(13):3715-3721.
- [39] RIDEG K, HIRKA G, PRAKASH K, *et al.* DNA-binding proteins that interact with the 19-base pair (CRE-like) element from the HCMV major immediate early promoter in differentiating human embryonal carcinoma cells. *Differentiation*, 1994, 56(1/2):119-129.
- [40] LUU P, FLORES O. Binding of SP1 to the immediate-early protein-responsive element of the human cytomegalovirus DNA polymerase promoter. *J Virol*, 1997, 71(9):6683-6691.

(2017-06-10 收稿, 2017-10-15 修回)

编辑 沈进