

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Magdalena Horvat

6537/BT

**PROIZVODNJA REKOMBINANTNOG PROTEINA U SUSPENZIJSKOJ CHO
STANIČNOJ LINIJI**

Završni rad

MODUL: Tehnologija vitamina i hormona

MENTOR: doc.dr.sc. Igor Slivac

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc.dr.sc. Igora
Slivca.

Zahvaljujem svom mentoru doc.dr.sc. Igoru Slivcu na vodstvu, razumijevanju, strpljenju i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i strpljenju tokom školovanja.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

PROIZVODNJA REKOMBINANTNOG PROTEINA U SUSPENZIJSKOJ CHO LINIJI

Magdalena Horvat, 6537/BT

Sažetak: CHO stanična linija pogodna je za korištenje u tehnologiji stanica jer se može genetički modificirati i može proizvoditi rekombinantne proteine u svrhu istraživanja te se uzgajati u suspenziji. Cilj ovog rada je bio ispitati učinak različitih sastava medija na rast stanične linije, utrošak glukoze te proizvodnja proteina. U ovom radu ispitan je rast suspenzijske CHO stanične linije u mediju s 5 % seruma te 1% seruma te 4% sojinog hidrolizat. Najveću specifičnu brzinu rasta pokazao je medij s 1% seruma i 4% sojinog hidrolizata te je u tom uzorku zabilježena najveća potrošnja glukoze od 17,372 mM.

Ključne riječi: CHO (Chinese Hamster Ovary) stanična linija, hidrolizat soje, vijabilnost stanica

Rad sadrži: 22 stranice, 4 slika, 3 tablice, 10 literarnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i električnom obliku (pdf format) pohranjen u: Knjižnici
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Igor Slivac

Rad predan: rujna, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering

Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN SUSPENSIVE CHO CELL LINE

Abstract: CHO cell line is suitable for use in cell culture technology due to its genetic modification that made them immortalized and suitable for production of recombinant proteins for research and therapeutic purposes. The cell line grows as either adherent or suspension culture. The aim of this research was to examine the effect of different medium components on the growth of cell lines, the consumption of glucose and on the protein production. In this research was examined growth of suspension of CHO cell line in medium containing 5% of serum and second suspension containing 4% of soy hydrolyzate and 1% of serum respectively. The maximum specific growth speed occurred in medium containing 1% of serum and 4% of soy hydrolyzate but the same medium also showed highest glucose consumption rate of 17,372 mM.

Keywords: CHO (*Chinese Hamster Ovary*) cell line, soy hydrolysate, cell viability

Thesis contains: 22 pages, 4 figures, 3 tables, 10 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ph. D. Igor Slivac

Thesis delivered: September, 2016.

SADRŽAJ

7. LITERATURA	22
---------------------	----

Kultura životinjskih stanica je uzgoj stanica koje su izolirane iz tkiva životinja u umjetnom hranjivom mediju. Tako se može dobiti homogena populacija, tj. klonovi koji se uzgajaju u kontroliranim uvjetima. Naime, uspostavljene su kulture stanica koje relativno jednostavno i neograničeno rastu u suspenziji što je omogućilo uzgoj u većem volumenu, odnosno u bioreaktorima koji su već bili poznati iz bakterijskog uzgoja. Genetičkim inženjerstvom, tj. upotrebom tehnologije rekombinantne DNA moguće je proizvesti široku paletu proizvoda pomoću kultura životinjskih stanica što uključuje monoklonska protutijela i glikolizirane proteine.

Stanične linije podrazumijevaju kulturu koja se sastoji od stanica originalno prisutnih u primarnoj kulturi. Obzirom na životni vijek razlikujemo konačne (netransformirane) i kontinuirane (transformirane) stanične linije (Nema i Khare, 2012.). Konačne stanične linije karakterizirane su ograničenim brojem generacija (20-80), a karakteristike kontinuirane stanične linije su uspješna proliferacija, smanjena potreba za serumom, brži rast, promijenjena morfologija stanica (Freshney, 2000.).

Stanična linija CHO (Chinese Hamster Ovary) jedna je od najčešće korištenih staničnih linija u istraživanjima i proizvodnji. To su epitelne stanice koje prekrivaju organe i šupljine, rastu kao pojedinačne stanice tvoreći monosloj i karakterističnu strukturu i relativno se lako održavaju u kulturi. CHO stanična linija je tumorska stanična linija i može se neograničeno umnažati sve dok su joj osigurane potrebne hranjive tvari i uvjeti uzgoja.

Rast CHO stanične linije u ovom radu praćeni je u dvjema suspenzijama. Prva je sadržavala medij s: 5% fetaknog goveđeg seruma (FBS), a druga: 1% FBS, i 4% SH sojin hidrolizat (SH). Dodatak seruma za uzgoj ima nedostatke, npr. mogućnost kontaminacije virusima, varijacije u šaržama te visoka cijena ukupnog medija u kojem je dodan serum.

Cilj ovog rada bio je ispitati rast stanične linije CHO u različitim koncentracijama seruma, utrošak glukoze u mediju za uzgoj te mogućnost zamjene seruma hidrolizatom soje.

TEORIJSKI DIO

2.1. Kultura životinjskih stanica

Kulturu životinjskih stanica opisuje laboratorijska tehnika *in vitro* uzgoja stanica koje su izolirane iz različitih životinjskih tkiva. Metoda je razvijena u cilju istraživanja ponašanja životinjskih stanica. Najveći uspon u razvoju ova metoda je doživjela sredinom 20.stoljeća, a započinje 1880.godine kada je Wilhem Roux održavao pileće embrije u otopini soli.

Koncept kulture zasniva se na tome da se najprije stanice izoliraju direktno iz životinjskog tkiva ili organa te se mehanički usitne ili se stanica razgradi proteolitičkim enzimima. Nakon toga slijedi izolacija određenih stanica od ostatka tkiva te se uspostavlja primarna kultura. Stanice zahtjevaju čvrstu podlogu (npr. Petrijeve zdjelice) za prihvaćanje prije nego dođe do njihovog rasta. Stanice koje se koriste mogu biti epitelne, limfoblastne ili fibroblastne. One će se umnažati sve dok ne potroše nutrijente potrebne za rast ili im prostor u kojem rastu postane premalen.

Stanične linije dobivaju se iz primarnih ili sekundarnih kultura. Primarnu kulturu čine pripravljene stanice iz tkiva, precjepljivanjem dobiva se sekundarna stanična kultura, a daljnjim precjepljivanjem stanična linija ulazi u fazu odumiranja. Takve stanice zovemo konačnom ili smrtnom staničnom linijom, a da bi dobili kontinuiranu ili besmrtnu staničnu liniju trebamo provesti postupak imortalizacije.

Stanične linije koje se koriste u tehnologiji životinjskih stanica mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine: adherentne stanice, tj.stanice koje rastu jedino ako su pričvršćene za površinu, i suspenzijske stanice koje mogu rasti neovisno o površini.

2.1.1. Mediji za uzgoj životinjskih stanica

Mediji za uzgoj životinjskih stanica su kompleksne smjese ugljikohidrata, aminokiselina, soli, vitamina, hormona i faktora rasta, a za *in vitro* uzgoj životinjskih stanica kroz duži vremenski period, medij se mora dopuniti različitim sastojcima (Butler, 2004.).

Serum životinjskog ili humanog porijekla uobičajen je dodatak za tu svrhu. Najčešće se koristi FBS, supernatant zaostao nakon koagulacije proteina krvi fetusa goveda. To je

složena smjesa velikog broja sastojaka – faktora rasta, proteina, vitamina, elemenata u tragovima, hormona itd., esencijalnih za rast i održanje stanica u kulturi koji se u medij za uzgoj dodaje u rasponu 5-20% (v/v) (van der Valk i sur., 2010.). Serum je ujedno i najskuplja komponenta medija za uzgoj životinjskih stanica, a obzirom na svoj izvor postoji mogućnost od prijenosa bakterija, virusa i priona kao i određenih razlika u sastavu koje ovise o seriji proizvodnje. Razlika u kemijskom sastavu između šarži seruma, mogućnosti njegove kontaminacije te kemijska nedefiniranost njegove su glavne mane. Poteškoće pri pročišćavanju i izdvajanju proizvoda predstavljaju proteini prisutni u serumu (Butler, 2004.)

Kako bi se prevladali nedostaci uporabe seruma tzv. *serum-free* mediji (SFM) kojima se u čistom obliku dodaju hormoni, faktori rasta i ostale komponente sadržane u serumu. Međutim, SFM su općenito specifičniji nego mediji sa serumom pa ih je stoga potrebno razvijati za određene tipove stanica i primjene (Butler, 2004.). Također, uzgoj stanica u mediju sa smanjenim udjelom seruma ili SFM mediju predstavlja značajan iskorak u smanjivanju troškova procesa s kulturama stanicama odnosno utječe na povećanje sigurnosti proizvoda dobivenih ovom tehnologijom (van der Valk i sur., 2010.). Nedostatak uporabe medija bez seruma uključuje sporiju proliferaciju stanica, nižu maksimalnu koncentraciju stanica te visoku cijenu potrebnih dodataka te ograničen vijek trajanja.

Najčešće korišteni mediji za uzgoj životinjskih stanica su: BME (*Basal Medium Eagle's*), zatim EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) oblikovan kao poboljšanje BME, DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) i GMEM (*Glasgow's Modification of Eagles's Medium*).

2.1.2. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica

Vrlo je bitno uskladiti uvjete uzgoja životinjskih stanica jer moraju zamijeniti *in vivo* uvjete kako bi stanice rasle u što prirodnijem okolišu. Uvjetu uzgoja uključuju manipulaciju fizikalno kemijskih parametara kao što su:

- pH

Optimalan pH za većinu životinjskih staničnih linija je 7,4. Ipak, neke transformirane stanične linije pokazale su bolji rast kod malo kiselijeg okoliša (7,0-7,4), a neke stanice fibroblasta

rastu bolje u bazičnijem okolišu (pH 7,4-7,7). Stanične linije insekata kao što su Sf9 i Sf21 rastu kod pH 6,1.

- CO₂

Regulacija CO₂ bitna je zbog toga jer pH vrijednost ovisi o njemu, točnije, pH vrijednost medija ovisi o ravnoteži između otopljenog ugljičnog dioksida i bikarbonata. Većina znanstvenika upotrebljava 5-7% CO₂, a postiže se uzgojem u inkubatoru. Svaki medij ima preporučenu koncentraciju ugljičnog dioksida i bikarbonata kako bi se održao pH i osmolarnost.

- Temperatura

Optimalna temperatura stanične linije ovisi o temperaturi tijela domaćina iz kojeg su izolirane stanice. Povišenje temperature iznad optimalne opasnije je staničnu liniju nego snižavanje. Zbog toga je temperatura u inkubatoru namještena na malo nižu vrijednost od optimalne temperature. Optimalna temperatura za uzgoj humanih staničnih linija i staničnih linija sisavaca je 36-37°C. Stanične linije koje potječu od hladnokrvnih životinja (npr. ribe) podnose temperature 15-26°C. Odstupanja od optimalnih vrijednosti ne smiju biti veća od ±0,5°C.

- Osmotski pritisak

Uzgoj životinjskih stanica optimalan je pri 260-320 mOsm/kg. Kad se osmolarnost uspostavi važno ju je održavati u rasponu od ±10 % od te vrijednosti.

- Viskoznost

Kod sustava s miješanjem stanica ovaj parametar ima bitnu ulogu, ali nema utjecaj na rast stanica u kulturi. Na viskoznost kompletnog medija uglavnom utječu sastojci seruma.

2.2. Hidrolizati proteina kao dodatak medijima za uzgoj životinjskih stanica

Za proizvodnju hidrolizata manjih molekularnih masa najpogodnija je enzimska hidroliza. Postojanost fizikalno-kemijskih i nutritivnih karakteristika komercijalnih proteinskih hidrolizata znatno ovisi o izboru prikladnog proteina, proteolitičkih enzima te

primjenjenih posthidrolitičkih metoda. Najvažniji kriterij u odabiru supstrata su njihova hranjiva vrijednost, cijena, antigenost, topivost i funkcionalnost. U tom smislu se najčešće koriste kazein, proteini sirutke i soje. Biljni proteini (npr. soja i dr.), prikladan su supstrat za proizvodnju hidrolizata s poželjnim fizikalno-kemijskim i nutritivnim karakteristikama. Odabir prikladne kombinacije enzima presudan je čimbenik kojim se, u osnovi, može osigurati željeni profil hidrolitičkih produkata iz bilo kojeg proteinskog supstrata.

Kvaliteta hidrolizata proteina ovisi o početnoj sirovini, hidrolizirajućem sredstvu, parametrima procesa te stupnju hidrolize (omjer amino dušika i ukupnog dušika) (Lobo-Alfonso i sur., 2010.).

Uporaba hidrolizata proteina u mediju bez seruma ima svoje prednosti i nedostatke. Neke od prednosti su:

- Proizvodne prednosti – hidrolizati proteina proizvode se u velikim mjerilima, relativno su stabilni i mogu se skladištiti pod posebnim uvjetima.
- Regulatorne prednosti- upotrebljavanjem hidrolizata porijeklom od biljaka moguće je izbjeći kontaminacije do koje može doći ukoliko se upotrebljavaju hidrolizati životinjskog podrijetla.

Neki od nedostataka su:

- Problem nabave – izvori su limitirani, a proces proizvodnje nije isplativ.
- Nedostatak biokemijski definiranog sastava – teži se ujednačenom biokemijskom sastavu jer on uvelike utječe na prinos produkta, a nedostatak kemijske definicije može otežati proces pročišćavanja i izolacije proizvoda.

2.2.1. Hidrolizati soje

Soja (lat. *Glycinemax*) se od davnina koristi za liječenje i prevenciju raznih zdravstvenih problema. Soja je dio ljudske prehrane više od 5000 godina, a sojini proizvodi često se koriste u prehrambenoj industriji, pogotovo za teksturiranje i emulgiranje proizvoda te u obliku proteinskih punila. To je suptropska biljka podrijetlom iz jugoistočne Azije koja pripada porodici *Fabaceae*. U Europu je donesena oko 1700. godine, a u velikim razmjerima soja se počela proizvoditi 1800. godine u SAD-u.

Osim visokog udjela proteina (37-50%) sadrži i minerale (npr. soli kalcija, kalija, fosfora, željeza), vitamine (npr. tiamin, riboflavin, folnu kiselinu, pantotensku kiselinu, niacin, vitamin B6, C, E, D i K) vlakna, esencijalne masne kiseline (npr. omega-3 masne kiseline), fitoestrogene poput izoflavona (npr. genistein, daidzein, glicitein) itd. Sojini proteini su visoko kvalitetna hrana jer su odlično izbalansirani po sastavu aminokiselina i kao takvi se lako metaboliziraju.

Hidrolizat soje danas se uvelike koristi kao dodatak mediju bez seruma jer ima ulogu poboljšanja vijabilnosti stanične gustoće, titara rekombinantnih proteina, povećanja dugovječnosti kulture te redukcije apoptoze. (Hartshorn i sur., 2010.).

2.2.2. Gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Pod pojmom elektroforeza označavamo gibanje čestica u električnom polju, a njihova pokretljivost ovisi o: jakosti električnog polja, svojstvima čestica (neto naboju, veličini, obliku), sredini u kojoj se čestice gibaju (ionska jakost, viskoznost, temperatura). Većina čestica koje elektroforetski razdvajamo, pa tako i proteini, amfoterne su molekule. Najveći dio naboja proteina potječe od ionizacije karboksilnih i amino skupina.

Elektroforetska pokretljivost proteina ovisi o gustoći njihovog naboja, tj. o omjeru naboja i mase. Što je ovaj omjer viši, pokretljivost je veća. Primijeni li se električno polje na otopinu proteina, različite će se molekule, ovisno o gustoći svojeg naboja, gibati različitim brzinama prema anodi ili katodi. Ukoliko je uzorak na početku prisutan kao vrlo uska zona, proteini različite pokretljivosti putovat će kao zasebne zone i razdvojit će se. Ovakav pristup poznat je kao zonalna elektroforeza. Elektroforetski razdvojene čestice u slobodnoj se tekućini, zbog difuzije, opet izmiješaju čim prestane djelovanje električnog polja. Stoga se koriste nosači koji omogućuju da razdvojene komponente ostanu u oštro odvojenim zonama. Najčešće rabljeni nosači su papir, škrob, celuloza acetat, agaroz i akrilamid. Bez obzira koji koristimo, važno je da bude inertan, čime se sprječava pojava elektroosmoze koja smanjuje kvalitetu razdvojenosti pruga. Agarozni gelovi najviše se primjenjuju u analizi nukleinskih kiselina, no često se upotrebljavaju i za izoelektrično fokusiranje proteina. Poliakrilamidni gel nastaje vinilnom polimerizacijom monomera akrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) u duge lance poliakrilamida, te njihovim unakrsnim povezivanjem (cross linking) ugradnjom odgovarajućeg ko-monomera N, N'-metilen-bis-akrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$

CH=CH₂). Reakcija polimerizacije katalizirana je kemijski dodatkom amonij persulfata i TEMED-a (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin), ili fotokemijski, dodatkom riboflavina i TEMED-a. U polimerizacijskoj reakciji nastaju lanci poliakrilamida u koje se u malom postotku ugrađuju molekule Bis-a koje onda reagiraju s grupama drugih lanaca, te tvore trodimenzionalnu mrežu.

Polkiakrilamidni gelovi služe u razdvajanju molekula molekularne mase 1000-200000 Da. U vertikalnom sustavu za elektroforezu proteini putuju kroz gel od vrha do dna kroz pločasti gel određene debljine, koji je lijevan između dvije ploče od stakla ili pleksiglasa odvojenih razmaknicama kojima je definirana debljina gela, a koja se kreće od 0,5 do 1,5 mm. Gelovi imaju utore za nanošenje uzoraka na vrhu gela, a oblikuju se tijekom polimerizacije pomoću češlja koji se uklanja po završetku polimerizacije. Gelovi se najčešće sastoje od od 2 dijela: gela za sabijanje tj. kratkog gela većih pora kojemu je svrha sabijanje molekula proteina u oštru zonu debljine 1-100 μm, te gela za razdjeljivanje manjih pora u kojemu se provodi razdjeljivanje proteina. Polimerizirani gel između dvije staklene ploče donjim dijelom se uranja u donji rezervoar s puferom, a dio prostora iznad utora za nanošenje uzorka ispuni se puferom što čini gornji rezervoar za pufer. U utore se potom nanese otprilike 30 μL uzorka, aparatura se spoji sa izvorom struje te se molekule razdjeljuju, određeno vrijeme, pri definiranim uvjetima jakosti struje, napona i snage. Proces razdjeljivanja se zaustavlja kada bromfenol plavo boja dostigne anodni kraj gela. Proteinske trake se potom detektiraju specifičnim ili nespecifičnim bojanjem.

SDS-PAGE ili poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu Na-dodecil sulfata se koristi za razdvajanje proteina na osnovi molekularne mase. Metoda se temelji na obradi proteina otopinom anionskog detergenta natrij dodecil sulfata. SDS se svojim hidrofobnim grupama veže na hidrofobne grupe proteinskih molekula, izaziva denaturaciju i razmotavanje molekula koje tada nose negativan naboj koji potječe od SDS-a. Tada svi proteini imaju jednak omjer mase i naboja, te putuju kroz gel razdvajajući se samo obzirom na molekularnu masu. Manje molekule putuju brže od većih i u gelu dolazi do raspoređivanja u oštre proteinske vrpce.

EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Stanična linija CHO

CHO stanična linija uspostavljena je 1957. iz ovarija odrasle ženke kineskog hrčka. Preporučeni medij za uzgoj CHO-K1 stanica je Ham-ovF-12 medij. Optimalna temperatura za uzgoj je 37°C te atmosfera koju čini 95% zraka i 5% CO₂. Zahvaljujući brzom rastu stanica i dobroj stabilnosti, CHO stanice su najčešće korištene stanice sisavaca za industrijsku proizvodnju rekombinantnih proteina.

Uzgoj stanične linije zahtjeva strogo kontrolirane i sterilne uvjete. Izvori kontaminacija mogu biti: bakterije, mikoplazme, kvasci i gljivice, a prenose se atmosferom, preko radne površine ili osobljem. Zbog toga je potrebno osigurati sterilne uvjete radom u laminaru. Radne površine i preparati se održavaju čistima pomoću 70 %-tnog etanola. Rad s kulturama stanica zahtjeva dobro definiran medij. Kompletan medij sadrži sve potrebne komponente poput vitamina, aminokiselina, soli, glukoze i masnih kiselina. Za optimalan rast stanica nužan je dodatak seruma koji sadrži proteine, hormone, minerale, lipide, faktore rasta, adhezijske faktore, inhibitore enzima i hranjive sastojke. Najčešće se upotrebljavaju fetalni goveđi, teleći i konjski serum, a dodaju se u količini 5-20 % (najčešće 10 %) kao važne nadopune za hormonalni, hranidbeni i stromalni sustav *in vivo* organizma. Potrebe na kisiku su različite za različite kulture. Za većinu stanica je prihvatljiv atmosferski kisik odnosno niske koncentracije kisika (atmosfera: 95 % zraka i 5 % CO₂). pH podloga je izrazito važan faktor budući da većina stanica počne gubiti vijabilnost pri padu pH vrijednosti. Promjena pH se jednostavno uočava zbog promijene boje medija iz crvene u žutu. Zbog toga je za optimalan rast stanica potrebno periodično mijenjati medij.

3.1.2. Kemikalije

U radu su korištene slijedeće kemikalije:

Dulbecco's MEM/F-12, GIBCO, SAD

Fetal Bovine Serum (FBS- fetalni goveđi serum), GIBCO, SAD

0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD

Hidrolizat soje UF Solution 50x, SAFC Biosciences, Andover, UK

Glukoza-PAP kolorimetrijski test, Dijagnostika, Sisak, Hrvatska

apsolutni etanol i izopropanol, Alkaloid, Skoplje

Coomassie Blue G250, Bio-rad Laboratories, UK

N,N,N,N-Tetramethylethylenediamin, SigmaAldrich

amonijev persulfat, Triton X-100, β -merkaptoetanol i Na- dodecilsulfat (SDS) – Fluka (Buchs, Švicarska)

3.1.3. Otopine i puferi

Dulbecco's MEM/F12 (GIBCO) – medij za kultivaciju stanica

Sastojci s koncentracijama (mg/L)

Aminokiseline:

Glicin 18,75

L-Alanin 4,45

L-Arginin hidroklorid 147,5

L-Asparagin \times H₂O 7,5

L-Asparaginska kiselina 6,65

L-Cistein hidroklorid \times H₂O 17,56

L-Cistein 2HCl 31,29

L-Glutaminska kiselina 7,35

L-Glutamin 365

L-Histidin hidroklorid \times H₂O 31,48

L-Izoleucin 54,47

L-Leucin 59,05

L-Lizin hidroklorid 91,35

L-Metionin 17,24

L-Fenilalanin 35,48

L-Prolin 17,25

L-Serin 26,25

L-Treonin 53,45

L-Triptofan 9,02

L-Tirozin 55,79

L-Valin 25,85

Vitamini:

Biotin 0,0035

Kolin klorid 8,98

D-Ca pantotenska kiselina 2,24

Folna kiselina 2,65

Niacinamid (nikotinamid) 2,02

Piridoksin hidroklorid 2,0

Riboflavin 0,219

Tiamin hidroklorid 2,17

Vitamin B12 0,68

I-inozitol 12,61

Anorganske soli:

CaCl_2 116,6

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0013

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ 0,05

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,417

MgCl₂ × 6H₂O 61

MgSO₄ × 7H₂O 100

KCl 311,8

NaHCO₃ 1200

NaCl 6995,5

Na₂HPO₄ × 7H₂O 134

NaH₂PO₄ × H₂O 62,5

ZnSO₄ × 7H₂O 0,432

Ostali sastojci:

D-Glukoza 3151

HEPES 3075,4

Hipoksantin Na 2,39

Linolna kiselina 0,042

Lipoična kiselina 0,105

fenol crvenilo 8,1

Putrescin 2HCl 0,081

Na piruvat 55,0

Timidin 0,365

PBS (Phosphate Buffer Saline) pufer pH=7,4

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na₂HPO₄ 1,44 g

KH₂PO₄ 0,24 g

destilirana H₂O do 1000 mL

0,4 %-tna otopina Trypan Blue

Trypan Blue 25 mg

PBS pufer 5 mL

3.1.4 Uređaji i oprema

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija

Ploče s 12 jažica, Corning, SAD

T-boce od 25 cm², Corning, SAD

Spektrofotometar Thermo Scientific Genesys 10 S UV/VIS, SAD

Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, pipete, nastavci za pipete)

Kadica za gel elektroforezu

Centrifuga; Centric 322A, Tehnica Železniki, Slovenija

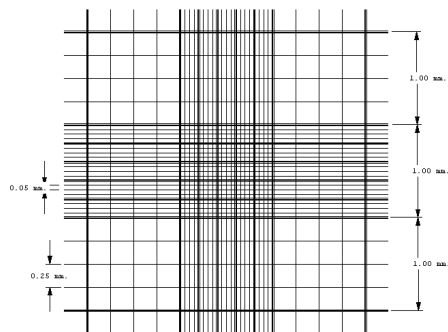
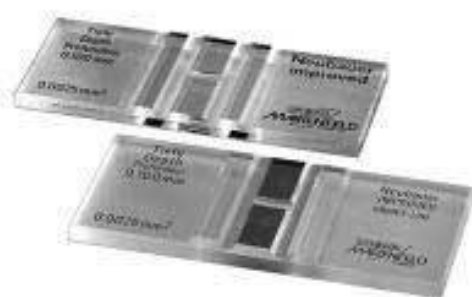
Vibracijska mješalica; Tehnica Železniki, Slovenija

3.2. Metode rada

3.2.1. Kultivacija CHO-K1 stanica

Uzgoj započinje odmrzavanjem stanica koje se čuvaju zamrznute na -80 °C u mediju za zamrzavanje. Ampula sa stanicama (1mL) koje su zamrznute u koncentraciji od oko 1×10^7 stanica/mL odmrzne se naglim uranjanjem u vodenu kupelj, na 37 °C. Supernatant se pažljivo ukloni pipetom, a talog stanica se resuspendira u mediju za uzgoj koji sadrži:

1.suspenzija - 5% FBS, a 2.suspenzija - 1% FBS + 4% SH. Stanice se u inkubator na odgovarajuću temperaturu uz atmosferu s 95% zraka i 5% CO₂. Tijekom uzgoja se također prati i boja medija, jer nagla promjena boje često ukazuje na pojavu kontaminacije u kulturi.



Slika 1. Neubaureova komorica i shematski prikaz mrežice u kojoj se određuje broj stanica

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan – plavo

CHO stanice rastu u suspenziji pri različitim koncentracijama seruma (FBS) i sojinog hidrolizata (SH). Jedan medij je imao 5 % FBS, a drugi je imao 1% FBS i 4% SH te se pratila dinamika rasta stanica kroz 3 dana, metodom tripan-plavo. Osim ispitivanja utjecaja koncentracije seruma(1%, 5%) na rast CHO stanica, ispitivali smo i utjecaj dodatka sojinog hidrolizata (0% ili 4%) u DME mediju.

Za određivanje broja stanica koristi se metoda bojanja otopinom tripan-plavo. Obojat će se samo mrtve stanice, čija je membrane propusna. Za brojanje se koristi Neubaureova komorica.

3.2.3. Određivanje broja stanica u Neubauerovoj komorici

Postupak:

1. suspenzije iz inkubatora prenijeti u laminar
2. iz svake od dvije tikvice pipetom uzeti po 200 μ L i prenijeti u 2 Eppendorf kivete
3. centrifugirati na 1000 okretaja/minuti tijekom 5 minuta; supernatante izdvojiti pipetom i zamrznuti ih (za određivanje sadržaja glukoze); talog baciti
3. izdvojiti još 200 μ L iz svake od dviju tikvica i prenijeti u Eppendorf kivete
4. pipetom iz svake kivete izdvojiti 20 μ L uzorka i prenijeti u jažice mikrotitarske ploče te dodati 20 μ L bojila tripan-plavo.
5. resuspendirati
6. 20 μ L suspenzije stanica i boje pažljivo prenijeti ispod pokrovnice na Neubauerovoj komorici
7. komoricu staviti pod objektiv svjetlosnog mikroskopa
8. izbrojati stanice u 4 središnja kvadrata mrežice, odrediti srednju vrijednost broja stanica

Brojanje se vrši unutar četiri središnja kvadratića a rezultat je aritmetička sredina broja stanica, prema formuli:

$$\text{broj stanica /mL suspenzije} = \text{zbroj stanica izbrojenih u 4 kvadratića} \times 5 \times 10^3 \quad [1]$$

3.2.3 Određivanje koncentracije glukoze u mediju za uzgoj stanica

Metoda koju upotrebljavamo zove se glukoza PAP (fenol i aminoantipirin). Uzorak za mjerenje apsorbancije priredi se tako da se u epruvetu doda 10 μ L uzorka medija i 1,35 mL otopine reagensa. Svaki uzorak pripremljen je u 3 paralelne probe. Uzorci se ostave stajati na sobnoj temperaturi 10 minuta, nakon čega se očitava apsorbancija. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava 10 μ L destilirane vode.

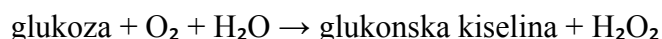
Račun za određivanje koncentracije glukoze u uzorcima medija:

$$\text{konc. glc.} = \text{konc. standarda (mM)} * A_{500}(\text{uzorak}) / A_{500}(\text{standard}) \quad [2]$$

Izračun specifične brzine potrošnje glukoze (q_{glc})

$$q_{\text{glc}} = 2 \times 10^{-3} \quad [3]$$

1,35 mL Reagens a i 9 μ L uzorka hranjivog medija inkubira se 10-15 minuta, a metoda određivanja koncentracije glukoze bazira se na slijedećim reakcijama:



Sastav Reagens a: glukoza oksidaza, peroksidaza, 4-hidroksibenzojeva kiselina (4-HBA), 4-aminoantipirin (4-APP), fosfatni pufer pH 7,5.

Koncentracija glukoze je proporcionalna koncentraciji kinonimina koji nastaje u drugoj reakciji, a njegova se koncentracija određuje spektrofotometrijski, pri apsorbanciji od 500 nm, na osnovi intenziteta obojenja otopine.

3.2.4. Izračunavanje parametara rasta CHO stanične linije

Određivanje specifične brzine rasta (μ)

Specifična brzina rasta je: $\mu =$ [h⁻¹] [4]

dX - povećanje biomase stanica

dt- vremenski interval

X - broj (koncentracija) stanica

Kada je brzina rasta konstantna, npr. tijekom eksponencijalne faze rasta, tada vrijedi:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad [5]$$

Obzirom da je masa proporcionalna broju stanica, onda je:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / dt \quad [6]$$

N - broj stanica na kraju log faze rasta

N₀ - broj stanica na početku log faze rasta

t - vremenski interval (h)

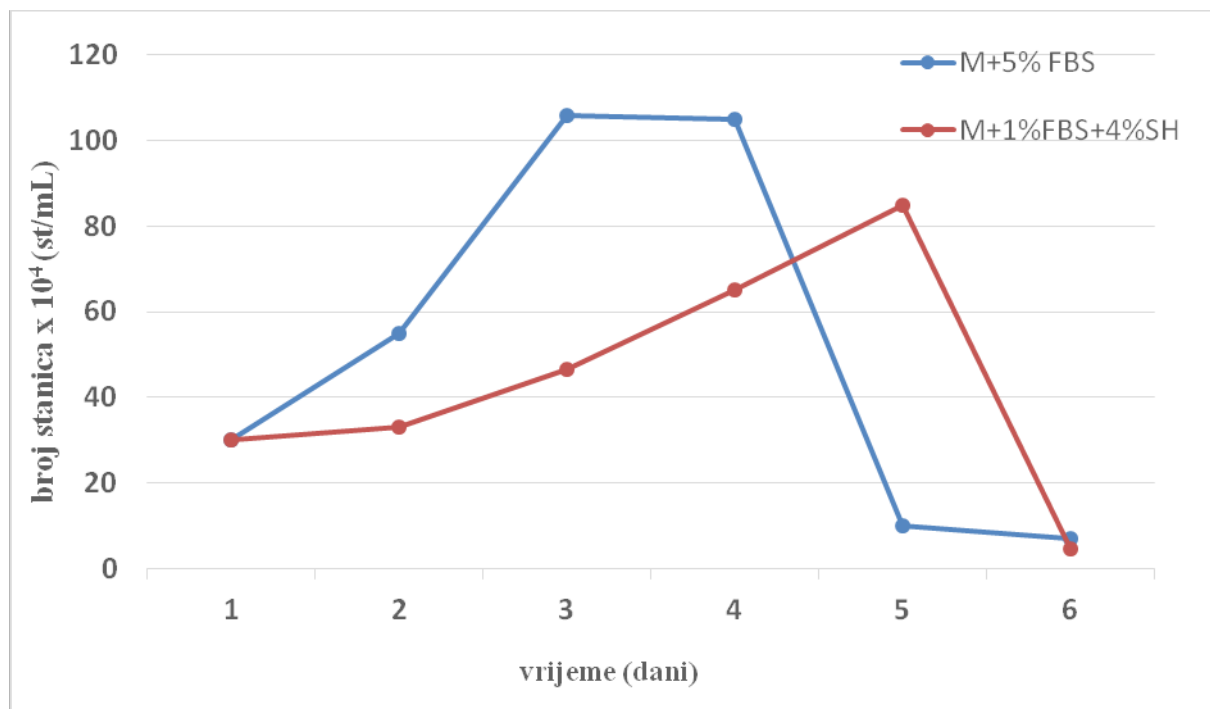
3.2.5. Detekcija proizvodnje proteina tijekom uzgoja CHO stanica

Da bi detektirali proteinske vrpce nakon završetka SDS-PAGE potrebno ih je vizualizirati tehnikama bojanja, npr. bojanje *Coomassie Brilliant Blue* bojilom. Proteini se trebaju fiksirati kako boja ne bi difundirala u okolni medij, a ova tehnika koristi svojstvo da se anionski oblik boje *Comassie* modrila veže za bazične i hidrofobne bočne ogranke proteina tako da se nakon odbojavanja viška boje u bezbojnom gelu proteinske vrpce vidljive kao oštre plave vrpce. Standard (uzorak s točno poznatim molekularnim masama) omogućuje kvalitativnu usporedbu tj. određivaje mase razdvojenih proteina.

3. REZULTATI

4.1. Učinak dodatka različitog volumnog udjela seruma i hidrolizata na rast CHO stanica

CHO stanice naciepljene su u 2 tikvice u *Dulbecco MEM/F-12* medij s različitim volumnim udjelima FBS i SH. Broj poraslih stanica određivan je svaka 24 sata tijekom 7 dana od naciepljivanja metodom Trypan-plavo (Slika 2.).



Slika 2. Grafički prikaz broja stanica u ovisnosti o vremenu u mediju s različitim volumnim udjelom dodanog FBS i SH. Crvena linija označava medij sa 1% seruma i 4% sojinog hidrolizata, a plava linija označava medij sa 5% seruma. Iz grafa se može iščitati da log faza u mediju sa 5% FBS traje od 2.- 3.dana, nakon toga slijedi stacionarna faza koja traje 3.- 4.dana te faza odumiranja.

Na temelju dobivenih krivulja rasta CHO linije pri različitim volumnim udjelima FBS u DMEM mediju izračunata je specifična brzina rasta stanica, a rezultati su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Specifična brzina rasta $\mu(\text{h}^{-1})$ CHO stanica u DMEM/F-12 mediju pri različitim volumnim udjelima FBS i SH

volumni udio FBS(%)	Volumni udio SH (%)	$\mu(\text{h}^{-1})$
5	-	0,018
1	4	0,038

3.2. Utrošak glukoze u mediju pri dodatku različitih volumnih udjela seruma i hidrolizata soje

U uzorcima medija određen je utrošak glukoze tijekom svaka 24 h uzgoja, a prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Utrošak glukoze pri različitim volumnim udjelima FBS i SH u mediju

Volumni udio FBS (%)	Volumni udio SH(%)	Koncentracija glukoze (mmol/L)						
		0.dan	2.dan	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7.dan
5	-	12,05	6,351	3,997	2,196	0,554	0,495	0,218
1	4	17,372	12,347	10,368	4,432	3,502	2,453	2,236

Grafički je prikazana koncentracija glukoze u medijima s dodanim različitim volumnim udjelima FBS i SH u ovisnosti o vremenu uzgoja (Slika 3.).

Slika 3. Grafički prikaz koncentracije glukoze u medijima s dodanim različitim volumnim udjelima FBS i SH u ovisnosti o vremenu. Crvena linija označava medij sa 1% seruma i 4% sojinog hidrolizata u kojem je koncentracija glukoze pala sa 16,5 mM na 2mM, a plava linija označava medij sa 5% seruma u kojem je potrošnja glukoze pala sa 12 mM na 0,2 mM.

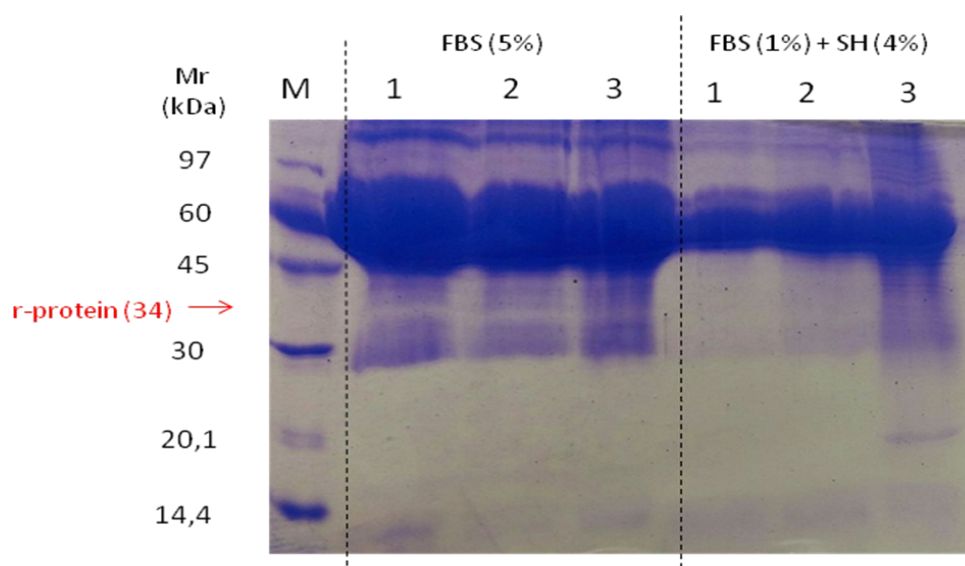
Uz određenu koncentraciju glukoze i broj stanica u pojedinim danima uzgoja pomoću formule [3] izračunata je specifična brzina potrošnje glukoze prikazana u Tablici 3.

Tablica 3. Specifična potrošnja glukoze $q(\text{Glc})$ (mmol/L dan stanici)

Volumni udio FBS (%)	Volumni udio SH (%)	$q(\text{Glc}) * 10^{-9}$ mmol/dan stanica)
5	-	3,948
1	4	6,104

4.3. Detekcija proizvodnje rekombinantnog proteina tijekom uzgoja CHO stanica

Proizvodnja rekombinantnog proteina u medijima s različitim volumnim udjelom FBS i SH praćena je metodom SDS-PAGE te bojanjem *Commassie brilliant blue* bojilom (Slika 5).



Slika 4. Gel nakon SDS-PAGE uzoraka medija uzetih 0. , 3. i 6. dan od naci jepljivanja. Na slici je vidljivo da su prva tri stupca u kojima imamo 5% serum podebljana u odnosu na preostala tri stupca. To možemo objasniti time da serum sadrži više proteina nego sojin

hidrolizat. Rekombinantni protein nije detektiran metodom SDS – PAGE, a to možemo objasniti time što je možda zasjenjen drugim proteinima sojinog hidrolizata ili seruma.

M.standard, medij s 5%FBS (1.-0.dan, 2.-3.dan, 3.-6.dan), medij s 1% FBS i 4% SH (1.-početak uzgoja, 2.-3.dan uzgoja, 3.-6.dan uzgoja).

RASPRAVA

Uzgoj životinjske kulture stanica u medij za uzgoj dodali smo serum koji stanicama osigurava sve sastojke potrebne za njihov rast, metabolizam i proliferaciju. Kako se serum dobiva iz životinja, postoje određeni zahtjevi za pouzdanije i znanstveno prihvatljivije metode uzgoja stanica i tkiva uključujući i osiguranje kvalitete (Gupta i sur., 2005). Iako je posljednjih godina napravljen veliki pomak u oblikovanju medija bez dodatka seruma i istraćivanjima utjecaja dodatka biljunih hidrolizata kao izvora proteina, potrebno je ispitati učinak različitih koncentracija seruma na rast CHO stanične linije i učinak dodatka hidrolizata soje na rast stanica te mogućnost zamjene dijela seruma hidrolizatom doje.

Ispitali smo utjecaj volumnih udjela seruma od 5% i 1% na proliferaciju CHO stanične linije u DME mediju. Suspenzija stanica nacijepljena je u 2 tikvice u početnoj koncentraciji od 3×10^5 st/mL. U prvoj tikvici bio je prisutan medij sa 5% FBS, a u drugoj tikvici medij sa 1% FBS i 4% SH. Dinamika rasta praćena je brojanjem tijekom 7 dana uz dodatak tripan-plavo. Na temelju dobivenih krivulja rasta izračunata je specifićna brzina rasta prikazana u Tablici 1. Najveća specifićna brzina rasta ($\mu=0,038h^{-1}$) postignuta je u suspenziji koja je sadržavala 1% FBS i 4%SH, dok je u drugoj suspenziji koja je sadržavala 5% FBS specifićna brzina rasta iznosila ($\mu=0,018h^{-1}$).

Na kraju uzgoja CHO stanićne linije određena je koncentracija glukoze (Tablica 2. i 3.). Vidljivo je da se glukoza troši u oba uzorka budući da glukoza u mediju za uzgoj predstavlja jedan od glavnih izvora energije (Butler, 2004.). Najveći utrošak glukoze od 17,372 mM bio je u mediju s 1% FBS i 4% SH gdje je ujedno postignuta i najveća specifićna brzina rasta.

Proizvodnja rekombinantnog proteina u medijima s različitim volumnim udjelom FBS i SH praćena je metodom SDS-PAGE te bojanjem *Commassie brillian blue* bojilom. Iako je svrha istraživanja bila provjeriti učinak hidrolizata soje na prinos proteina od interesa (POI) metoda nije omogućila određivanje razlike u prinosu. Prisutnost POI i razliku u kolićini u medijima različitog sastava nije moguće sa sigurnošću utvrditi, a kao razlog može se navesti mala kolićina POI, tj. slaba produktivnost stanićne linije ili zasjenjenje tj. prekrivanje s drugim proteinima prisutnim u sojinom hidrolizatu i serumu u suspenziji. Kao moguće rješenje mogu se odrediti ukupna kolićina proteina prisutna u serumu i sojinom hidrolizatu nekom od kolorimetrijskih metoda prije određivanja prisutnosti POI. Osim određivanja

ukupnih proteina kako bi se POI mogao razlikovati na gelu moguće rješenje je korištenje neke specifičnije metode poput ELISA testa. U slučaju kada bi stanična linija bila u potpunosti adaptirana na *serum-free* uvjete mogli bi lakše odrediti prisutnost POI jer bi bilo manje preklapanja proteina.

Navedeno istraživanje predstavlja osnovu za razumijevanje nutritivnih zahtjeva CHO stanične linije uz naznake mogućnosti korištenja hidrolizata soje kao dodatka mediju sa serumom u cilju proizvodnje biomase stanica.

ZAKLJUČAK

- Najveća specifična brzina rasta postignuta je u DME mediju s 1% FBS i 4% SH, dok je najmanja specifična brzina rasta postignuta u mediju s 5% FBS.
- Najveći utrošak glukoze izmjeren je u mediju s 1% FBS i 4% SH, jer soja potiče veću potrošnju glukoze u odnosu na medij sa 5% FBS.
- Korišteni postupak praćenja proizvodnje rekombinantnog proteina metodom SDS-PAGE te bojanjem *Commassie blue* bojilom nije omogućio određivanje razlike prinosa proteina u medijima s različitim volumnim udjelom seruma i dodatkom sojina hidrolizata.

POI proizveden ovim postupkom ne možemo detektirati SDS-PAGE, a kao razlog može se navesti mala količina POI, tj. slaba produktivnost stanične linije ili zasjenjenje, tj. prekrivanje s drugim proteinima prisutnim u sojinom hidrolizatu i serumu u suspenziji.

LITERATURA

- Butler, M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology*, 2. izd., Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York, str 30-98.
- Castilho LR, Moraes AM, Augusto EFP, Butler M (2008): *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, Taylor & Francis Group, New York, London, str.17-26.
- Freshney, R.I. (2000) *Animal Cell Culture*, 2.izd., Oxford University Press, New York.
- Gupta, K., Rispin, A., Stitzel, K., Coecke, S., Harbell, J. (2005) Ensuring quality of in vitro alternative test methods: issues and answers. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **43**, 219-224.
- Hartshorn, J., McNorton S., Hernandez C., Van der Ent, E., Caple M., (2010), Soy Hydrolysate Optimization for Cell Culture Applications, Proceedings of the 20th ESACT Meeting, Dresden, Springer, Nizozemska, str. 777-783.
- Lobo-Alfonso J., Price P., Jayme D. (2010) Benefits and limitations of protein hydrolysates as components of serum-free media for animal cell culture applications. U: *Protein hydrolysates in biotechnology*, (Pasupuleti, V. K., Demain, A. L., ured.) Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, str. 55-78.
- Nema, R., Khare, S. (2012) Animal cell culture: Advance technology for modern research. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **3**, 219-226.
- Van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fisher R, Gruber F, Gstraunthaler G, Hellebrekers L, Hyllner J, Jonker FH, Prieto P, Thalen M (2004) The human collection on fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture, *Toxicol. Vitro* **18**, str.1-12.