

Proizvodnja rekombinantnog proteina u CHO staničnoj liniji

Bojanić, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:346190>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Karla Bojanić

6553/BT

PROIZVODNJA REKOMBINANTNOG PROTEINA U 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, 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 CHO STANIČNOJ LINIJI

Karla Bojanić 6553/BT

Sažetak: Proizvodnja rekombinantnih proteina u svrhu istraživanja i komercijalne upotrebe počinje uspostavljanjem stanične linije. CHO stanična linija pogodna je za korištenje u tehnologiji stanica jer se može genetički modificirati, uzgajati u suspenziji te raditi scale-up. Stanice mogu rasti u kemijskim definiranim medijima bez seruma i proteinskih hidrolizata. Cilj ovog rada je bio ispitati učinak različitih sastava medija za uzgoj na rast stanične linije, utrošak glukoze te proizvodnju proteina. Medij s 5 % seruma i 4% sojinog hidrolizata pokazao se kao najbolji za rast i prinos proteina, medij s 5% seruma bez sojinog hidrolizata je pokazao sporiji rast, dok je u mediju sa 1% seruma i 4% sojinog hidrolizata najsporiji rast što pokazuje da sojin hidrolizat nije dovoljno učinkovita zamjena za serum.

Ključne riječi: CHO stanična linija, hidrolizat soje, vijabilnost stanica

Rad sadrži: 27 stranica, 5 slika, 3 tablice, 16 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: rujan, 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 CHO CELL LINE

Karla Bojanić, 6553/BT

Abstract: The production of recombinant proteins for research and commercial use begins by establishing a cell line. CHO cell line is suitable for use in technology of animal cells because cells can be genetically modified, grown in suspension, and the scale-up work. The cells may be grown in chemically defined medium without serum and protein hydrolysates. The purpose of this work was to examine the effect of different composition of culture medium on the growth of cell lines, the consumption of glucose and protein production. It was shown that the best medium for cells growth and protein yield was obtained with 5 % serum and 4 % soy hydrolyzate, medium with 5 % serum without soy hydrolyzate showed slower growth, while in the medium with 1 % serum and 4 % soy hydrolyzate resulted in the lowest cell growth and was shown that soy hydrolyzate is not sufficiently effective substitute for serum.

Keywords: CHO cell line, soy hydrolysate, cell viability, SDS-PAGE

Thesis contains: 27 pages, 5 figures, 3 tables, 16 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

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Kulture životinjskih stanica.....	2
2.1.1. Subkultiviranje staničnih linija.....	3
2.1.2. Medij za uzgoj životinjskih stanica.....	4
2.1.3. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica.....	6
2.2. Hidrolizati proteina.....	6
2.2.1. Hidrolizati soje.....	8
2.3. Gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. Materijali.....	10
3.1.1. Biološki materijali.....	10
3.1.2. Kemikalije.....	11
3.1.3. Otopine i puferi.....	11
3.1.4. Stanična linija CHO.....	14
3.2. Metode rada	15
3.2.1. Kultiviranje CHO stanične linije.....	15
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom <i>Trypan-blue</i>	15
3.2.3. Određivanje koncentracije glukoze PAP testom.....	16
3.2.4. Izračunavanje parametara rasta CHO.....	17
3.2.5. Praćenje proizvodnje rekombinantnog proteina tijekom uzgoja CHO stanica.....	18
4. REZULTATI.....	19
4.1 Učinak dodatka različitih volumnih udjela seruma i hidrolizata soje na rast CHO stanica.....	19
4.2. Utrošak glukoze u mediju pri dodatku različitih volumnih udjela seruma i hidrolizata soje.....	20
4.3. Detekcija proizvodnje rekombinantnog proteina tijekom uzgoja CHO stanica.....	22
5. RASPRAVA.....	23
6. ZAKLJUČAK.....	25
7. LITERATURA.....	26

1. UVOD

Kulture životinjskih stanica upotrebljavaju se u svim područjima biotehnoloških znanosti. Koriste se u području imunologije, farmakologije, toksikologije, tkivnog inženjerstva, interakcija stanica-stanica, proizvodnje rekombinantnih proteina i dr. Osnovni koncept kulture životinjskih stanica je izolacija pojedinačnih specijaliziranih stanica iz višestaničnih životinja i induciranje rasta *in vitro* uz određene uvjete i određeni sastav medija unutar inkubatora. Najveća prednost korištenja kultura stanica je reproducibilnost rezultata koja se postiže primjenom klonalnih staničnih linija. Proizvodnja rekombinantnih proteina u svrhu istraživanja, kliničkih ispitivanja i komercijalne upotrebe počima uspostavljanjem odgovarajuće stanične linije. Izbor ekspresijskog sistema i način ekspresije je općenito baziran na prirodi ekspresije proteina, količini potrebnih sirovina i vremenu potrebnom za proizvodnju.

CHO-K1 stanična linija je adherentna, epitelna stanična linija izolirana biopsijom ovarija kineskog hrčka. Izolaciju roditeljske linije proveo je 1957. godine T.T. Puck. Kontinuirane stanične linije kao što je stanična linija CHO pogodne su za korištenje u tehnologiji kulture stanica. Stanice mogu biti uzgajane u suspenziji i lako je raditi scale-up. Stanice mogu rasti u kemijski definiranim medijima bez seruma i proteinskih suplemenata te se mogu genetički modificirati u svrhu proizvodnje rekombinantnih proteina (Hendrick i sur., 2006).

Današnja stanična linija uzgaja se u *Hamovom/F-12* mediju uz dodatak 5-20 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS). Dodatak seruma u medij ima brojne nedostatke koji su vezani uz periodičke krize u opskrbi, varijacije u šaržama, mogućnostima kontaminacije virusima i mikoplazmama te visoku cijenu te se nastoji dio seruma zamijeniti drugim izvorima proteina poput različitih hidrolizata biljaka.

Cilj ovog rada bio je proizvesti rekombinantni protein i ispitati učinak dodatka različitih volumnih udjela FBS i SH (sojin hidrolizat) u medija za uzgoj CHO stanica na rast stanica i proizvodnju proteina. Tijekom uzgoja praćena je brzina rasta stanica, utrošak glukoze i proizvodnja proteina u mediju s 5% FBS, mediju s 5% FBS i 4% SH, te mediju s 1% FBS i 4% SH.

2.TEORIJSKI DIO

2.1 Kultura životinjskih stanica

Kultura životinjskih stanica je laboratorijska *in vitro* tehnika uzgoja životinjskih stanica koja zahtjeva posebne uvjete kao što su sterilnost, odgovarajuća temperatura i pH,

faktore rasta i ostale potrebne nutrijente. Principe metode uspostavio je Wilhem Roux krajem 19.stoljeća, a procvat doživljava 50-ih godina 20.stoljeća. Životinjske stanice osjetljivije su na mehanička oštećenja, imaju manju brzinu rasta i zahtijevaju kompleksnije medije za uzgoj i supstrate (Augusto i Oliviera, 2001.).

Uzgoj započinje uspostavljanjem primarne kulture stanica, koju čine stanice direktno izolirane iz životinjskog tkiva ili organa. Uspostavljanje se provodi enzimskom ili mehaničkom razgradnjom tkiva. Takve stanice su heterogene i bolje predstavljaju tkivo iz kojeg potječu, imaju ograničen broj razmnožavanja i mogu biti subkultivirane određenim brojem puta. Stanice u kulturi se dijele na tri osnovne kategorije ovisno o morfologiji: fibroblaste (bipolarne i multipolarne, imaju izdužen oblik i rastu vezane za supstrat), epitelne (poligonalnog oblika, pravilnije, rastu vezane za supstrat) i limfoblastične (okruglaste, najčešće rastu u suspenziji bez prihvaćanja za površinu) (Butler, 2004.).

Stanične linije su subkultivirane stanice, selekcionirane tako da tvore populaciju jednog tipa stanica originalno prisutnih u primarnoj kulturi. Normalne stanice se najčešće dijele određenim brojem puta (30-50) prije nego izgube mogućnost dijeljenja, što je genetički uvjetovano i takve stanice su konačne (netransformirane). Neke stanične linije mogu postati besmrtni procesom transformacije. Kada pod određenim uvjetima stanice steknu sposobnost neograničenog dijeljenja tada postaju kontinuirane stanične linije (transformirane). Glavne prednosti kontinuiranih linija su: brži rast, postizanje veće koncentracije stanica u kulturi, mogućnost korištenja serum-free i protein-free medija te potencijal za kultiviranje u suspenzijama i bioreaktorima (Freshney, 2000.).

Prednosti uporabe kulture stanica uključuju dostupnost selektivnog medija, jednostavna izvedba DNA profiliranja, reducirani volumen reagensa, smanjena uporaba pokusnih životinja i dr. Nedostaci su promjene karakteristika samih stanica nakon dugotrajnog *in vitro* uzgoja te promjene biokemijskih i enzimskih karakteristika. (Butler, 2004.)

Kultura životinjskih stanica je glavna tehnika u staničnoj i molekularnoj biologiji koja omogućava izučavanje fiziologije i biokemije stanice, efekt lijekova i toksina, mutagenezu i karcinogenezu. Značajan broj industrijskih staničnih linija (CHO, BHS, NS2/O) je danas karakterizirano dajući osnovu za proizvodnju rekombinantnih proteina u terapijske i dijagnostičke svrhe.

2.1.1 Subkultiviranje staničnih linija

Većina stanica je ovisna o podlozi i mora biti vezana za čvrste ili polučvrste supstrate (adherentne ili monoslojne kulture) dok neke mogu biti uzgajane u suspenzijama (suspenzijske stanične linije).

Adherentne stanične linije uzgajaju se u posudama poput T-boca ili roller boce koje karakterizira ograničen prostor za rast što može ograničiti produktivnost (Butler, 2004.). Uzgoj zahtjeva redovito pasažiranje, ali omogućuje laku vizualizaciju pod mikroskopom. Stanice se disociraju enzimski ili mehanički.

Suspenzijski uzgoj pogodan je za stanice prilagođene suspenziji i nekolicini neadhezivnih staničnih linija poput hematopoetske stanične linije. Uzgoj se odvija u bocama i zahtjeva miješanje radi adekvatne izmjene plinova kada je volumen površinskog sloja iznad 0.2-0.5 mL/cm². Miješanje se postiže magnetnim mješačem ili tresilicom. Pasažiranje se lako provodi i ne zahtjeva disocijaciju stanica, ali zahtjeva brojanje stanica i računanje vijabilnosti. Rast je limitiran koncentracijom stanica, te kultura može biti razrijeđena kako bi se stimulirao rast.

Subkultiviranje ili pasažiranje podrazumijeva odklanjanje medija i premještanje stanica iz mjesta predhodnog uzgoja u svježi medij. Procedura omogućava daljnju propagaciju stanične linije. Rast stanica u kulturi se odvija od lag faze preko log faze, gdje je brzina rasta eksponencijalna. Kada stanice u adherentnoj kulturi zauzmu čitav dostupan supstrat i nemaju više prostora za dijeljenje, ili kada stanice u suspenziji istroše kapacitet medija za daljnji rast dioba stanica je reducirana. Za održavanje kulture u optimalnoj gustoći stanice je potrebno precijepiti i opskrbiti svježim medijem. Adherentne kulture trebaju biti subkultivirane kada su u log fazi, prije nego dostignu konfluentnost (kontaktnu inhibiciju). Transformirane stanice mogu nastaviti proliferaciju i nakon postizanja konfluentnosti. Suspenzijske kulture također treba subkultivirati u log fazi, prije nego postignu konfluentnost što se može primjetiti zamućenjem do kojeg dolazi zbog nakupljanja stanica u klastere (Oztruk, 2006.).

2.1.2 Mediji za uzgoj životinjskih stanica

Mediji za uzgoj životinjskih stanica omogućavaju kontrolu fizikalno-kemijskih i fizioloških uvjeta uzgoja. Uvjeti uzgoja variraju ovisno o tipu stanica, ali svako *in vitro* okruženje mora sadržavati vodu, esencijalne nutrijente (aminokiseline, ugljikohidrate, vitamine), faktore rasta, hormone, specifične faktore, plinove (O₂, CO₂) te određene fizikalno-kemijske uvjete (temperaturu, pH, osmotski pritisak). S izuzetkom temperature, uvjeti uzgoja

su kontrolirani medijem za uzgoj. Uzgoj mora biti zaštićen od kontaminacije te od toksičnih i inhibitornih komponenata.

Tri glavne vrste medija, ovisno o potrebi za nadopunu serumom su: osnovni medij, medij s reduciranim serumom i *serum-free* medij. Osnovni medij sadrži aminokiseline, vitamine, anorganske soli i izvore ugljika kao što je glukoza. Medij s reduciranim serumom je osnovni medij obogaćen hranjivim tvarima i faktorima životinjskog podrijetla koji smanjuje potrebu za serumom. *Serum-free* medij kao zamjenu za serum sadrži odgovarajuće hormone i hranjive tvari.

Hranjivi medij za uzgoj životinjskih stanica mora sadržavati vodu, ugljikohidrate, vitamine, anorganske soli, hormone, lipide, proteine i različite mikronutrijente. Jedna od glavnih komponenti je voda, koja treba biti pročišćena reverznom osmozom, mikrofiltracijom ili nekom nekom drugom tehnikom da zadovolji kriterij visokog stupnja čistoće. Glukoza se najčešće koristi kao izvor ugljikohidrata i energije i dodaje se u koncentraciji od 5-25 mM (0,9-4,5 g/L), ali može i više. Aminokiseline su esencijalne za sintezu proteina, nukleotida i lipida. Mogu biti i izvor energije, a osigurane su korištenjem hidrolizata biljaka ili hidrolizata kvasca. Svaka aminokiselina se dodaje najčešće u koncentraciji od 0.1-1mM. Glutamin, metionin i serin su limitirajući faktori. Mnoge stanice zahtijevaju kompleks B vitamina, dok su ostali osigurani dodatkom seruma ili kvašćevog ekstrakta. Vitamini se koriste u vrlo malim količinama i služe kao enzimski faktori, esencijalni za stanični metabolizam. Najčešće dodavane soli u medij su Na^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^{-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i HCO_3^{-} . Ovi ioni osim što služe kao enzimski kofaktori važni su za održavanje ionske ravnoteže i osmotskog pritiska. Na^{2+} , K^{+} , Cl^{-} su relevantni za regulaciju membranskog potencijala, dok su SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i HCO_3^{-} važni za sintezu makromolekula kao i za intracelularni naboj. Za suspenzijske kulture koncentracija Mg^{2+} i Ca^{2+} treba biti niska kako ne bi dolazilo do adhezije ili agregacije stanica. Ostali metali poput Zn, Fe, Mg, Se, Mo, Cu, Mo se dodaju u medij u vrlo niskim koncentracijama, najčešće ako medij nije suplementiran životinjskim serumom. Lipidi se dodaju u obliku stearinske, palmitinske ili linolne kiseline i služe kao izvor energije, a imaju i strukturnu ulogu. Antibiotici poput penicilina, streptomicina i amfotericina B mogu biti dodani u medij za suzbijanje mikrobnog rasta, ali njihova upotreba treba biti minimalna (Freshney,2006.). Osim navedenih komponenata neke adherentne stanice trebaju proteine ekstracelularnog matriksa kao što su fibronektin, laminarin i dr. Faktori rasta su prisutni u malim koncentracijama poput FGF(*fibroblastin growth* faktor), EFG(*epidermal growth* faktor), NGF(*nerve growth* faktor), TGF(*transforming growth* faktor), PDGF(*plate-left derived growth* faktor), IgF(*Insulin-like growth* faktor) i interleukina (Jenkins,1991.).

Transformirane stanične linije poput CHO trebaju još i inzulin (5 µg/L), serum albumina, lipide, *vitamin-carrying* proteine, transferin i mikroelemente.

Najčešće korišteni mediji za uzgoj životinjskih stanica su: BME (*Basal Medium Eagles*) oblikovan 1955. za mišje L i humane HeLa stanice, EMEM (*Eagles Minimum Essential*), oblikovan kao poboljšanje BME, DMEM (*Dulbeccos Modification on Eagles Medium*) i GMEM (*Glasgows Modification of Eagles Medium*) koji sadrži veću koncentraciju aminokiselina i vitamina od EMEM i BME.

Serum je važan kao izvor adhezijskih faktora, faktora rasta, hormona, lipida i minerala za uzgoj stanica u osnovnom mediju. Serum također regulira permeabilnost membrane i služi kao nosač lipida, enzima, mikronutrijenata i elemenata u tragovima u stanicu. Dobija se zgušnjavanjem krvi životinja i dodaje se najčešće u udjelu 5-20%. Najčešće korišteni serumi su fetalni teleći serum (FBS), te goveđi i humani serum.

Posljednjih godina nastoji se upotrebljavati *serum-free* medij jer serumi imaju brojne nedostatke poput visoke cijene, razlike u kemijskom sastavu, mogućnosti pojave kontaminacije te kemijske nedefiniranosti. Proteini prisutni u serumu predstavljaju problem pri izolaciji i pročišćavanju proizvoda (Butler, 2004.). Nameće se i etičko pitanje okrutnosti prema životinjama. Serum-free medij je selektivan za određeni tip stanice a samim time daje mogućnost proliferacije i diferencijacije određenih stanica korištenjem različitih faktora rasta i koncentracija (Van der Valk, et al., 2004).

2.1.3 Uvjeti uzgoja životinjskih stanica

Uvjeti uzgoja životinjskih stanica *in vitro* su važni jer oponašaju uvjete *in vivo*. Fizikalno-kemijski uvjeti kojima se manipulira kako bi stanice rasle u što prirodnijem okolišu su temperatura, pH, količina plinova (CO₂, O₂), osmotski pritisak te viskoznost. Uzgoj stanica u inkubatoru osigurava stalnu temperaturu, koncentraciju CO₂ i vlažnu atmosferu.

Optimalna temperatura za uzgoj staničnih linija sisavaca je između 36-37°C, dok stanične linije hladnokrvnih životinja podnose temperature između 15-26°C. Odstupanja od optimalnih vrijednosti ne smiju biti veća od ±0.5°C.

Većina životinjskih stanica pokazuje dobar rast pri pH vrijednosti od 7,4 s malom razlikom između sojeva. Stanice fibroblasta rastu pri nešto bazičnijim uvjetima (pH 7,4-7,7). Neke transformirane stanične linije zahtijevaju kiseliji okoliš (pH 7,0-7,4). pH podloge je

izrazito važan budući da većina stanica gubi vijabilnost pri padu pH vrijednosti (6,5-6,0). Promjena pH se jednostavno uočava zbog promjene boje medija iz crvene prema žutoj. Zbog toga je za optimalan rast stanica potrebno periodično mjenjati medij (Freshney, 2005.).

Optimalna vrijednost koncentracije CO₂ je 5-7%, a postiže se uzgojem u inkubatoru. pH vrijednost također ovisi o ravnotežnoj koncentraciji otopljenog ugljikova dioksida i bikarbonata. Često je potrebno optimirati razinu CO₂ prema uputama proizvođača.

Osmotski tlak za uzgoj životinjskih stanica je između 260-320 mOsm/kg.

2.2. Hidrolizati proteina

Hidrolizati proteina su produkti proteinske hidrolize koji mogu nastati enzimskim, alkalnim, kiselinskim i fermentacijskim metodama, a obuhvaćaju peptide, aminokiseline i minerale prisutne u proteinima te kiseline i lužine koje se koriste za regulaciju pH. Ovisno o upotrijebljenim enzimima, hidrolizati proteina mogu imati različite grupe na bočnim lancima (karboksilnu, amino, imidazolnu, sulfhidrilnu...). Navedene grupe imaju različite utjecaje na životinjske, mikrobne i biljne stanice te stanice insekata. Razvoj kulture životinjskih stanica u samim počecima uključivao je uporabu seruma koji je služio kao izvor nutrijenata, hormona, faktora rasta te kao inhibitor proteaza. Serum sudjeluje u vezanju stanica za podlogu, dijeljenju stanice te pružanju zaštite od mehaničkih oštećenja. Danas se nastoji koristiti medij bez seruma jer je rizik kontaminacije seruma velik, otežana je izolacija i pročišćavanje proizvoda i ograničeni su njegovi izvori. Uporaba medija bez seruma zahtijeva dodatak određenih komponenti poput hormona, inzulina, transferina, lipida, rekombinantnih proteina i nutrijenata iz sintetskih, biljnih ili mikrobioloških izvora (Jayme, 1999., Mizrahi i Lazar 1991.).

Hidrolizati proteina, dobiveni hidrolizom proteina iz tkiva biljaka, kvasaca i životinja služe kao supstituenti proteina iz seruma. Uloga im je obogaćivanje medija, povećanje stabilnosti glutamina, poboljšanje vijabilnosti stanica i kulture, te poboljšanje njihove produktivnosti. Kvaliteta hidrolizata proteina ovisi o početnoj sirovini, hidrolizirajućem sredstvu, parametrima procesa, stupnju hidrolize, koncentriranju, sušenju i pasterizaciji. (Lobo Alfonso i sur., 2010.).

Prednosti uporabe hidrolizata proteina u mediju bez seruma su brojne. Tehničke prednosti- zamjena seruma je postupak koji može biti dugotrajan zbog nedefiniranosti njegova sastava, hidrolizati proteina pružaju blagotvorne faktore prisutne u serumu, uz eliminaciju

većine rizika vezanih uz uporabu seruma. Proizvodne prednosti- hidrolizati proteina proizvode se u velikim mjerilima, relativno su stabilni i mogu se skladištiti pod posebnim uvjetima. Troškovi su smanjeni jer nema velike razlike u sastavu među šaržama, zbog čega je moguće i predvidjeti prinos. Regulatorne prednosti- koriste se hidrolizati porijeklom od biljaka i kvasaca kako bi se izbjegla kontaminacija do koje može doći ukoliko se upotrijebe hidrolizati životinjskog podrijetla. Time se izbjegava proces uklanjanja potencijalno kontaminiranih dodataka iz sirovine.

Nedostaci uporabe hidrolizata proteina u mediju bez seruma su: nedostatak biokemijski definiranog sastava- koncentracija hidrolizata proteina koja se upotrebljava varira od 2,5-100 mg/L, ovisno o tome dodaje li se u kombinaciji s drugim nutrijentima ili sama. Teži se ujednačenom biokemijskom sastavu jer on uvelike utječe na prinos produkta. Nedostatak kemijske definicije može zakomplicirati proces pročišćavanja i izdvajanja proizvoda. Poteškoće pri obradi- produženo je vrijeme obrade zbog sastojaka hidrolizata koji su manje topljivi te zaostaju u procesu filtracije. Primjetilo se i da proteinski hidrolizati utječu na *upstream* procese s kationskim lipidima. Problemi nabave- poteškoće nastaju prilikom nabave hidrolizata proteina jer su izvori limitirani, te se pokazalo da proces proizvodnje nije isplativ (Lobo-Alfonso i sur., 2010.). Regulatorni problemi- regulatorne agencije i biofarmaceutski proizvođači inzistiraju na visokoj razini čistoće proizvoda, te traže osiguranje da proizvod nije kontaminiran nikakvim tvarima životinjskog porijekla.

Soja (lat. *Glycinemax*) je godišnja biljka iz porodice mahunarki (*Fabaceae*) koja potiče iz jugoistočne Azije. Pripitomljena je prije više od 3000 godina zbog jestive mahune i sjemenki. Danas je jedna od najvažnijih sirovina te čak zauzima šestinu svih kultiviranih usjeva ukupne žetve (Eol, 2015.). 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.

2.2.1. Hidrolizat soje

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.). Ove nedefinirane

kompleksne sirovine dobivene enzimskom razgradnjom soje ispočetka nisu bile namijenjene kao dodatak mediju bez seruma, stoga je bitno objasniti njihovu točnu ulogu u procesu kultivacije životinjskih stanica radi bolje kontrole procesa, poboljšanja stabilnosti proizvoda te naposljetku i proizvodnje produktivnijeg hidrolizata soje.

2.3 Gel elektroforeza-SDS PAGE

Primjena elektroforeze u svrhu razdvajanja supstanci prvi se put spominje 1937.g kad je biokemičar Arne Tiselius razvio metodu za razdvajanje smjese proteina pod djelovanjem električnog polja. Gel elektroforeza je najčešće korištena metoda za razdvajanje molekula na osnovu elektroforetske pokretljivosti i veličine molekula. Molekule putuju određenom brzinom definiranom njihovom pokretljivošću prema suprotno nabijenoj elektrodi, najčešće anodi, nailazeći na otpor gela tako da veće molekule putuju relativno sporije od manjih. Kao potporni medij koristi poliakrilamidne i agarozne gelove- trodimenzionalne umrežene strukture sa veličinom pora molekularnih dimenzija.

Polkiakrilamidni gelovi koriste se za razdvajanje proteina jer razdvajaju molekule molekularne mase 1000-200000. Gelovi se pripremaju kemijskom kopolimerizacijom akrilamid monomera sa N,N'-metilenbisakrilamidom uz inicijator polimerizacije amonijev persulfat i katalizator polimerizacije TEMED.

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 μ m, 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 od 5-60 μ L 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.

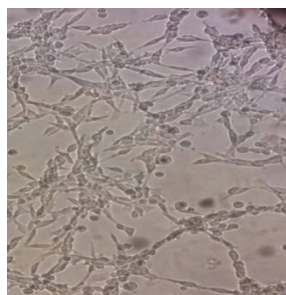
SDS-PAGE ili poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu Na-dodecil sulfata se koristi za razdvajanje proteina na osnovi molekularne mase. Metoda se temelji na obradi proteina otopinom anionskog detergenta Natrij dodecil sulfata (eng. *Sodium dodecyl sulphate*, SDS). SDS se svojim hidrofobnim grupama 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.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3. 1. MATERIJALI

3.1.1. Stanična linija CHO

U radu je korištena stanična linija ovarija kineskog hrčka CHO-K1 (*Chinese hamster ovary*) koja raste u monosloju (**Slika 1.**). Stanice su subklonovi roditeljske stanične linije CHO izolirane iz ovarija odraslog kineskog hrčka (ATCC, 2012). Uzgoj stanične linije zahtjeva strogo kontrolirane i sterilne uvjete. Bakterije, mikoplazme, kvasci i gljivice su glavni izvori kontaminacija, a prenose se atmosferom, preko radne površine, osobljem koje radi u laboratoriju, instrumentima i kemikalijama koje se koriste te biološkim materijalom. Zbog toga je potrebno osigurati sterilne uvjete radom u laminaru, a kultivacija stanica se odvija u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (95% zraka i 5 %CO₂), na temperaturi 34-37°C i pri pH vrijednosti 7,4. 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 i suplemente poput vitamina, aminokiselina, soli, glukoze, masnih kiselina i organskih suplemenata. Za optimalan rast stanica nužan je dodatak seruma koji sadrži proteine, hormone, minerale, lipide, faktore rasta, adhezijske faktore, inhibitore enzima, metabolite 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 podloge je izrazito važan faktor budući da većina stanica počne gubiti vijabilnost pri padu pH vrijednosti (između 6,0 i 6,5). Promjena pH se jednostavno uočava zbog promijene boje medija iz crvene u žutu. Zbog toga je za optimalan rast stanica potrebno periodično mijenjati medij.



Slika 1. Stanična linija CHO-K1 pri povećanju 400 puta. Fotografija je načinjena u Laboratoriju za transformaciju i primjenu stanica i biotransformacije.

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% Trypsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Trypan-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 -merkaptotanol 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:

CaCl₂ 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

$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 61

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 100

KCl 311,8

NaHCO_3 1200

NaCl 6995,5

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 134

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 62,5

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 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

Na_2HPO_4 1,44 g

KH_2PO_4 0,24 g

destilirana H_2O do 1000 mL

0,4 %-tna otopina Trypan Blue

Trypan Blue 25 mg

PBS pufer 5 mL

3.1.4 Uredaji i oprema

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO_2 , 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

Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright-Line, Njemačka

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

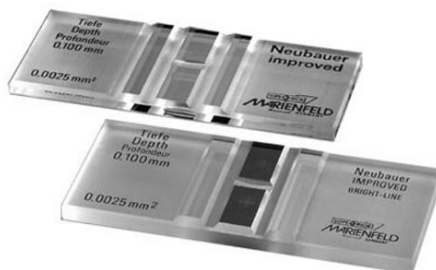
Uzgoj i održavanje CHO-K1 stanica započinje odmrzavanjem stanica. Zamrznute stanice čuvaju se na -80°C u mediju za zamrzavanje koji se sastoji od 80% *Dulbecco MEM/F12*, 10% FBS-a i 10% DMSO-a. Stanice se naglo odmrzavaju na 37°C , u atmosferi od 95% zraka i 5% CO_2 te centrifugiraju pri 1000 okretaja/min tijekom 5 minuta. Nakon uklanjanja supernatanta, započinje se s kultivacijom stanica u T-bocama uz dodatak medija za uzgoj (90% *Dulbecco MEM/F12* i 10% FBS-a) u inkubatoru s kontroliranom atmosferom (na 37°C , uz 95% zraka i 5% CO_2). Rad s kulturama životinjskih stanica mora se odvijati u aseptičkim uvjetima koji se osiguravaju radom u komori za sterilan rad (laminaru). Optimalni uvjeti za rast i razvoj stanica osiguravaju se redovitim mijenjanjem medija za uzgoj. CHO-K1 stanična linija raste u monosloju, pa je stanice prije prebacivanja u veće mjerilo potrebno prvo isprati od ostatka iskorištenog seruma i medija (PBS-om ili tripsinom), a zatim odvojiti od površine T-boce dodavanjem 1-2 mL tripsina. Tripsinizirane stanice se resuspendiraju u novom mediju za uzgoj te se uzima uzorak stanične suspenzije za određivanje broja stanica metodom Trypan Blue. Stanice se razrijeđuju na koncentraciju 2×10^5 stanica/mL medija za uzgoj dodatkom svježeg medija. Kako bi se stanice mogle upotrebljavati kroz duži period pohranjuju se zamrzavanjem. Stanice se zamrzavaju u eksponencijalnoj fazi rasta na način da se odcentrifugiraju i resuspendiraju u mediju za zamrzavanje u koncentraciji 5×10^6 stanica/mL. Po 1 mL takve suspenzije stanica stavlja se u ampule za zamrzavanje i postepenim snižavanjem temperature od $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ zamrzava na temperaturu -80°C .

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom *Trypan Blue*

CHO stanice naciepljene su u ploče s 12 jažica u početnoj koncentraciji od 5×10^4 stanica/mL. U svaku jažicu naciepljen je volume od 1 mL pri različitim koncentracijama seruma (FBS) i sojinog hidrolizata (SH). Jedan medij je imao 5% FBS, drugi je imao 1% FBS i 4% SH, dok je treći imao 5% FBS i 4% SH te se pratila dinamika rasta stanica kroz 7 dana metodom tripan-plavo. Osim ispitivanja utjecaja koncentracije seruma (1% i 5%) na rast CHO

stanica, ispitivali smo i utjecaj dodatka sojinog hidrolizata (0% i 4%) u DMEM mediju s 5% FBS

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



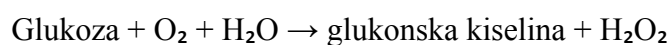
Slika 2. Neubauer komorica

Uzorak za brojenje pripremamo tako da sterilnom pipetom uklonimo hranjivi medij iz jažica te dodamo 1 mL tripsina koji odvaja stanice od podloge. Uspješnost odvajanja pratimo inverznim mikroskopom, stanice se zaokružuju kada se odvoje od podloge. Odvojenim stanicama dodajemo 3 mL medija sa serumom kako bi se spriječilo daljnje djelovanje tripsina. Stanice se resuspendiraju i uzima se 20 μ L suspenzije stanice te 20 μ L boje tripan-plavo. Od tako pripremljenog uzorka uzima se alikvot od 20 μ L i nanosi na Neubauerovu komoricu. 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

Sadržaj glukoze u mediju određivan je kolorimetrijsko-enzimskom metodom *glukoza PAP* (fenol i aminoantipirin) koja se koristi i za određivanje koncentracije glukoze u krvi, plazmi, serumu i likvoru. Metoda se bazira na specifičnim reakcijama:



Sastav reagensa za određivanje glukoze sadrži:

4-aminoantipirinkinonimin

4-amoniantipirin 0,40 mmol/L

glukoza oksidaza > 300 μ kat/L

peroksidaza > 17 μ kat/L

fosfatni pufer pH 7,4 $\pm$ 0,05 mmol/L

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. 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})

$$q_{\text{glc}} = 2 \times 10^{-3} \quad [\text{mmol stanici}^{-1} \text{ dan}^{-1}] \quad [3]$$

3.2.4. Izračunavanje parametara rasta CHO stanične linije

Određivanje specifične brzine rasta (μ)

Specifična brzina rasta je: $\mu =$ $[\text{h}^{-1}]$ [4]

dX - povećanje biomase stanica

dt- vremenski interval

X - broj (koncentracija) stanica

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

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

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

No - broj stanica na početku log faze rasta

t - vremenski interval (h)

3.2.5. Detekcija proizvodnje proteina tijekom uzgoja CHO stanica

Po završetku SDS-PAGE proteinske vrpce nije moguće vidjeti, već ih je potrebno vizualizirati nekom od specifičnih ili nespecifičnih tehnika detekcije koja najčešće primjenjuju tehniku bojanja određenim bojilima. Prije bojanje *Coomassie Brilliant Blue* bojilom proteini se prvo fiksiraju kako ne bi difundirali u okolni medij za bojanje. Tehnika bojanja *Coomassie* modrilom koristi svojstvo da se anionski oblik boje veže za bazične i hidrofobne bočne ogranke proteina, tako da se nakon odbojavanja viška boje u bezbojnom gelu vidljive kao oštre plave vrpce. Standard tj. marker (uzorak točno poznatih molekularnih masa) omogućuje kvalitativnu usporedbu odnosno određivanje mase razdvojenih proteina.

4. REZULTATI

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

CHO stanice naciepljene su na ploče s 12 jažica u 1mL *Dulbecco MEM/F-12* medija s različitim volumnim udjelima FBS i SH. Broj poraslih stanica određivan je svaka 24 sata tijekom 7 dana od naciepljivanja metodom *Trypan-plavo* (Slika 3).

Slika 3. Grafički prikaz broja stanica u medijima s 5% seruma (plava linija), mediju s 1% seruma i 4% sojina hidrolizata (crvena linija), te u mediju s 5% seruma i 4% sojina hidrolizata (zeleno linija) u ovisnosti o vremenu.

Na prikazu su vidljive faze rasta stanica: *lag faza*-tj.faza prilagodbe koja traje oko 1-2 dan od naciepljivanja ovisno u kojem se mediju uzgajaju stanice i u kakvom je stanju kultura stanica. Nakon *lag* slijedi *log faza* (2.-4.dan od naciepljivanja) u kojoj stanice rastu eksponencijalno i unutar te faze smo određivali specifičnu brzinu rasta, zatim slijedi stacionarna faza (4-5 dan) te faza odumiranja. Kulture u mediju sa sojinim hidrolizatom(SH) pokazuju brži porast koncentracije stanica od kultura bez SH.

Na temelju dobivenih krivulja rasta CHO stanica pri različitim volumnim udjelima FBS i SH u *DMEM* mediju izračunata je specifična brzina rasta (prema formuli [6]), a rezultati su prikazani u **Tablici 1.**

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

volumni udio FBS(%)	Volumni udio SH (%)	$\mu(h^{-1})$
5	-	0,0081
1	4	0,0192
5	4	0,0389

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

U uzorcima medija s različitim postotkom seruma (FBS) i sojinog hidrolizata (SH) određena je koncentracija glukoze PAP-testom svakih 48h od nacijepljivanja. Koncentracija glukoze izračunata je prema formuli [2] i prikazana 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	4.dan	6.dan
5	-	14,583	9,854	7,163	6,549
1	4	13,099	11,397	6,272	4,373
5	4	13,237	11,733	6,233	3,898

Grafički je prikazana koncentracija glukoze u medijima s dodanim različitim volumnim udjelima FBS i SH u ovisnosti o vremenu uzgoja (**Slika 4.**).

Najveći ukupni volumni utrošak glukoze 8,034 mmol/L je u mediju s 5% seruma i 4% sojina hidrolizata što je u korelaciji s rastom stanica jer je u istom mediju najveća specifična brzina rasta. U mediju s 1% seruma i 4% sojina hidrolizata volumni utrošak glukoze je 8,726 mmol/L dok je u mediju s 5% seruma utrošak glukoze najmanji i iznosi 8,064 mmol/L.

Slika 4. Grafički prikaz koncentracije glukoze u medijima s 5% seruma (plava linija), mediju s 1% seruma i 4% sojina hidrolizata (crvena linija), te u mediju s 5% seruma i 4% sojina hidrolizata (zeleni linija) u ovisnosti o vremenu.

Uz određenu koncentraciju glukoze i broj stanica u pojedinim danima uzgoja pomoću formule [3] izračunata je specifična brzina potrošnje glukoze stanične linije CHO u medijima različitog sastava prikazana u tablici **Tablici 3**.

Tablica 3. Specifična potrošnja glukoze q_{glc} (mmol stanici⁻¹ dan⁻¹)

Volumni udio FBS (%)	Volumni udio SH (%)	$Q_{glc} \cdot 10^{-9}$ (mmol stanici ⁻¹ dan ⁻¹)
5	-	9,0537

1	4	8,6924
5	4	10,8407

4.3. Detekcija proizvodnje rekombinantnog proteina tijekom uzgoja CHO stanica

Uzorci medija uzeti su pri naciepljivanju te 3. i 6. dan od naciepljivanja sa svake od 3 ploče s 12 jažica. Proizvodnja rekombinantnog proteina(r-protein) u medijima s različitim volumnim udjelom FBS i SH praćena je metodom SDS-PAGE te bojanjem *Commassie brilliant blue* bojilom (**Slika 5**).

Slika 5. Gel nakon SDS-PAGE uzoraka medija uzetih pri naciepljivanju te 3. i 6. dan od naciepljivanja. Uzorak: **M**-marker, **1**-uzorak uzet pri naciepljivanju, **2**-uzorak uzet 3.dan, **3**-uzorak uzet 6.dan od naciepljivanja za medij s 5% seruma (FBS), medij s 1% seruma i 4% sojina hidrolizata (SH), te medij s 5% seruma i 4% sojina hidrolizata.

Na prikazu gela se vidi da prisutnost r-proteina i razliku u količini u medijima različitog sastava nije moguće utvrditi, a kao razlog može se navesti mala količina r-proteina tj. slaba produktivnost stanične linije ili zasjenjenje tj. prekrivanje s drugim proteinima prisutnim u sojinom hidrolizatu i serumu u mediju za uzgoj.

5. RASPRAVA

Kod proizvodnje rekombinantnih proteina važan je sastav medija u kojem se uzgajaju stanice. Medij sadrži serum koji osigurava sve potrebne sastojke 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). U današnje vrijeme nastoje se razviti *serum-free* mediji ili se dio proteinskih hidrolizata nastoji zamijeniti biljnim hidrolizatima. Stoga je u ovom radu ispitan utjecaj različitog sastava seruma na rast CHO stanične linije i prinos proteina. Ispitana je mogućnost zamijene dijela seruma hidrolizatom soje.

Ispitan je utjecaj sastava medija na proliferaciju CHO stanica na način da su stanice naciepljene na ploče s 12 jažica u 1mL *Dulbecco MEM/F-12* medija s različitim volumnim udjelima FBS i SH. Broj poraslih stanica određivan je svaka 24 sata tijekom 7 dana od naciepljivanja metodom *Trypan-plavo* (Slika 3). Na temelju dobivenih krivulja rasta CHO stanica pri različitim volumnim udjelima FBS i SH u *DMEM* mediju izračunata je specifična brzina rasta (prema formuli [6]), a rezultati su prikazani u Tablici 1. Najveća brzina rasta $0,0389 \text{ h}^{-1}$ bila je u mediju s 5% seruma i 4% sojina hidrolizata, u mediju s 1% seruma i 4% sojina hidrolizata specifična brzina rasta je $0,0192 \text{ h}^{-1}$, dok je specifična brzina rasta u mediju s 5% seruma bez sojina hidrolizata najmanja te iznosi $0,0081 \text{ h}^{-1}$. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da stanice najbolje rastu uz 5% seruma i uz dodatak sojina hidrolizata. Može se prepostaviti da sojin hidrolizat donosi neke tvari koje djeluju stimulativno na proliferaciju i manju potrošnju glukoze.

Tijekom uzgoja stanica određivan je i utrošak glukoze u mediju pri dodatku različitim volumnih udjela seruma i hidrolizata soje. U uzorcima medija s različitim postotkom FBS i SH određena je koncentracija glukoze PAP-testom svakih 48h od naciepljivanja. Koncentracija glukoze izračunata je prema formuli [2] i prikazana je u Tablici 2. Vidljivo je da se glukoza troši u svim uzorcima budući da je glukoza glavni izvor ugljika. (Butler, 2004). Grafički je prikazana koncentracija glukoze u medijima s dodanim različitim volumnim udjelima FBS i SH u ovisnosti o vremenu uzgoja (Slika 4.). Uz određenu koncentraciju glukoze i broj stanica u pojedinim danima uzgoja pomoću formule [3] izračunata je specifična brzina potrošnje glukoze prikazana u tablici Tablici 3. Najveća potrošnja glukoze $10,8407 \text{ mmol dan}^{-1} \text{ stanici}^{-1}$ bila je za medij s 5% seruma i 4% sojina hidrolizata, potrošnja od $9,0537 \text{ mmol dan}^{-1} \text{ stanici}^{-1}$ bila je za medij s 5% seruma, dok je potrošnja od $8,6924 \text{ mmol stanici}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ bila za medij s 1% seruma i 4% sojina hidrolizata. Najveći utrošak glukoze postignut je u mediju u kojem je i najveća specifična brzina rasta stanica, dok su relativno manji utrošci

postignuti gdje su i manje specifične brzine rasta.

Dodatak soje u koncentraciji od 4% u medij s 5% seruma pokazao je stimulativan učinak na proliferaciju stanica uspoređujući medij s 4% seruma bez soja hidrolizata, dok se medij kojem je dio seruma zamijenjen sojinim hidrolizatom pokazao manje učinkovitim za proliferaciju stanica. Poznato je da različiti hidrolizati proteina imaju različit utjecaj na rast, vijabilnost i proliferaciju stanica (Franek i sur., 2000.), a ovisno o korištenoj staničnoj liniji čak i hidrolizati istog podrijetla mogu imati različit utjecaj na stimulaciju rasta kultura stanica.

Proizvodnja rekombinantnog proteina (r-protein) u medijima s različitim volumnim udjelom FBS i SH praćena je metodom SDS-PAGE te bojanjem *Commassie brilliant blue* bojom (Slika 5). Iako je svrha istraživanja bila provjeriti učinak hidrolizata soje na prinos rekombinantnog proteina metoda nije omogućila određivanje razlike u prinosu. Prisutnost r-proteina i razliku u količini u medijima različitog sastava nije moguće sa sigurnošću utvrditi, a kao razlog može se navesti mala količina r-proteina tj. slaba produktivnost stanične linije ili zasjenjenje tj. prekrivanje s drugim proteinima prisutnim u sojinom hidrolizatu i serumu u mediju. Kao moguće rješenje mogu se odrediti ukupna količina proteini prisutni u serumu i sojinom hidrolizatu nekom od kolorimetrijskih metoda prije određivanja prisutnosti r-proteina. Osim određivanja ukupnih proteina kako bi se r-protein 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 r-proteina jer bi bilo manje preklapanja proteina.

6. ZAKLJUČAK

- Najveća specifična brzina rasta postignuta je u DME mediju s 5% seruma i 4% sojina hidrolizata, dok je najmanja specifična brzina rasta postignuta u mediju s 5% seruma bez sojina hidrolizata.
- Najveći utrošak glukoze postignut je u mediju s 5% seruma i 4% sojina hidrolizata u kojem je i najveća specifična brzina rasta stanica, dok su relativno manji utrošci postignuti gdje su i manje specifične brzine rasta. Može se zaključiti da sojin

hidrolizat donosi neke korisne tvari koje djeluju stimulativno na proliferaciju i manju potrošnju glukoze.

- Dodatak sojinog hidrolizata poticajno djeluje na (volumni) prinos i brzinu rasta adherentne stanične kulture HEK 239T stanica
- Korištena metoda uzgoja stanične linije onemogućava detekciju rekombinantnog proteina i utvrđivanje razlike u prinosu u medijima različitog sastava SDS gel-elektroforezom te bojanjem *Commassie brillian blue* bojilom. Može se pretpostaviti da je nedovoljna količina r-proteina za detekciju zbog niske produktivnosti ili prekrivanja proteinima seruma i hidrolizata.

7. 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

Eol (2015) Encyclopedia of life.<<http://eol.org/pages/641527/overview>>. Pristupljeno 18.srpnja 2016

Freshney, R.I. (2000) *Animal Cell Culture*, 2.izd., Oxford University Press, New York.

Freshney R. Ian (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th Edition, John Wiley and Sons, New Jersey

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.

Hendrick, V., Ribeiro de Sousa, D., dosSantosPedregal, A.D.S, Bassens, C., Rigaux, P., Sato, K., Kotarsky, K., Werenne J. (2006) Expression of recombinant protein in CHO and HeLa cells and its follow-up using EGF reporter gene. U: *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Ijima, S. iNishijima K.I, ured.), Springer, Nizozemska, str. 55-59.

EL-Enshasy, H. A., Abdeen, A., Abdeen, S., Elsayed, E. A., EL Demellawy, M., EL Shereef, A. A. (2009) Serum concentration effects on the kinetics and metabolism of HeLa-S3 cell growth and cell adaptability for successful proliferation in serum free medium. *World Appl. Sci. J.* **6**, 608-615.

Jayme DW (1999) An animal origin perspective of common constituents of serum-free medium formulations. *Dev. Biol. Stand.* **99**, 181-187.

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.

Oztruk SS, Hu W-S: *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*. Taylor & Francis Group, New York, London, 2006, str.1-16

Simpson R.J., Adams P.D., Golemis E.A. ured.(2009) *Basic Methods in Protein Purification and analysis* CSH Press, New York, poglavlje **21**,str.27

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

Xie L, Wang, DIC (2006) Fed batch cultivation of animal cells using different medium for fed-batch cultures of animal cells, *Trends Biotechnol* **22**, str. 1393-1394

Wurm FM (2004), Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, *Nat. Biotechnol.* **22** str.1393-1398