

ExpiCHO 表达系统

24 孔和 96 孔深孔板 以及微型生物反应器的实验方案



Gibco™ ExpiCHO™ 表达系统将高表达的 CHO 细胞系及优化的培养基和转染试剂相结合，它们协同作用，滴度较 Gibco™ FreeStyle™ MAX CHO 表达系统高 160 倍，较 Gibco™ Expi293™ 表达系统高 4 倍。

ExpiCHO 表达系统的超高产量 (某些蛋白可达 1–3 g/L) 使您可以减小表达规模，与其他瞬时表达技术相比，大大节约了成本。我们在此介绍了减小系统规模至 24 孔和 96 孔深孔板以及微型生物反应器的实验方案。

96 孔深孔板中的转染

材料

- Axygen™ 存储微孔板, 圆底, 96 孔深孔 (Corning, 货号: PDW20CS)
- AeraSeal™ 粘性微孔板盖膜, 无菌 (E&K Scientific, 货号: T896100-S)
- Thermo Scientific™ 紧凑型数字微孔板振荡器 (Thermo Fisher Scientific, 货号: 88880023) 或其他 3 mm 轨道的微孔板振荡器

注: 本实验方案需要使用轨道轨道振荡器; 直线反应板振荡器无法充分混匀, 不适用于表达实验方案。

常规传代

1. 按照 ExpiCHO 试剂盒实验方案, 传代并扩增 ExpiCHO-S™ 细胞, 直至细胞密度达到约 $4-6 \times 10^6$ 个活细胞/mL。

第 -1 天: 分种细胞

2. 转染前一天 (第 -1 天), 按照 ExpiCHO 试剂盒实验方案, 分种 ExpiCHO-S 细胞至最终密度为 $3-4 \times 10^6$ 个活细胞/mL, 使细胞过夜生长。

第 0 天: 转染

3. 按照 ExpiCHO 试剂盒实验方案, 使用新鲜的 ExpiCHO™ 表达培养基稀释细胞至 6×10^6 个活细胞/mL。
4. 96 孔深孔板 (96DWB) 中每孔分装 0.8 mL 细胞用于转染。

注: 96 孔深孔板外部边缘的反应孔与内部的 60 个反应孔相比, 蒸发水平可能更高。为获得最佳的孔间一致性, 我们建议只使用内部的 60 个反应孔, 在外部反应孔中加入 1 mL PBS, 以防止蒸发。

5. 配制 ExpiFectamine™ CHO 试剂-DNA 复合物。

注: 下文的范例体积将生成足够转染 4 个反应孔的复合物反应体系。可按比例调整体积, 转染不同的反应孔数。

- 在无菌 96 孔聚丙烯反应板中, 将 2.5 μ L DNA 加入 250 μ L Gibco™ OptiPRO™ SFM 中, 稀释质粒 DNA (假定储液浓度为 1 mg/mL), 轻轻上下吹打 3-4 次混匀。
 - 将 10 μ L ExpiFectamine CHO 试剂加入稀释的 DNA 中, 轻轻上下吹打 3-4 次混匀。
6. 将 65 μ L 复合物加入 96 孔深孔板各个含有培养物的孔中, 轻轻上下吹打 3-4 次混匀。
 - 当加至 0.8 mL 培养体积时 (第 4 步), 质粒 DNA 的最终浓度约为 0.8 μ g/mL。该步骤中大多数蛋白质的最终质粒 DNA 浓度一般为 0.6-0.8 μ g/mL。
 7. 用透气性密封膜覆盖反应板。
 8. 在 37°C、含 8% CO₂ 的湿化空气条件下, 将 96 孔深孔板置于轨道振荡器上 (推荐振荡速度为 900 rpm, 轨道直径 3 mm) 孵育。

第 1 天: 添加增强剂和辅料

9. 转染 18–22 小时后添加 ExpiFectamine™ CHO 增强剂和 ExpiCHO™ 辅料。

注: 按比例调整所有体积。

对于标准实验方案: 对于 96 孔深孔板内部的 60 个孔, 在锥形管中混匀 325 μL ExpiFectamine CHO 增强剂和 13 mL ExpiCHO 辅料。添加 200 μL 该混合物至 96 孔深孔板的每个孔中。将 96 孔深孔板放回含有 8% CO_2 的 37°C 孵箱中振荡。

对于高滴度实验方案: 对于 96 孔深孔板内部的 60 个孔, 在锥形管中混匀 325 μL ExpiFectamine CHO 增强剂和 13 mL ExpiCHO 辅料。添加 200 μL 该混合物至 96 孔深孔板的每个孔中。将 96 孔深孔板转移至含有 5% CO_2 的 32°C 孵箱中振荡。

第 7–10 天: 收集上清液

10. 由于蒸发原因, 我们建议在转染后收集上清液:

对于标准实验方案: 转染后 7–8 天收集上清液。

对于高滴度实验方案: 转染后 7–10 天收集上清液。

采用两种实验方案进行人 IgG 表达的结果如图 1 所示。

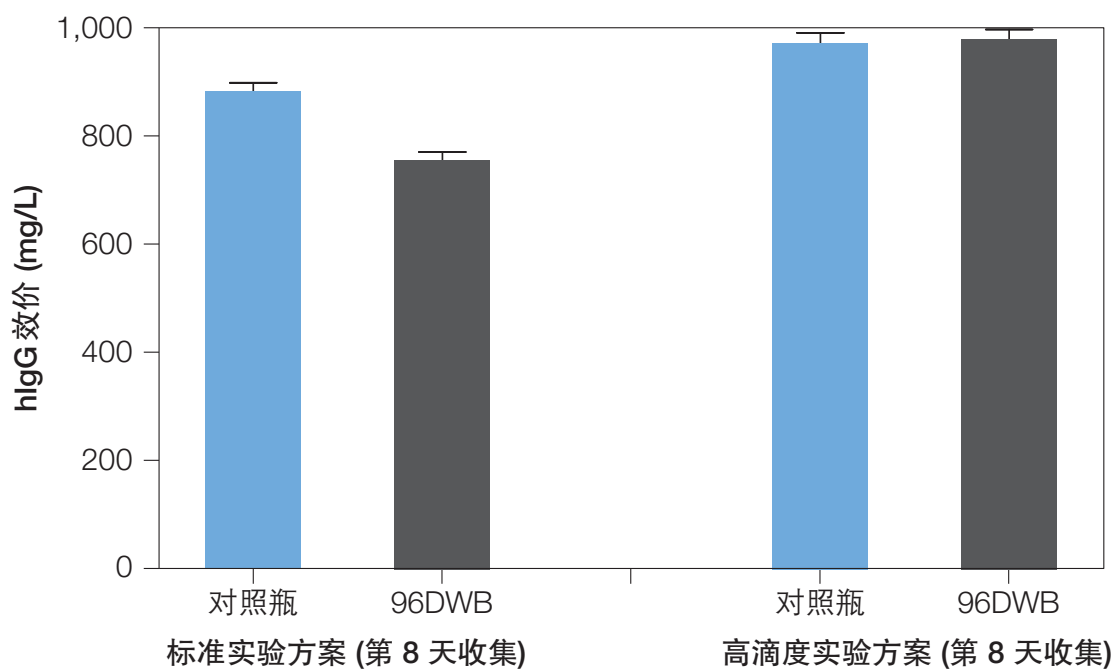


图1. 使用摇瓶或 96DWB 进行人 IgG 表达的比较。

24 孔深孔板中的转染

材料

- Axygen™ 存储微孔板, 直角底, 24 孔深孔 (Corning, 货号: PDW10ML24CS)
- AeraSeal™ 粘性微孔板盖膜, 无菌 (E&K Scientific, 货号: T896100-S)

注: 本实验方案中的振荡速度适用于轨道直径为 19 mm 的振荡器。其他轨道直径的振荡器需要调整振荡速度。

常规传代

1. 按照 ExpiCHO 试剂盒实验方案, 传代并扩增 ExpiCHO-S 细胞, 直至细胞密度达到约 $4-6 \times 10^6$ 个活细胞/mL。

第 -1 天: 分种细胞

2. 转染前一天 (第 -1 天), 根据 ExpiCHO 试剂盒实验方案, 分种 ExpiCHO-S 细胞至最终密度为 $3-4 \times 10^6$ 个活细胞/mL, 使细胞过夜生长。

第 0 天: 转染

3. 按照 ExpiCHO 试剂盒实验方案, 稀释细胞至 6×10^6 个活细胞/mL。
4. 24 孔深孔板 (24DWB) 中每孔分装 2.5 mL 细胞用于转染。
 - 推荐在未使用的反应孔中加入同等体积的 PBS, 以最大程度地减少蒸发。

5. 配制 ExpiFectamine 试剂-DNA 复合物。

注: 下文的范例体积将生成足够转染 1 个反应孔的复合物反应体系。可按比例调整体积, 转染不同的反应孔数。

- 每孔加入 2.0 μ L DNA 至 220 μ L OptiPRO SFM 中, 稀释质粒 DNA (假定储液浓度为 1 mg/mL), 轻轻上下吹打 3-4 次混匀。
 - 将 9.0 μ L ExpiFectamine CHO 试剂加入稀释的 DNA 中, 轻轻上下吹打 3-4 次混匀。
6. 将 200 μ L 复合物加入 24 孔深孔板各个含有培养物的孔中。
 - 当加至 2.5 mL 培养体积时 (第 4 步), 质粒 DNA 的最终浓度约为 0.8 μ g/mL。该步骤中大多数蛋白质的最终质粒 DNA 浓度一般为 0.6-0.8 μ g/mL。
 7. 用透气性密封膜覆盖反应板。
 8. 在 37°C、含 8% CO₂ 的湿化空气条件下, 将 24 孔深孔板置于轨道振荡器上 (推荐振荡速度为 225 rpm, 轨道直径 19 mm) 孵育。

第 1 天: 添加增强剂和辅料

9. 转染 18–22 小时后添加 ExpiFectamine CHO 增强剂和 ExpiCHO 辅料。

注: 按比例调整所有体积。

对于标准实验方案: 对于整块 24 孔深孔板, 在锥形管中混匀 400 μL ExpiFectamine CHO 增强剂和 16 mL ExpiCHO 辅料。添加 600 μL 该混合物至 24 孔深孔板的每个孔中。将 24 孔深孔板放回含有 8% CO_2 的 37°C 孵箱中振荡。

对于高滴度实验方案: 对于整块 24 孔深孔板, 在锥形管中混匀 400 μL ExpiFectamine CHO 增强剂和 16 mL ExpiCHO 辅料。添加 600 μL 该混合物至 24 孔深孔板的每个孔中。将 24 孔深孔板转移至含有 5% CO_2 的 32°C 孵箱中振荡。

第 7–10 天: 收集上清液

10. 由于蒸发原因, 我们建议在转染后收集上清液:

对于标准实验方案: 转染后 7–8 天收集上清液。

对于高滴度实验方案: 转染后 7–10 天收集上清液。

采用两种实验方案进行人 IgG 表达的结果如图 2 所示。

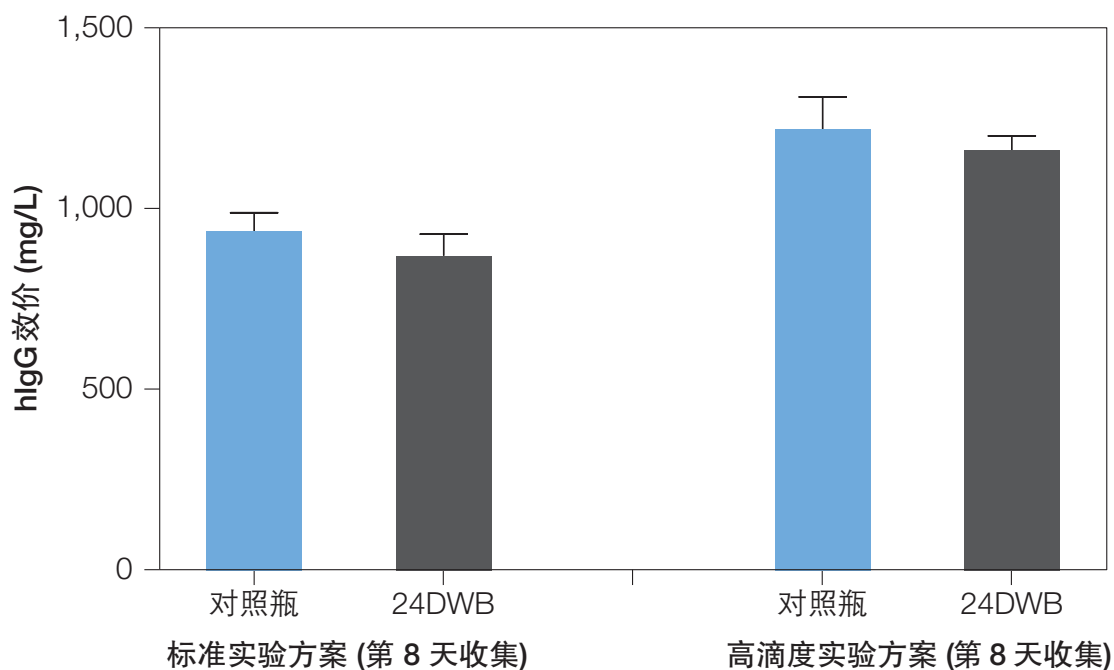


图2. 使用摇瓶或 24DWB 进行人 IgG 表达的比较。

50 mL 微型生物反应器中的转染

材料

- 微型生物反应器, 50 mL, 带有疏水性通风盖 (Corning, 货号: 431720)
- 带有能够旋转 45° 角的试管架的振荡平台

注: 本实验方案中的 240 rpm 振荡速度适用于轨道直径为 19 mm 的振荡器。轨道直径较大的轨道振荡器需要下调振荡速度。

注: 本实验方案中的步骤适用于 15 至 20 mL 的转染体积。其他体积需要优化振荡速度, 以确保获得最佳性能。下列范例假定转染体积为 15 mL (参见第 4 步)。当转染体积不是 15 mL 时, 应按照比例调整试剂体积。

常规传代

1. 按照 ExpiCHO 试剂盒实验方案, 传代并扩增 ExpiCHO-S 细胞, 直至细胞密度达到约 $4-6 \times 10^6$ 个活细胞/mL。

第 -1 天: 分种细胞

2. 转染前一天 (第 -1 天), 根据 ExpiCHO 试剂盒实验方案, 分种 ExpiCHO-S 细胞至最终密度为 $3-4 \times 10^6$ 个活细胞/mL, 使细胞过夜生长。

第 0 天: 转染

3. 按照 ExpiCHO 试剂盒实验方案, 稀释细胞至 6×10^6 个活细胞/mL。

4. 每个微型生物反应器分装 15 mL 细胞用于转染。

5. 配制 ExpiFectamine 试剂-DNA 复合物。

注: 下文的范例体积将生成足够转染 1 个微型生物反应器的复合物反应体系。可按比例调整体积, 转染不同的微型生物反应器数。

- 每个微型生物反应器中加入 12 μ L DNA 至 1.2 mL OptiPRO SFM 中, 稀释质粒 DNA (假定储液浓度为 1 mg/mL)。
- 将 50 μ L ExpiFectamine CHO 试剂加入稀释的 DNA 中, 轻轻上下吹打 3-4 次混匀。

6. 在每个含有 ExpiCHO-S 细胞的微型生物反应器中加入 1.2 mL 复合物, 密度为 6×10^6 个活细胞/mL。

- 当加至 15 mL 培养体积时 (第 4 步), 质粒 DNA 的最终浓度约为 0.8 μ g/mL。该步骤中大多数蛋白质的最终质粒 DNA 浓度一般为 0.6-0.8 μ g/mL。

7. 在 37°C、含 8% CO₂ 的湿化空气条件下, 将微型生物反应器置于轨道振荡器上 (推荐振荡速度为 240 rpm, 轨道直径 19 mm) 孵育。微型生物反应器应固定在 50 mL 试管架上 (45° 角)。

第 1 天: 添加增强剂和辅料

8. 转染 18–22 小时后添加 ExpiFectamine CHO 增强剂和 ExpiCHO 辅料。

对于标准实验方案: 对于每个微型生物反应器, 在锥形管中混匀 90 μL ExpiFectamine CHO 增强剂和 3.6 mL ExpiCHO 辅料, 将其全部加入微型生物反应器中。可按比例调整体积, 转染不同的微型生物反应器数。将微型生物反应器放回含有 8% CO_2 的 37°C 孵箱中振荡。

对于高滴度实验方案: 对于每个微型生物反应器, 在锥形管中混匀 90 μL ExpiFectamine CHO 增强剂和 3.6 mL ExpiCHO 辅料, 将其全部加入微型生物反应器中。可按比例调整体积, 转染不同的微型生物反应器数。将微型生物反应器转移至含有 5% CO_2 的 32°C 孵箱中振荡。

第 7–10 天: 收集上清液

9. 我们建议在转染后收集上清液:

对于标准实验方案: 转染后 7–8 天收集上清液。

对于高滴度实验方案: 转染后 7–10 天收集上清液。

采用两种实验方案进行人 IgG 表达的结果如图 3 所示。

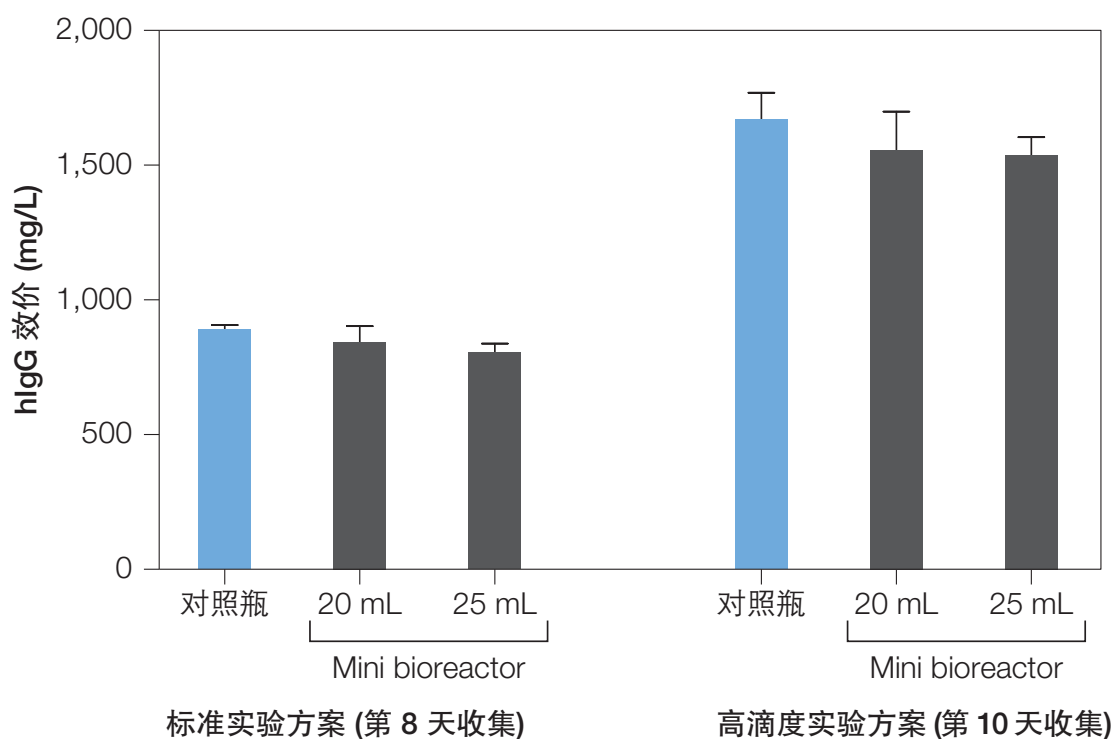


图3. 使用摇瓶或微型生物反应器进行人 IgG 表达的比较 (不同的转染体积)。

gibco

如需了解更多信息，请登录 thermofisher.com/expicho

ThermoFisher
S C I E N T I F I C

仅供研究使用。不得用于诊断。© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. 版权所有。除特别说明外，所有商标均为 Thermo Fisher Scientific 及其附属公司的财产。Axygen 是 Axygen, Inc. 的商标。AeraSeal 是 Excel Scientific, Inc. 的商标。COL31112 0416