

ExpiCHO 表达系统

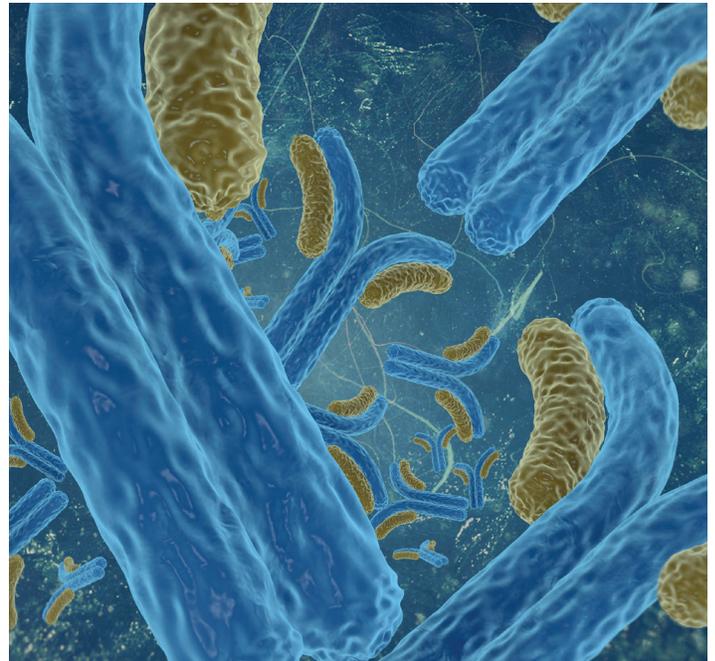
单克隆抗体蛋白 A 纯化的优化指南

简介

Gibco™ ExpiCHO™ 表达系统可实现各种重组蛋白的高滴度生产。ExpiCHO 试剂盒组分已经过优化,可用于 CHO 细胞的高产量表达,与采用 HEK 293 细胞(如 Gibco™ Expi293™ 表达系统)的现有瞬时表达系统相比,其上清液澄清和蛋白质纯化有所差异。在有些情况下,供应商推荐的蛋白 A 纯化方案并不适用于 ExpiCHO 上清液,一定时间后蛋白 A 离心柱会出现淡黄色。下文举例说明了应用于 ExpiCHO 表达系统的上清液澄清和蛋白 A 纯化的优化实验方案。

材料

- Thermo Scientific™ Nalgene™ Rapid-Flow™ 一次性无菌过滤装置(带有 PES 膜),货号:166-0045(0.45 μm 滤器)
- Thermo Scientific™ Nalgene™ Rapid-Flow™ 一次性无菌过滤装置(带有尼龙膜),货号:150-0020(0.22 μm 滤器)
- Applied Biosystems™ POROS™ MabCapture™ A 培养基,货号:4374731;或 MabSelect™ SuRe 树脂,货号:11-0034-93(GE Healthcare)
- ÄKTA pure L 系统,货号:29-0182-24(GE Healthcare)



方法

上清液澄清

注: 为获得最佳结果, 应先离心并过滤澄清, 然后再冻存 ExpiCHO 上清液。

ExpiCHO 上清液澄清步骤如下:

- $\geq 3,000 \times g$ 离心上清 30 分钟。
- 如果使用标准的瓶顶真空过滤器, 则推荐使用 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤器然后再使用 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤器过滤上清 (货号: 166-0045 和 150-0020)。
- 与标准的瓶顶真空过滤器相比, 其他过滤器类型 (如深层过滤器) 可改善过滤效果。
- 对于较大体积的过滤, 推荐使用表面积为 0.0022 m^2 的 Pall Seltz PDK5 双层深度过滤器胶囊 (Supracap™ 50 深度过滤器胶囊, 货号: SC050PDK5)。例如, 1 L 澄清上清液的处理速度为 8 mL/分钟, 处理时间 2 小时。使用多种胶囊 (如同时连接两个) 可进一步缩短处理时间。

离心柱上样条件

上样最佳量的单克隆抗体 (mAb) 是获得最高纯度并保持树脂性能长期稳定的关键。由于 ExpiCHO 表达系统针对多种蛋白质的表达量明显高于其他表达系统, 因此应首先按如下方法确定单位体积树脂的蛋白质上样量:

- 测定粗制细胞培养上清中的抗体滴度
- 确认 5% 穿透容量 (C5) 下树脂的动态结合容量 (DBC)
- 上样树脂 C5 的 80%

纯化参数

在各种实验条件下, 将 ÄKTA pure L 色谱系统的线性速度设置为 150 cm/小时, 停留时间 4 分钟。使用 10 倍柱体积 (CV) 平衡蛋白 A 树脂, 每 mL 树脂上样 28 mg mAb。然后使用 10 CV 的平衡缓冲液冲洗离心柱, 再使用 5 CV 洗脱缓冲液洗脱。最后, 重新平衡离心柱至中性条件, 然后使用 0.1 N 氢氧化钠消毒 10 分钟。先使用平衡缓冲液使离心柱恢复至中性 pH, 然后在 4°C 下置于 20% 乙醇中保存。

实验设计

供应商推荐的 (非最佳) 蛋白 A 纯化条件如表 1 所示。

利用实验自定义设计 (DoE) 模型测定人 IgG1 (pI 8.68) 蛋白 A 纯化过程中的因素重要性和相互作用, 最终目标是最大程度地提高单克隆抗体回收率和杂质去除率 (表 2)。

表1. 供应商推荐的蛋白 A 纯化方案。

测试条件	因素
结合缓冲液类型	磷酸钠
结合缓冲液浓度	25 mM
结合缓冲液 pH 值	7.4
洗脱缓冲液类型	柠檬酸, pH 3.0
洗脱缓冲液浓度	100 mM
在结合或洗脱缓冲液中加入 NaCl	仅结合缓冲液
NaCl 浓度	150 mM

表2. DoE 测试条件范围。

测试条件	因素
结合缓冲液类型	Tris 或磷酸钠
结合缓冲液浓度	25–100 mM
结合缓冲液 pH 值	7.1–7.4
洗脱缓冲液类型	柠檬酸或醋酸, pH 3.0
洗脱缓冲液浓度	25–100 mM
在结合或洗脱缓冲液中加入 NaCl	结合或洗脱缓冲液
NaCl 浓度	25–150 mM

结果

分别生成 DoE 模型, 获取达到最佳单克隆抗体回收率和杂质去除率的优化条件。然后合并这两个模型, 生成最终推荐的纯化方案, 最大程度地提高回收率和杂质去除率 (表 3)。数据显示, 采用 DoE 优化的结合缓冲液 (25 mM Tris/25 mM NaCl) 和洗脱缓冲液条件 (100 mM 柠檬酸钠或醋酸钠, pH 3.0, 加入至少 50–100 mM NaCl; 表 3) 替代供应商推荐的结合缓冲液 (25 mM 磷酸钠/150 mM NaCl) 和洗脱缓冲液条件 (100 mM 柠檬酸钠, pH 3.0), 可去除导致蛋白 A 树脂变黄的杂质。在优化条件下可以获得导致变色的杂质的分辨率 (图 1, 箭头), 而在供应商推荐的条件下未观察到不同的杂质分辨率 (图 2)。

表3. 优化的蛋白 A 纯化条件。

测试条件	优化因素
结合缓冲液类型	Tris
结合缓冲液浓度	25 mM
结合缓冲液 pH 值	7.1 或 7.4
洗脱缓冲液类型	醋酸或柠檬酸, pH 3.0
洗脱缓冲液浓度	100 mM
在结合或洗脱缓冲液中加入 NaCl	结合或洗脱缓冲液
NaCl 浓度	结合缓冲液 25 mM, 洗脱缓冲液 50–100 mM

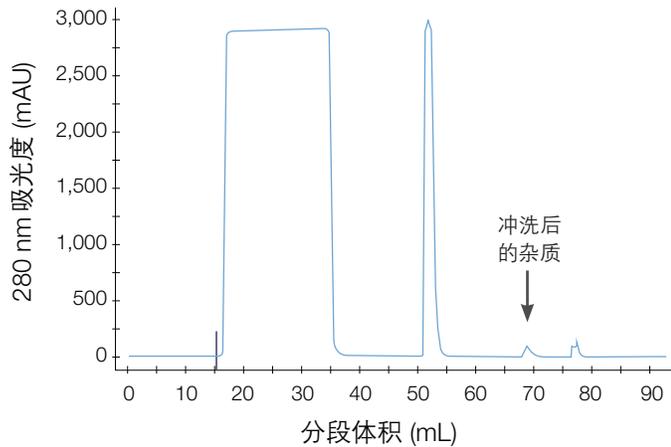


图1. 采用优化条件的 ExpiCHO 蛋白 A 纯化。

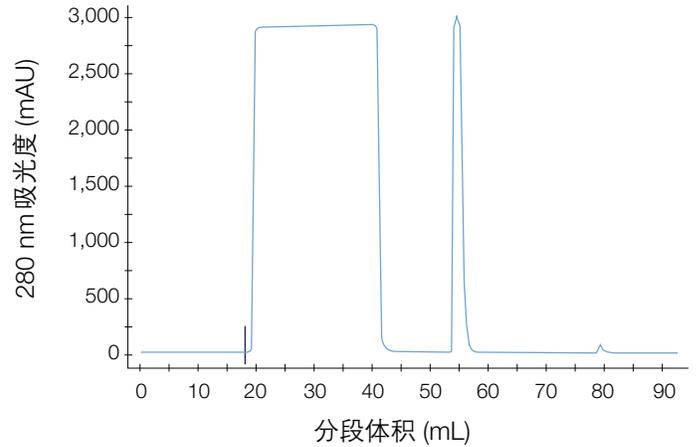


图2. 采用供应商推荐条件的 ExpiCHO 蛋白 A 纯化。

结论

本应用指南提供了 ExpiCHO 上清液蛋白 A 纯化时的上清液澄清、上样和缓冲液推荐条件。本研究中测定的条件提供了最佳产物回收率和杂质去除率。上述条件可用于指导 ExpiCHO 表达系统中生成的特定蛋白质的纯化条件的进一步优化。

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。
MabSelect 和 ÅKTA 是 GE Healthcare 的商标。Supracap 是 Pall Corporation 的商标。COL21339 0716