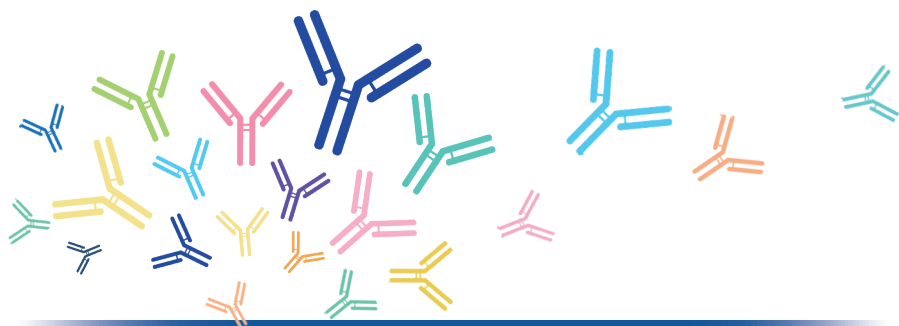


重组抗体手册

流程和策略



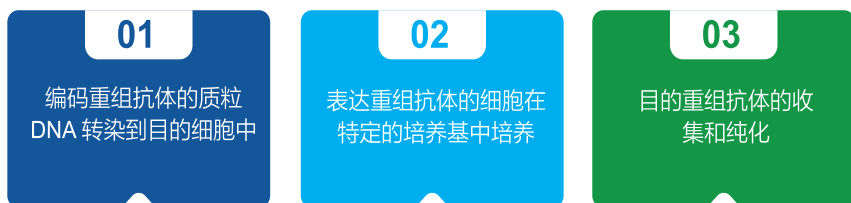
目录

目录	i
流程和策略介绍	ii
I. 优化重组抗体表达	1
DNA 表达载体元件	2
密码子优化	3
细胞系工程	4
伴侣蛋白表达	5
II. 优化转染和培养条件	6
转染	7
细胞培养条件	8
III. 重组抗体的纯化以及鉴定的优化	9
重组抗体的纯化	9
重组抗体的鉴定	12
IV. 生物信息学工具	14
V. 重组抗体纯化方案	17
在 HEK293-6E 细胞中生产 IgM 的一般流程	17
在 CHO-3E7 细胞中生产双特异性抗体的一般流程	20
参考文献	23



重组抗体表达以及纯化的流程和策略

重组抗体 (recombinant antibody, rAb) 表达和纯化大致分为3个主要步骤:



在理想环境下，重组抗体生产是从抗体表达质粒高效转染到生长迅速、高特异性生产重组抗体的细胞开始的。一旦重组抗体的表达稳定增长，随后的纯化步骤是简单且高效获得高纯度、功能性抗体的过程。当然，以上是重组抗体生产的简化过程。事实上，建立最优的重组抗体生产流程的选项非常多，要求重组抗体表达和纯化的各个流程都要经过严格的优化。

金斯瑞认为，在开发表达和纯化重组抗体的策略时，一种方法并不适用所有的情况。在本章节中，我们为您提供了一些设计重组抗体纯化方案时需要考虑的通用技巧。我们提出了如何提高重组抗体成功表达的方法，以及如何建立最佳的细胞培养条件、细胞转染和蛋白纯化的方法。同时，金斯瑞还提供一些生物信息学资源，以及纯化 IgM 和双特异性抗体的两种通用生产流程，以帮助您开始生产重组抗体。

I

优化重组抗体表达

表达系统的选择取决于重组抗体的性质、抗体的用途以及抗体的需求量。例如，原核系统适用于表达不需要糖基化的小片段重组抗体，如单链抗体 (single chain fragment variable, ScFv)、Fab (Fragment antigen binding) 和单域抗体片段 (VH-VL)^{1,4}。革兰氏阴性菌（如 *E.coli*）中功能性抗体片段的生产主要发生在内膜和外膜之间的周质空间。周质是首选的位置，因为它是一个氧化伴侣包含的环境，有利于重组抗体片段的正确折叠^{2,5}。另一方面，昆虫和哺乳动物系统则更适合表达和分泌分子量更大、更复杂的重组抗体。全长重组抗体的生产需要昆虫和哺乳动物细胞中的高级的蛋白折叠、组装、翻译后修饰 (Post translation modification, PTM) 以及分泌机制。尤其是哺乳动物细胞更适用于生产治疗性重组抗体，这是因为哺乳动物细胞能够产生类人源化的重组抗体，具有低免疫原性。

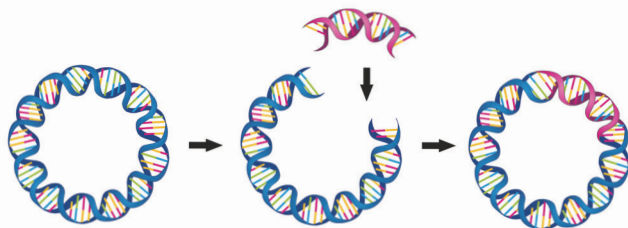
选择好最适合生产重组抗体的表达系统，下一步是明确表达重组抗体的质粒载体。在本节中，我们将讨论在设计抗体 DNA 载体时需要考虑的几个重要方面，以便在您选择的表达系统中产生最佳的重组抗体。

DNA表达载体元件

在每个表达系统中，优化且用于 DNA 克隆和重组抗体/蛋白生产的质粒载体多种多样。因此，为了确定哪种克隆载体最适合表达重组抗体，必须要了解不同类型的质粒及其相应的表达元件。选择含有能够促进重组抗体基因转录的强启动子的克隆载体很重要。例如，用于哺乳动物重组抗体表达的组成型的激活启动子，包括人巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV)、类人猿空泡病毒 40 (simian vacuolating virus 40, SV40) 和细胞生长因子 EF1 α ^{1,6}。一些启动子还包含增强子和剪接能力强的内含子，以增强 mRNA 的转录。此外，促进转录终止的元件，如 SV40 聚腺苷酸化信号序列，以及那些提高 mRNA 转录稳定性和翻译效率的因素，如牛生长激素 (Bovine growth hormone, BGH)，对哺乳动物表达载体也很重要^{1,6}。其他需要考虑的关键载体元件包括翻译起始的 Kozak 序列、筛选标记、复制起源以及染色质重组元素。

在原核和哺乳动物系统中表达免疫球蛋白的轻重链时，双顺反子表达载体是另一种有用的质粒形式。抗体，例如 IgG，通常是由 IgH 和 IgL 配对组成，并且只有组装配对正确的 IgG 才能与抗原结合发挥作用。然而，轻链的合成速度比重链快15%~25%，且研究表明轻链的亚型会影响细胞内 IgG 的组装⁶⁻⁸。因此，如果每条链都由分离的单顺反子 DNA 质粒编码，那么获得这些 Ig 链的平衡表达可能是低效和困难的。针对这种现象，双顺反子载体不失为一种解决方案，它可以通过一个内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES)，共表达来自同一 RNA 转录的重链和轻链抗体基因⁶。

金斯瑞的质粒 DNA 制备服务可以提供适合任何体积实验的定制 DNA 产量。大抽质粒双螺旋 $\geq 95\%$ ，内毒素水平 ≤ 0.005 EU/ μ g。



密码子优化

众所周知，由于遗传密码的简并性，20个氨基酸中有18个可以由61个DNA三联体密码子中的一个以上来编码。由于翻译后的氨基酸保持不变⁹，这种密码子简并性被称为同义突变。尽管被翻译的氨基酸保持不变，同义密码子仍然可以影响蛋白质的表达水平，因为在细胞中，某些密码子的翻译效率更高，从而产生了密码子偏好的现象^{9, 10}。密码子的同义突变，其对应的tRNA反密码子的可用性有限，由于核糖体翻译停滞，导致蛋白表达显著降低。许多生物表现出对密码子的偏好性，人们普遍认为密码子偏好性反映了翻译优化的突变偏好和自然选择之间的平衡⁹。

许多工具借助生物信息学的力量，通过确定和优化重组抗体表达系统中的密码子使用，以及减少密码子偏好，来实现重组抗体的基因设计¹²。然而，密码子优化工具差异较大，新的设计算法可以分析更多特定组织的密码子使用，如转录效率（GC含量、拼接效率、启动子和TATA框序列、终止信号、CpG甲基化序列）以及转化效率和稳定性（密码子使用的偏好、信使RNA二级结构、polyA位点、SD序列、3' mRNA富含腺嘌呤/尿嘧啶元素、蛋白折叠等）。

为了帮助设计和优化重组抗体的基因序列，我们推荐使用金斯瑞新的简单方便的密码子优化工具：GenSmart™ 密码子优化工具（更多详情在IV部分展示）。

细胞系工程

除了优化重组抗体的表达质粒外，在所有表达系统中，还可以通过细胞的基因工程来提高重组抗体的产量。转化后的 HEK293 细胞系是重组抗体瞬时表达的常用选择，因为它们转染效率高且高产，抗体产量在短时间内可以从 1mg 达到 1g^{1, 13, 14}。例如，一种表达截短的 Epstein-Barr 病毒的 HEK293-6E 细胞株，已被证明可以提高重组蛋白的效价¹⁴。

虽然 CHO 细胞在瞬时转染方面更具挑战性，但它们在生物制药产品生产中的重要性不容忽视，因此开发了更适合于瞬时重组抗体生产的几个 CHO 细胞系工程^{15, 16}。许多 CHO 细胞都缺失了二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因的等位基因，并且依赖于仅选择用表达重组抗体基因和 DHFR 的质粒成功转染的细胞的筛选条件。其中一种 DHFR 缺失细胞株是 CHO-DG44，它可以稳定的过表达抗凋亡蛋白 bcl-xl¹⁵。因此，抗凋亡的 CHO-DG44 细胞在细胞培养中表现出更长的寿命和更高的重组蛋白产量。

在稳定转染的细胞系中，诱导型的同源重组方法，如 Flp/FRT 或 Cre-lox 系统，使研究人员能够更好地控制重组抗体转基因位点特异性的整合⁶。使用 DHFR 和谷氨酰胺合成酶选择系统也可以有效地增加稳定转染的 DHFR-CHO 和 GS-NS0（非分泌小鼠骨髓瘤）细胞基因组中重组抗体基因的拷贝数^{1, 6, 17}。

在昆虫细胞中，可以通过使用蛋白酶缺失的杆状病毒株以及能够进行复杂糖基化的工程细胞系来改善蛋白质的分泌，在某种程度上，这就产生了一种与哺乳动物蛋白非常相似的糖基化蛋白质产品。抗体糖基化是一个重要的监控进程，因为糖修饰可以影响重组抗体的生物活性，清除率以及重组抗体的最终质量¹⁸⁻²⁰。

以上提供了在稳定细胞系和瞬时转染中提高重组抗体产量的一些细胞工程的例子，但新的细胞系正在不断开发和测试，以提高重组抗体的表达和产量。对于您的抗体生产项目，选择可用的表达细胞系无疑是值得的，这些表达细胞系可以帮助您实现最高的重组抗体产量。使用革命性的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，也可以为特定的重组抗体生产定制细胞株。金斯瑞的 GenCRISPR™ 哺乳细胞服务是由 CRISPR 基因编辑方面的专家科学家领导的，他们可以指导您设计一个细胞系，使您想要的重组抗体产量最大化。

伴侣蛋白表达

与重组抗体共表达或过表达的伴侣蛋白，可以帮助抗体折叠和溶解。哺乳动物系统的重组抗体表达的优势之一是，细胞拥有先进的细胞机制和相关的伴侣蛋白来促进蛋白折叠、翻译后修饰、溶解性、组装以及分泌。事实上，大多数用于提高细菌和昆虫细胞重组抗体表达的伴侣蛋白都来自哺乳动物蛋白。

在细菌中，一些伴侣蛋白有助于抗体片段 ScFv 和 Fab 的折叠和溶解，包括 GroES/L, peptidyl prolyl cis-trans isomerases, DnaKJE and FkpA^{21, 22}。在昆虫-杆状病毒表达体系中，人伴侣蛋白 hsp70 及其辅因子 Hsp40 的共表达可以提高重组蛋白的溶解性，减少聚集²³。此外，内质网 (Endoplasmic reticulum, ER) 常驻伴侣蛋白的过表达，如免疫球蛋白重链结合蛋白 (binding protein, BiP) 和蛋白二硫异构酶 (Protein Disulfide isomerase, PDI)，也被证明可以增强 IgG 的可溶性和分泌^{20, 24}。研究表明，另一种内质网伴侣钙网蛋白和翻译起始因子 eIF4E 的共表达也能促进蛋白质分泌²⁴。



优化转染和生长条件

重组抗体 DNA 质粒构建好之后，下一步是建立重组抗体表达的最佳转染和生长条件。对于细菌系统，质粒通常通过转化的过程进入细胞。细菌转化过程中，细胞经过处理使其具有能吸收外源性质粒 DNA 的能力。常用处理方法包括电穿孔，或使用化学药物，如氯化钙和一个短暂的热激步骤。由于细菌转化是一个相对简单的方法，我们将在本章节接下来的部分中重点介绍将 DNA 质粒转入真核细胞的过程，该过程称为转染。

转染

有几种不同的方式可用于将编码目的抗体的质粒转入真核细胞。瞬时转染适用于重组抗体表达，因为它快速且表达量高，转染后 6 天就可以收获重组抗体。瞬时转染是一个相对简单的过程，不需要将重组抗体的 DNA 整合到宿主基因组中，使用瞬时转染细胞建立重组抗体生产标准化流程可以很容易地完成¹³。另一方面，要构建稳定转染的细胞系，需要将重组基因元件和选择标记（如抗生素耐药性基因）随机整合到宿主细胞基因组中。由于 10^4 个细胞中大约只有 1 个能成功地将基因和标记物整合到宿主基因组中，因此成功构建一个稳定表达重组抗体基因的细胞系需要更长的时间，并且需要经过几轮筛选和扩增。然而，生产符合 GMP 要求的临床级治疗性抗体需要使用稳定的细胞株，以确保稳定、持久的重组抗体供应¹。

最佳转染的流程，无论是瞬时转染的还是稳定转染，都会因表达系统以及项目的不同而不同。DNA 用量、转染试剂种类、转染方法、细胞密度、目的细胞系等参数，都需要考虑和优化。

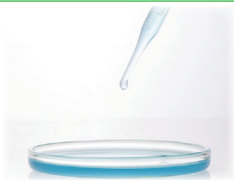
然而，在所有的转染方法中，都有一些对转染成功至关重要的常见实验步骤。



DNA 质量&数量

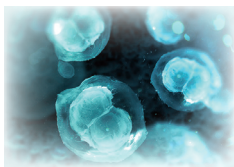
确保你的质粒

- 具有高效的转染质量
- 在无菌缓冲液中（水或 TE）
- 不含蛋白、RNA、化学污染物、内毒素等
- 足够的量用于设计你的实验



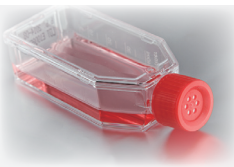
转染试剂种类

DNA 和特定的转染试剂或增强子的结合对细胞有害。优化转染条件，通过减少过量、不必要的质粒 DNA 和转染试剂的使用量来降低细胞毒性。



细胞活力

使用较低代次的细胞，并且细胞在用于转染前需经过 2 次传代，以确保细胞活力。转染 40%~80% 融合并处于对数生长期的健康细胞。



细胞培养条件

细胞应该在适宜的温度、CO₂ 和湿度条件下培养。确保细胞培养基不受污染，并对转染后的细胞生产和蛋白表达进行血清和添加物的优化。

细胞培养条件

毫无疑问，适当的无菌细胞培养和生长条件是提高重组抗体质量和产量的关键因素。对于细菌来说，抗体的小规模制备可以通过使用简单的摇瓶培养细胞的方法来完成。在产量超过 10,000L 的生物反应器中，通过高密度细胞发酵可以制备出大规模的细菌重组抗体²⁵。

像细菌一样，哺乳动物的重组抗体也可以通过摇瓶培养细胞来完成小规模抗体生产。哺乳动物瞬时基因表达的重组抗体的大规模生产通常是在体积可达 150 L 的生物反应器中通过分批或补料分批细胞培养过程完成的^{1, 26}。在某些情况下，诱导表达细胞周期的调节剂如 p18 和 p21、酸性成纤维细胞生长因子，丙戊酸、羟基脒等添加剂以及组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (NaBut 和 Trichostatin A) 都有可能提高重组抗体的生产水平²⁷。

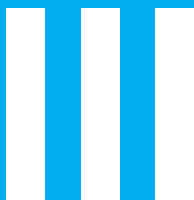
蛋白生产是一个复杂的过程，有许多变量可以影响最终重组抗体的质量和产量。一般来说，对于小规模重组抗体制备，金斯瑞建议对每个项目的优化参数进行评估，并在整个生产过程中仔细监测生物参数，如细胞密度、细胞活力和重组抗体培养的生长速度。保持细胞生长在最佳的、良好的控制条件是获得高重组抗体产量的最佳保证。

成本、质量和产量的难题

当涉及到重组抗体生产时，通常很难确定生产满足质量和产量需求的定制化抗体的成本。

金斯瑞开发了具有专利的 cocktail 试剂，它可以平衡抗体质量和产量的成本，确保您以最低的价格获得最优质的抗体。





重组抗体的纯化以及鉴定的优化

从细胞培养上清中回收重组抗体涉及几个关键的纯化步骤，需要经过严格的优化，最大限度地提高重组抗体的产量、纯度和质量。在本章节中，我们提供了一些关于重组抗体纯化工艺的建议，并为您提供了一些优化重组抗体纯化和鉴定的建议性方案。

重组抗体的纯化

重组抗体纯化是一个结构化和系统化的过程，涉及到亲和层析的使用。根据重组抗体的下游应用和纯度要求，开发了蛋白质纯化策略。为了做到这一点，在开始纯化之前应该解决几个基本问题，包括：

- 表达的重组抗体的分泌性？
- 需要去除哪些污染物？
- 纯化的体积和所需的重组抗体纯度（表1）？
- 纯化之后重组抗体的最终应用？
- 哪些设备和资源可利用？

表1：抗体纯度需求及其应用

纯度	应用
>99%	治疗、体内研究
>95%	作为试剂应用于研究（如 WB\IHC\FACS 等）抗体工程（如组合展示库）

亲和层析 (Affinity chromatography, AC) 是一种选择性高、不可或缺的重组抗体纯化技术，因为它可以利用蛋白质不同的物理和化学性质，从复杂的混合物中分离蛋白²⁸。接下来将简要介绍一些比较常用的亲和层析的方法。然而，使用亲和纯化方法成功捕获蛋白和抗体的关键是选择合适的亲和柱，以及纯化策略的优化，以满足纯度需求、使产量最大化。在这方面，大部分亲和层析纯化包括 4 个步骤。

- 1. **结合**：过滤之后的包含重组抗体的澄清细胞裂解液结合到纯化填料上
- 2. **洗涤**：通过洗涤去除杂质，使得结合到填料上的重组抗体更纯
- 3. **提纯**：如果需要，可以通过去除微量的杂质进一步纯化重组抗体
- 4. **洗脱**：纯化的重组抗体从纯化柱上洗脱下来

例如，蛋白 A 对 IgG 型抗体的 Fc 区域具有较高的亲和力。那么，如果 IgG 重组抗体的表达水平足够强，依据蛋白 A 原理的亲和层析步骤可以产生足够纯度的抗体用于多种应用。然而，如果重组抗体需要进一步纯化，可以使用其他的纯化方法，采用不同类型的树脂如分子排阻色谱 (size exclusion chromatography, SEC) 和/或离子交换色谱 (ion exchange, IEX)^{28, 29}。

不同种类的抗体对于不同的亲和层析柱有不同的亲和力，也没有一种亲和层析柱可以用于纯化所有类型的抗体。因此，评估哪种亲和柱最适合纯化您的目的抗体是至关重要的（表2）。

表2：常用的抗体纯化亲和柱

亲和柱	目的抗体种类或片段
Protein A	IgG1, IgG2, IgG4
Protein G	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
Protein L *	ScFv, Fab, Dab
2-Mercaptopyridine	IgM, IgY

Protein L*尤其适用于捕获抗体片段，也可以结合具有合适的 Kappa 轻链恒定区的抗体。

通常，每种柱子都有其最佳操作条件的操作流程，并且根据您所用柱子的供应商，仔细阅读基本的柱子操作参数，比如：

- 载量
- 流速和压力限制
- 柱子能够承受的缓冲液种类（清洗和洗脱）
- 柱子清洗
- 柱子储存

重组抗体洗脱后，抗体的储存方法与传统的蛋白储存方法相似。

储存时间	推荐储存温度	最佳方法
1~2 天	4 ℃	使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌
>2 天	4 ℃	添加 0.1% 叠氮化钠避免细菌污染
数月	-20 ℃	添加 50% 甘油避免冷冻
数月~数年	-80 ℃	添加 5%~50% 甘油保持蛋白稳定

极端的储存条件应当避免，比如极端的 pH 或者接近蛋白 pI 的 pH。应避免任何会干扰抗体后续应用的添加剂的引入，否则，在使用抗体前需要将其去除。如果长期储存，需要使用液氮或干冰/乙醇混合物快速冷冻抗体样品，以避免抗体变性和多次反复冻融，来防止重组抗体的稳定性和活性的丢失。

重组抗体的鉴定

蛋白质的鉴定在决定重组抗体的特性、纯度、浓度和活性时至关重要。这个评估过程在所有纯化步骤之后进行。有很多方法可以评估纯化的抗体的结构和质量。在本章节中，我们提出了一些鉴定方法和技巧。

纯度以及特性

染色法 SDS-PAGE 或免疫染色法 Western Blot

- 在非还原条件下，重组抗体 SDS-PAGE 目的条带应该是一个与全长免疫球蛋白相应的条带。比预期的重组抗体分子量高或低的条带可能是纯化过程中产生的杂带，重组抗体片段或者聚集。低分子量的条带可能是由于在 SDS-PAGE 样品制备过程中重组抗体链间二硫键断裂导致的³⁰。

- 还原条件下，抗体的重链和轻链变性并还原。通常可以看到 2 个条带，一条 23KD 条带对应轻链分子量，一条 50KD 对应重链分子量。

凝胶过滤色谱，离子交换色谱，HPLC

- 通常，当使用亲和柱洗脱重组抗体时，会生成洗脱色谱图。具有单个吸收峰对称洗脱色谱图是同源蛋白的性质，非对称色谱图表明蛋白不均一或有聚集。洗脱图谱还可以反映纯化蛋白寡聚状态。

质谱分析 (LC-MS, MALDI-TOF)

- 重组抗体的质谱可以通过提供蛋白序列和精确的分子量（在几个道尔顿以内）验证蛋白的性质。蛋白组学也可用于鉴定是否发生蛋白水解，以及识别和目的重组抗体共同纯化出来的污染物。

浓度

吸光值读数

- 用紫外-可见分光光度计测量蛋白吸光度是重组抗体定量的最简单的方法之一。最常用的是使用 Nanodrop™ *(Thermo Fisher) 测量含有 Trp 和/或 Tyr 残基以及二硫键的蛋白在 280 nm 的吸光度。该方法不需要生成标准曲线，但必须要有不含蛋白的空白对照。

- Bradford 和 BCA（二喹啉甲酸）方法也可用于蛋白检测和定量。这些技术的核心是将蛋白与检测试剂结合，在 595nm (Bradford) 或 550~570nm (BCA) 出现可测量的颜色变化。尽管所有 >3 个残基的蛋白都可以用这些方法测定，但必须用牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 建立标准曲线。此外，由于检测试剂与某些缓冲液成分和性质（洗涤剂、PH 值等）不相容，综合分析试剂的需求和样品的性质是很重要的。

IV

生物信息学工具

金斯瑞已经开发并授权了许多综合生物信息学的工具来帮助您设计重组抗体的表达实验。

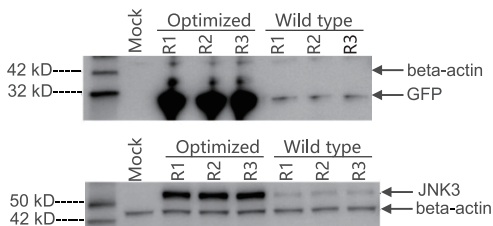
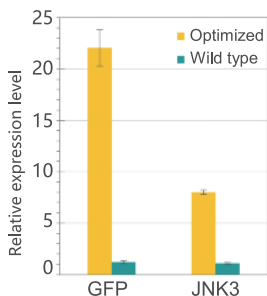
使用 GenSmart™ 密码子优化的关键原因

便捷：免费在线工具，一键优化

综合因素分析：筛选并验证了超 200 个因素

优化的算法：专利保护的群体免疫算法

序列个性化定制：针对每个蛋白的特性进行每个关键因素进行权重设置



GenSmart 优化后的 GFP 和 JNK3 基因序列与未优化的序列相比，蛋白表达量分别增加了 18 倍和 8 倍。

A. 密码子优化：金斯瑞为基因设计提供了两种主要的密码子优化工具。

GenSmart™ 是金斯瑞基于基因学和免疫学理论的“种群免疫算法”的免费、简易的密码子优化平台。该方法筛选并验证了 200 多个与基因表达相关的因素，包括 GC-含量、密码子的使用和含量、RNase 剪接位点和顺式 mRNA 不稳定等。采用多因素分析法，确保某一特定基因序列中的所有关键因素具有一定的权重。因此，每个基因的优化运行是完全定制的，最大限度地获得有功能和有活性的蛋白。金斯瑞的另一个设计系统 OptimumGene™ 是基于粒子群算法的专利基因优化技术，均可以优化天然和重组基因序列，从而在任何给定的表达系统中实现尽可能高的生产水平。

B. WoLF PSORT II 高级蛋白亚细胞定位预测工具：WoLF PSORT 是基于 PSORT 原理的蛋白亚细胞定位预测的 POSRT II 程序的扩展。WoLF PSORT 将蛋白的氨基酸序列转换为基于排序信号、氨基酸组成和功能基序的数字定位特征。转换之后，采用简单的k邻近分类器进行预测。

C. ProBank™ 蛋白数据库：ProBank™ 是一个综合的线上数据库，包含了来自186 个不同物种的 200 万个蛋白质的综合信息。该数据库提供了关于蛋白名称、序列、结构、功能、域、翻译后修饰、亚细胞定位、蛋白间相互作用等方面的深入信息。

D. 抗原设计工具：通过金斯瑞的 OptimumAntigen™ 设计程序生成的肽段，是使用业界最先进的抗原设计算法进行优化的。每个多肽都是通过几个蛋白数据库进行测定，以确定所需的表位特异性。OptimumAntigen™ 的另一优势是避免未曝光的抗原表位，用户指定所需的交叉反应活性的能力、强抗原性保证、识别所需实验的最佳结合位点，使用内置的多肽合成和溶解度教程，以及对设计抗原的免疫反应的保证。

金斯瑞的生物信息学工具



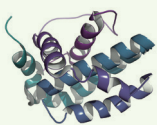
GenSmart™密码子优化

金斯瑞先进的、容易使用的基因设计和密码子优化技术



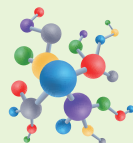
WoLF PSORT

先进的蛋白亚细胞定位预测工具



ProBank™

全面的蛋白线上数据库



OptimumAntigen™

利用目前最先进的抗原设计算法对多肽抗原进行优化



重组抗体纯化方案

在本章节中，我们介绍纯化哺乳动物表达系统生产的两种不同的分泌抗体，重组 IgM 和双特异性单克隆抗体 (bispecific monoclonal antibody, bsAb) 的纯化方案。强烈推荐使用 AKTA 品牌色谱系统（GE 公司）且在 4℃ 下进行整个纯化过程。

在 HEK293-6E 细胞中生产 IgM 的一般流程

A) 基因合成和质粒准备

1. 设计编码 IgM 的轻链、重链和 J 链的 DNA 载体，在 HEK93-6E 细胞系进行密码子优化，使蛋白产量最大化。
2. 合成步骤 A1 的目的 DNA 片段。
3. 将每个目的 DNA 片段亚克隆到一个表达载体，如 pTT5。
4. 根据表达体积的不同，选择适合 HEK293-6E 细胞系下游转染的 mini-、midi-、或者大抽高质量的 IgG 转染级别质粒。

B) HEK293-6E 细胞培养以及瞬时转染

1. HEK293-6E 细胞是用无血清的 FreeStyle™293 表达培养基 (Thermo, Cat.No.12338018) , 使用摇瓶 (Coring Inc.) 在 37℃, 5%CO₂ 的恒温摇床上悬浮培养。

2. 转染前一天, 种子细胞的密度维持在 1~1.5x10⁶ cells/ml。

3. 转染当天, 将质粒与瞬时转染试剂如聚乙烯亚胺 (PEI; polysciences, Inc., Cat.No. 23966-1) 混合, 并且用 DNA-PEI 复合物转染细胞。

- 金斯瑞推荐将重链、轻链和 J 链的 DNA 按 10:10:1 的比例混合, 因为每条链的表达水平和 IgM 的组装相关, 会影响功能性 IgM 的分泌。

4. 通常在表达过程中的 Day1 和 Day5 监测细胞活力和密度。

- 转染后 day5 细胞活力应超过 50%;

- 为了建立 IgM 的下游纯化方案, 通过对 day5 的细胞培养上清样品进行 SDS-PAGE, 评估 IgM 的表达量。使用标准比色蛋白染色技术对凝胶进行染色, 可直观的确定 IgM 的纯度和表达量。

5. Day6 收集含 IgM 的细胞培养液, 离心后用 0.22 μm 的滤器进行过滤, 澄清抗体样品。

C) IgM 纯化以及 QC 分析

1. 用 PBS, pH7.2 缓冲液 (GE, Cat. No. SH30256.01) 平衡 POROS™ Capture™ IgM 亲和柱 (Thermo, Cat.No.195289010) 。

2. 将过滤后的抗体样品载到色谱柱上。

3. 用 PBS, pH7.2 缓冲液清洗柱子。
4. 用 0.1M、pH3.0 的 glycine-HCl 洗脱 IgM, 并用 1M、pH9.0 的 Tris 中和洗脱液, 每 1ml 洗脱液中加入 75~100 μ l 中和液。
5. 合并洗脱后的 IgM 组分, 并置换 Buffer 到目的缓冲液中, 如含 5%~7% 蔗糖或 10%~20% 甘油的 pH7.2 的 PBS。
 - 如果观察到有沉淀, 在交换到最终的缓冲液之前先离心去除沉淀。
6. 通过 SDS-PAGE、Western blot 和/或 SEC-HPLC (TSKgelG3000SWxl column, 7.8 mm x 300 mm; TOSOH, Cat.No.0008541) 检测 IgM 的分子量和纯度, 采用 Bradford 蛋白测定等标准方法测定 IgM 浓度。
 - 如果 IgM 的纯度不理想, 可以采用进一步纯化以提高重组抗体的纯度。

使用金斯瑞高密度瞬时表达服务实现蛋白产量稳定增长

金斯瑞的高密度瞬时表达服务可以帮助您在哺乳动物细胞中实现重组抗体和蛋白的高表达。

高密度表达服务的关键特性

选择 基于 HEK293 和 CHO 细胞的高密度表达

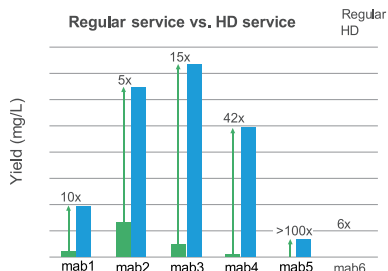
对比 正常和高密度表达细胞系

替代方法 针对难度和低表达量蛋白

产量提高 可达 100 倍

快速的生产周期 从序列到蛋白/抗体快至 10 周

重组抗体表达水平最高可到 3 g/L



高密度表达系统和正常表达系统生产的 6 个不同亚型重组抗体产量的对比

在 CHO-3E7 细胞中生产双特异性抗体的一般流程

A) 质粒准备

1. 设计编码双特异性抗体的 DNA 载体，在 CHO-3E7 细胞系进行密码子优化，使蛋白产量最大化。

为了避免免疫球蛋白链配对不匹配，我们建议使用重链和轻链域交换的 CrossMab 方法 (Roche)，或者引入突变强制重链配对的 “Knobs-into-holes” 方法。

2. 合成设计步骤 A1 的目的 DNA 片段。

3. 将每个目的 DNA 片段亚克隆到一个表达载体，如 pTT5。

4. 根据表达体积的不同，选择适合 CHO-3E7 细胞系下游转染的 mini-、midi-、或者大抽高质量的 IgG 转染级别质粒。

B) CHO-3E7 细胞培养以及瞬时转染

1. CHO-3E7 细胞是用无血清的 FreeStyle™CHO 表达培养基 (Thermo, Cat.No.12651014)，使用摇瓶 (Corning Inc.) 在 37°C，5%CO₂ 的恒温摇床上悬浮培养。

2. 转染前一天，种子细胞的密度维持在 $1\sim1.5\times10^6$ cells/ml。

3. 转染当天，用瞬时转染试剂如聚乙烯亚胺 (PEI; polysciences, Inc., Cat.No. 23966-1) 与质粒混合，并且用 DNA-PEI 复合物转染 CHO-3E7 细胞。

4. 通常在表达过程中的 Day1 和 Day5 监测细胞活力和密度。

- 转染后 day5 细胞活力应超过 50%;

- 为了建立 IgM 的下游纯化方案，通过对 day5 的细胞培养上清样品进行 SDS-PAGE，评估 IgM 的表达量。使用标准比色蛋白染色技术对凝胶进行染色，可直观的确定 IgM 的纯度和表达量。

5. Day6 收集含双特异性抗体的细胞培养液，离心、然后用 0.22 μm 的滤器进行过滤，澄清抗体样品。

金斯瑞的预制胶包括 SurePAGE™ Bis-Tris 凝胶，更高分辨率的 polyacrylamide 凝胶和 ExpressPlus™ 凝胶，该系列凝胶质量好并且经济实惠。

C) 双特异性抗体纯化及分析

1. 用 PBS，pH7.2 缓冲液 (GE, Cat. No. SH30256.01) 平衡 5ml Monofinity A 预装柱 (GenScript, Cat.No.L00433)。

2. 将过滤后的抗体样品载到色谱柱上。

- 如果需要，可使用 0.2M 的 Na_2HPO_4 或 0.2M NaH_2PO_4 (1M NaOH 或 1M HCL 也可用于调节 pH) 将 pH 调整到 7.0~7.4。

3. 用 PBS，pH7.2 缓冲液清洗柱子。

4. 用 0.05M、pH3.0 的柠檬酸钠洗脱蛋白，并用 1M、pH 9.0 的 Tris 中和洗脱液，每 1ml 洗脱液中加入 75~100 μl 中和液。

5. 合并洗脱后的双特异性抗体组分，并置换 Buffer 到目的缓冲液中，如含 5%~7% 蔗糖或 10%~20% 甘油的 pH7.2 的 PBS。

- 如果观察到有沉淀，在交换到最终的缓冲液之前先离心去除沉淀。

6. 通过 SDS-PAGE、Western blot 和/或 SEC-HPLC (TSKgelG3000SWxl column, 7.8 mm x 300 mm; TOSOH, Cat.No.0008541) 检测双特异性抗体的分子量和纯度, 用标准方法如 Bradford 蛋白测定法测定浓度。如果 SDS-PAGE 不能识别双特异性抗体, 也可以用质谱法进行鉴定。

- 如果 IgM 的纯度不理想, SEC 可以用于去除蛋白聚集和杂质。通常在纯化过程中的这一点, 杂质的分子量和目的抗体不同, 很容易通过 SEC 分离。极少数情况下, IEX 也可以用于分特异性抗体的提纯。

D) 分子排阻色谱纯化

1. 将从 C5 步骤获得的双特异性抗体浓缩到 ≤ 5 ml, 装入预先平衡的 HiLoad 6/600 Superdex 200 pg120ml 柱子 (GE, Cat.No. 28-9893-35)。

根据纯化过程的样品量选择合适的 SEC 柱子。如果样品 < 5 mg, 将蛋白浓缩到 ≤ 0.5 ml 并装入 Superdex 200 Increase 10/300 GL 24 ml 柱子 (GE, Cat.No. 28-9909-44); 如果样品 > 40 mg, 将蛋白浓缩到 ≤ 13 ml 并装入 HiLoad 6/600 Superdex 200 pg 320ml 柱子 (GE, Cat.No. 28-9893-36)。

2. 合并含有双特异性抗体的组分, 如果需要, 对抗体进行浓缩。

3. 最终的双特异性抗体可以按照 C 部分 (第六步) 的方法进行分析。

如果蛋白产量低, 你可以通过筛选各种双特异性平台来重新设计 DNA 载体, 或改变可变区的方向以及改变双特异性抗体的 linker 区域。或者, 金斯瑞的高密度瞬时表达服务可以帮助您实现满足您的研究应用的高表达的重组抗体。

参考文献：

1. Frenzel, A., Hust, M. & Schirrmann, T. Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in Immunology* (2013). doi:10.3389/fimmu.2013.00217
2. Skerra, A. & Plückthun, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science* (80-.). (1988). doi:10.1126/science.3285470
3. Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R. & Horwitz, A. H. Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* (80-.). (1988). doi:10.1126/science.3285471
4. Rouet, R. *et al.* Expression of high-affinity human antibody fragments in bacteria. *Nat. Protoc.* **7**, 364 (2012).
5. Sklar, J. G., Wu, T., Kahne, D. & Silhavy, T. J. Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in Escherichia coli. *Genes Dev.* **21**, 2473–2484 (2007).
6. Li, J. *et al.* A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. *J. Immunol. Methods* **318**, 113–124 (2007).
7. Bergman, L. W., Harris, E. & Kuehl, W. M. Glycosylation causes an apparent block in translation of immunoglobulin heavy chain. *J. Biol. Chem.* (1981).
8. Montaña, R. F. & Morrison, S. L. Influence of the Isotype of the Light Chain on the Properties of IgG. *J. Immunol.* **168**, 224 LP-231 (2002).
9. Hershberg, R. & Petrov, D. A. Selection on Codon Bias. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 287–299 (2008).
10. Quax, T. E. F., Claassens, N. J., Söll, D. & van der Oost, J. Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. *Molecular Cell* (2015). doi:10.1016/j.molcel.2015.05.035
11. Burgess-Brown, N. A. *et al.* Codon optimization can improve expression of human genes in Escherichia coli: A multi-gene study. *Protein Expr. Purif.* **59**, 94–102 (2008).
12. Qian, W., Yang, J.-R., Pearson, N. M., Maclean, C. & Zhang, J. Balanced Codon Usage Optimizes Eukaryotic Translational Efficiency. *PLOS Genet.* **8**, e1002603 (2012).
13. Jäger, V. *et al.* High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* **13**, 52 (2013).
14. Loignon, M. *et al.* Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* **8**, 65 (2008).
15. Fischer, S., Handrick, R. & Otte, K. The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnology Advances* (2015). doi:10.1016/j.biotechadv.2015.10.015
16. Kim, J. Y., Kim, Y. G. & Lee, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2012). doi:10.1007/s00253-011-3758-5
17. Barnes, L. M., Bentley, C. M. & Dickson, A. J. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. *Cytotechnology* (2000). doi:10.1023/A:1008170710003

16. Kim, J. Y., Kim, Y. G. & Lee, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2012). doi:10.1007/s00253-011-3758-5
17. Barnes, L. M., Bentley, C. M. & Dickson, A. J. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. *Cytotechnology* (2000). doi:10.1023/A:1008170710003
18. Jarvis, D. L. & Finn, E. E. Modifying the Insect Cell N-Glycosylation Pathway with Immediate Early Baculovirus Expression Vectors. *Nat. Biotechnol.* (1996). doi:10.1038/nbt1096-1288
19. Hollister, J. R., Shaper, J. H. & Jarvis, D. L. Stable expression of mammalian β 1,4-galactosyltransferase extends the N-glycosylation pathway in insect cells. *Glycobiology* (1998). doi:10.1093/glycob/8.5.473
20. Ailor, E. & Betenbaugh, M. J. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 142–145 (1999).
21. Hu, X. *et al.* Optimisation of production of a domoic acid-binding scFv antibody fragment in *Escherichia coli* using molecular chaperones and functional immobilisation on a mesoporous silicate support. *Protein Expr. Purif.* 52, 194–201 (2007).
22. Levy, R. *et al.* Enhancement of antibody fragment secretion into the *Escherichia coli* periplasm by co-expression with the peptidyl prolyl isomerase, FkpA, in the cytoplasm. *J. Immunol. Methods* 394, 10–21 (2013).
23. Yokoyama, N. *et al.* Co-expression of human chaperone Hsp70 and Hsdj or Hsp40 co-factor increases solubility of overexpressed target proteins in insect cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1493, 119–124 (2000).
24. Teng, C. Y., Chang, S. L., Van Oers, M. M. & Wu, T. Y. Enhanced protein secretion from insect cells by co-expression of the chaperone calreticulin and translation initiation factor eIF4E. *Mol. Biotechnol.* (2013). doi:10.1007/s12033-012-9545-4
25. Shukla, A. A. & Thömmes, J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol.* 28, 253–261 (2010).
26. Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M. & Wurm, F. M. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: State of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters* (2007). doi:10.1007/s10529-006-9297-y
27. Cervera, L. *et al.* Selection and optimization of transfection enhancer additives for increased virus-like particle production in HEK293 suspension cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2015). doi:10.1007/s00253-015-6842-4
28. Roque, A. C. A., Silva, C. S. O. & Taipa, M. Â. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. *J. Chromatogr. A* 1160, 44–55 (2007).
29. Low, D., O'Leary, R. & Pujar, N. S. Future of antibody purification. *J. Chromatogr. B* 848, 48–63 (2007).
30. Liu, H., Gaza-Bulseco, G., Chumsae, C. & Newby-Kew, A. Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1 antibodies on non-reducing SDS-PAGE. *Biotechnol. Lett.* (2007). doi:10.1007/s10529-007-9449-8

www.GenScript.com.cn

南京市江宁高新园雍熙路28号

电话: 400-025-8686-5821

邮箱: protein@genscript.com.cn

