

Аффинный носитель для очистки иммуноглобулинов, созданный на основе рекомбинантного белка G и кросс-сшитой агарозы Sepharose CL-4B

Общие сведения о носителе.

Матрица. Для создания носителя используется сефароза Seplife CL-4B SunResin (Китай) представляющая собой кросс-сшитую агарозу (4%-ная кросс-сшивка). Сефароза CL-4B и носители, приготовленные на ее основе, отличается высокой стабильностью, механической прочностью, стойкостью к разного рода химическим агентам, в том числе к органическим растворителям.

Белок G. Белок G, интегральный белок клеточной стенки стрептококков групп G и C, способен с высокой эффективностью и избирательностью обратимо связывать иммуноглобулины млекопитающих. Природный белок имеет молекулярную массу ~65кДа, от 1 до 3 центров связывания альбумина и 2 либо 3 участка связывания иммуноглобулинов. Для создания аффинного носителя компания Хайтест использует рекомбинантный белок G (молекулярная масса ~34кДа), не содержащий участков связывания альбумина и обладающий высоким сродством и ёмкостью по отношению к иммуноглобулинам (одна молекула белка G связывает до трёх молекул иммуноглобулинов).

Метод иммобилизации. Белок G ковалентно иммобилизован на сефарозе, активированной бромциановым методом. Плотность иммобилизации: 3 мг белка G на 1 мл сефарозы.

Хранение. Носитель поставляется в виде суспензии в 20% этаноле. Срок хранения – не менее 2 лет при +4-8С.

Ёмкость. 1 мл аффинного носителя способен связать до 20 мг поликлональных антител различных организмов и, в зависимости от изотипа, до 15 мг моноклональных мышинных антител.

Тип антител	Характеристика антител	Ёмкость носителя, мг антител/ 1 мл носителя
Моноклональные мышинные антитела	изотип	
	IgG1	7,5
	IgG2a	11,5
	IgG2b	15,5
Поликлональные антитела	организм	
	человек	18
	кролик	>20
	коза	>20

Так, мышинные IgG1, как правило, обладают меньшим сродством к белку G, чем IgG изотипов 2a и 2b. В приведённой таблице ёмкость указана для конкретных клонов антител; ёмкость носителя может быть различной для различных клонов.

Стабильность. Носитель гарантированно сохраняет свои свойства при следующих воздействиях: инкубация в течение 1 недели при комнатной температуре в глициновом буфере, pH 2,0, в 1% растворе ДСН, в 70% этаноле, инкубация в течение 2 часов в 8М мочеvine.

Также носитель выдерживает не менее 100 циклов смены буферной системы (от фосфатно-солевого буфера, pH 7,4, к глициновому буферу, pH 2,0).

При соблюдении правил работы с носителем на одном образце носителя можно проводить более 100 циклов очистки иммуноглобулинов.

Общие рекомендации по применению носителя.

Подготовка образцов. Присутствие в образцах иных белков и органических молекул не оказывает существенного влияния на связывание иммуноглобулинов. Носитель позволяет эффективно очищать иммуноглобулины класса G из неразбавленной плазмы или сыворотки крови, а также из кондиционированных культуральных сред и из асцитной жидкости.

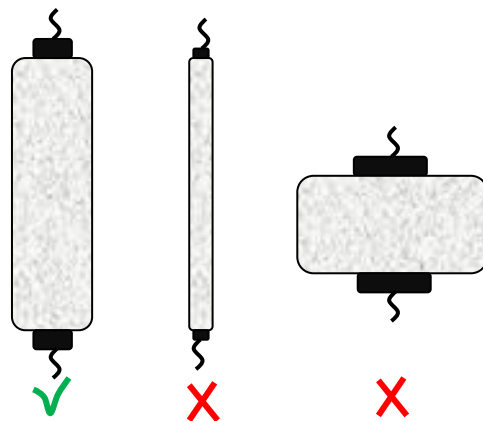
Особенности работы с разными образцами.

- **Асцитная жидкость.** Перед очисткой иммуноглобулинов из асцитной жидкости проводят высаливание, чтобы получить сконцентрированную фракцию, содержащую преимущественно иммуноглобулины. Для этого к раствору добавляют сульфат аммония до 50% насыщения (соответствует ~2М (NH₄)₂SO₄), и перерастворяют осадок в буфере нанесения так, чтобы конечная концентрация белка не превышала 10-15 мг/мл. Как правило, используют объём буфера нанесения, равный 10-20 объёмам осадка.
- **Сыворотка или плазма крови.** Предварительное концентрирование также рекомендуется (желательная процедура) при выделении иммуноглобулинов из сыворотки или плазмы крови иммунизированных животных. Содержание иммуноглобулинов класса G в крови человека – 5-15 мг/мл. Таким образом, в данном случае рекомендуется исходить из соотношения 2-3 мл плазмы/сыворотки на 1 мл носителя.
- **Культуральная среда.** Перед нанесением на колонку культуральной среды необходимо убедиться, что её pH не превышает 7,5, и при необходимости довести pH до нейтральных значений либо диализовать среду против буфера нанесения.

Перед нанесением на колонку раствор необходимо профильтровать, используя бумажные фильтры или мембранные фильтры с размером пор 0,22 или 0,45 мкм.

Иммуноглобулины, как правило, достаточно стабильны, и их выделение можно проводить при комнатной температуре.

Подготовка колонки. Размер хроматографической колонки необходимо подбирать так, чтобы высота столба носителя составляла приблизительно от 1 до 6 диаметров колонки.



Выбор объёма носителя зависит от ёмкости носителя по данному типу иммуноглобулинов и от количества иммуноглобулинов в растворе нанесения.

В колонку рекомендуется вносить 30–50%-ную суспензию носителя в буфере промывки или нанесения. Частицы носителя должны осесть равномерно, под действием силы тяжести или при медленном пропускании буфера через колонку. Важно, чтобы носитель располагался в колонке равномерно, без пузырей воздуха.

Перед нанесением носитель необходимо сначала промыть 0,1М глициновым буфером, рН 2,0 (5 объемов носителя), а затем уравновесить буфером нанесения (5–10 объемов носителя). В качестве буфера нанесения рекомендуется использовать фосфатно-солевой буфер либо другие буферные системы с нейтральным значением рН (6,5-7,5) и концентрацией NaCl от 50 до 250 мМ.

Нанесение раствора иммуноглобулинов на колонку. В ходе хроматографии рекомендуется следить за содержанием белка в выходящем с колонки растворе, используя спектрофотометрический детектор (длина волны 280 нм).

При нанесении рекомендуется собирать сходящий с колонки раствор и определять содержание в нём иммуноглобулинов, т. к. при превышении ёмкости колонки часть иммуноглобулинов может не связаться с носителем.

По окончании нанесения необходимо промывать носитель буфером нанесения до тех пор, пока оптическая плотность выходящего с колонки раствора не выйдет на базовый уровень.

Элюция иммуноглобулинов с носителя. В качестве буфера элюции рекомендуется использовать буферы с рН 2,0-3,0. Как правило, используют глициновый буфер в концентрации 50-100мМ, т.к. его буферная ёмкость в данном диапазоне значений рН наибольшая.

Иммуноглобулины чувствительны к низким значениям рН, поэтому непосредственно после элюции их с носителя необходимо довести рН элюата до нейтральных значений, например, добавлением 1М Трис-НСl, рН 9,0.

Не рекомендуется хранить иммуноглобулины в буфере элюции. Предпочтительно переводить антитела в фосфатно-солевой буфер, диализом или гель-фильтрацией, и добавлять к раствору консервант, например, 0,1% азид натрия.

Консервация носителя. После работы с носителем рекомендуется промыть его 5-ю объемами носителя 0,1М глицинового буфера рН 2,0, затем 5-ю объемами деионизированной воды

и далее 2-мя объёмами носителя раствора хранения (20% этанол). Для краткосрочного (до 1 месяца) хранения носителя допускается использовать фосфатно-солевой буфер, содержащий консервант, например, 0,1% азид натрия. Хранить носитель рекомендуется при +4–8 °С.

Ниже приведены **протоколы выделения иммуноглобулинов** из различных смесей (асцитная жидкость, сыворотка и плазма крови, культуральная среда) и примеры очисток иммуноглобулинов по этим протоколам. Приведённые выше Общие Рекомендации следует соблюдать для всех предлагаемых протоколов.

Очистка моноклонального мышинового антитела из асцитной жидкости

Примечание к расчёту необходимого количества носителя:

1) в случае моноклональных антител ёмкость может сильно различаться от клона к клону. Поэтому рекомендуется определять ёмкость для каждого конкретного клона. Для приблизительной оценки можно использовать следующие значения (из расчёта на 1 мл носителя):

- 5–8 мг IgG1
- 8–10 мг IgG2a
- 10–15 мг IgG2b

Подготовка раствора нанесения:

- а. Перед нанесением на колонку проведите высаливание иммуноглобулинов из асцитной жидкости (сульфат аммония до степени насыщения 50%). Осадок белка растворите в фосфатно-солевом буфере (10 мМ KH_2PO_4 , 150 мМ NaCl , pH 7,4). Общая концентрация белка в растворе нанесения не должна превышать 10–15 мг/мл. Оценивать концентрацию белка в растворе нанесения удобно спектрофотометрическим методом, приняв коэффициент поглощения ϵ для белковой смеси с концентрацией 1 мг/мл равным 1.
 - б. Профильруйте белковый раствор через бумажный или мембранный фильтр.
- 2)** Нанесите белковый раствор на колонку. Соберите фракцию несвязавшихся с носителем белков, т.к. при превышении ёмкости колонки часть иммуноглобулинов может оказаться в этой фракции. По окончании нанесения промойте носитель фосфатно-солевым буфером до выхода оптической плотности элюата на базовый уровень.
 - 3)** Элюируйте моноклональные антитела 0,1 М глициновым буфером, pH 2,5. Сразу после элюции доведите pH элюата до нейтральных значений добавлением 1М Трис-HCl, pH 9,0.
 - 4)** Законсервируйте носитель согласно «общим рекомендациям».

Пример очистки моноклонального мышинового антитела из асцитной жидкости.

Провели высаливание 15 мл асцитной жидкости (сульфат аммония до степени насыщения 50%). Осадок перерастворили в 20 мл фосфатно-солевого буфера. Конечная концентрация белка в

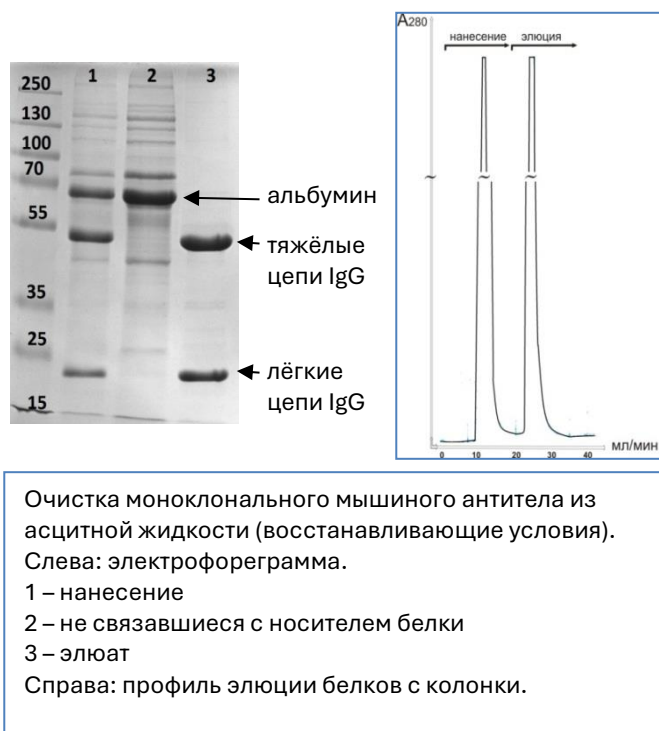
полученном растворе составила приблизительно 10 мг/мл. Раствор профильтровали через бумажный фильтр.

2 мл профильтрованного раствора нанесли на колонку диаметром 10 мм, содержащую 1 мл носителя.

По окончании нанесения носитель промывали фосфатно-солевым буфером до тех пор, пока оптическая плотность выходящего с колонки раствора не вышла на базовый уровень.

Иммуноглобулины элюировали с колонки 0,1 М глициновым буфером, рН 2,5. Элюат немедленно нейтрализовали добавлением 2М раствора Трис.

Раствор нанесения, не связавшуюся с носителем фракцию и элюат анализировали методом ДСН-ЭФ в 12,5% ПААГ.



Выделение иммуноглобулинов из сыворотки или плазмы крови человека

1) Примечание к расчёту необходимого количества носителя:

Содержание иммуноглобулинов класса G в крови человека – 5–15 мг/мл. Таким образом, при нанесении рекомендуется исходить из соотношения 2–3 мл плазмы/сыворотки на 1 мл носителя.

2) Подготовка раствора нанесения:

Профильтруйте плазму или сыворотку через бумажный или мембранный фильтр.

3) Нанесите профильтрованный образец на колонку. Соберите фракцию несвязавшихся с носителем белков, т. к. при превышении ёмкости колонки часть иммуноглобулинов может оказаться в этой фракции. По окончании нанесения промойте носитель фосфатно-солевым буфером до тех пор, пока оптическая плотность выходящего с колонки раствора не выйдет на базовый уровень.

- 4) Элюируйте иммуноглобулины 0,1 М глициновым буфером, рН 2,5. Сразу после элюции доведите рН элюата до нейтральных значений добавлением 1М Трис-НCl, рН 9,0.
- 5) Законсервируйте носитель согласно «общим рекомендациям».

Пример выделения иммуноглобулинов из плазмы крови человека.

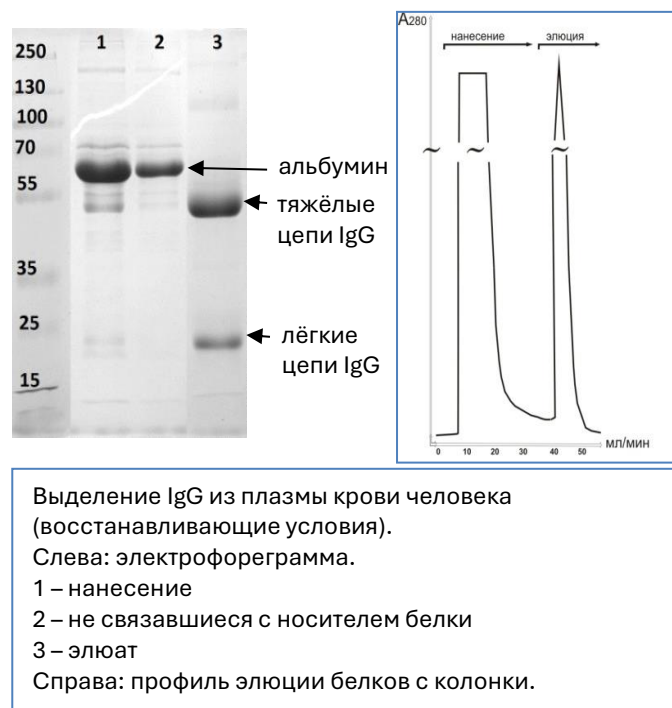
3 мл ЭДТА-плазмы профильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Профильтрованную плазму нанесли на колонку диаметром 10 мм, содержащую 1 мл носителя.

По окончании нанесения носитель промывали фосфатно-солевым буфером до тех пор, пока оптическая плотность выходящего с колонки раствора не вышла на базовый уровень.

Иммуноглобулины элюировали с колонки 0,1 М глициновым буфером, рН 2,0. Элюат немедленно нейтрализовали добавлением 2М раствора Трис.

Раствор нанесения, не связавшуюся с носителем фракцию и элюат анализировали методом ДСН-ЭФ в 12,5% ПААГ.



Выделение поликлональных антител из сыворотки крови различных животных

- 1) При расчёте необходимого количества носителя учитывайте его ёмкость: 1 мл носителя связывает около 20 мг поликлональных антител.
- 2) Подготовка раствора нанесения:
 - а. Перед нанесением на колонку необходимо провести высаливание иммуноглобулинов из сыворотки (сульфат аммония до степени насыщения 50%). Осадок белка растворите в фосфатно-солевом буфере (10 мМ КН₂РO₄, 150 мМ NaCl,

pH 7,4). Для полного растворения используйте объём буфера нанесения, равный 10-20 объёмам осадка. Общая концентрация белка в растворе нанесения не должна превышать 10-15 мг/мл.

в. Профильруйте белковый раствор через бумажный или мембранный фильтр.

- 3) Нанесите профильтрованный образец на колонку. Соберите фракцию несвязавшихся с носителем белков, т.к. при превышении ёмкости колонки часть иммуноглобулинов может оказаться в этой фракции. По окончании нанесения промойте носитель фосфатно-солевым буфером до выхода оптической плотности выходящего с колонки раствора на базовый уровень.
- 4) Элюируйте поликлональные антитела 0,1 М глициновым буфером, pH 2,5. Сразу после элюции доведите pH элюата до нейтральных значений добавлением 1М Трис-HCl, pH 9,0.
- 5) Законсервируйте носитель согласно «общим рекомендациям».

Пример выделения поликлональных антител из сыворотки крови кролика.

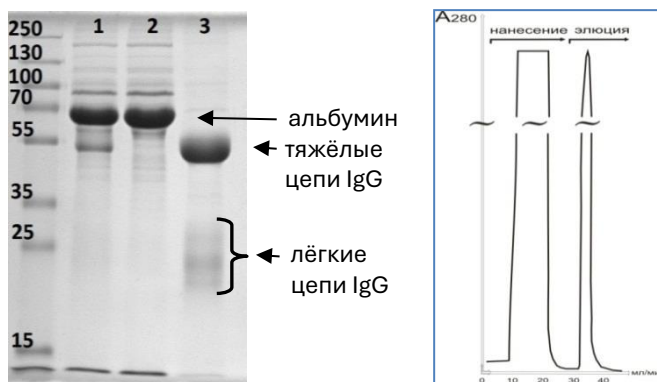
Провели высаливание 5 мл сыворотки (сульфат аммония до степени насыщения 50%). Осадок перерастворили в 50 мл фосфатно-солевого буфера. Конечная концентрация белка составила приблизительно 5,5 мг/мл. Полученный раствор профильтровали через бумажный фильтр.

10 мл профильтрованного раствора нанесли на колонку диаметром 10 мм, содержащую 1 мл носителя.

По окончании нанесения носитель промывали фосфатно-солевым буфером до тех пор, пока оптическая плотность выходящего с колонки раствора (280 нм) не вышла на базовый уровень.

Иммуноглобулины элюировали с колонки 0,1 М глициновым буфером, pH 2,5. Элюат немедленно нейтрализовали добавлением 2М раствора Трис.

Раствор нанесения, не связавшуюся с носителем фракцию и элюат анализировали методом ДСН-ЭФ в 12,5% ПААГ.



Выделение поликлональных антител из сыворотки крови кролика (восстанавливающие условия).

Слева: электрофореграмма.

1 – нанесение

2 – не связавшиеся с носителем белки

3 – элюат. Гетерогенность лёгких цепей типична для поликлональных антител.

Справа: профиль элюции белков с колонки.

Выделение рекомбинантных моноклональных антител из культуральной среды:

1) Подготовка раствора нанесения:

- a. pH раствора нанесения должен находиться в нейтральной или слабокислой области (pH 6–7,5). Перед нанесением измерьте значение pH культуральной среды и при необходимости измените его.
- b. Профильтруйте содержащую антитела культуральную среду через бумажный или мембранный фильтр.

2) Нанесите профильтрованный образец на колонку. Соберите фракцию несвязавшихся с носителем белков, т. к. при превышении ёмкости колонки часть иммуноглобулинов может оказаться в этой фракции. По окончании нанесения промойте носитель фосфатно-солевым буфером до выхода оптической плотности выходящего с колонки раствора на базовый уровень.

3) Элюируйте моноклональные антитела 0,1 М глициновым буфером, pH 2,8. Сразу после элюции доведите pH элюата до нейтральных значений добавлением 1М Трис-HCl, pH 9,0.

4) Законсервируйте носитель согласно «общим рекомендациям».

NB: Аналогичный протокол применим для очистки рекомбинантных Fab-фрагментов. Ёмкость носителя по отношению к Fab-фрагментам – около 0,8 мг Fab-фрагментов на 1 мл носителя*.

* данное значение усреднено из результатов двух экспериментов.

Пример выделения рекомбинантных гуманизированных антител, экспрессированных в клетках линии CHO, из кондиционированной бессывороточной культуральной среды:

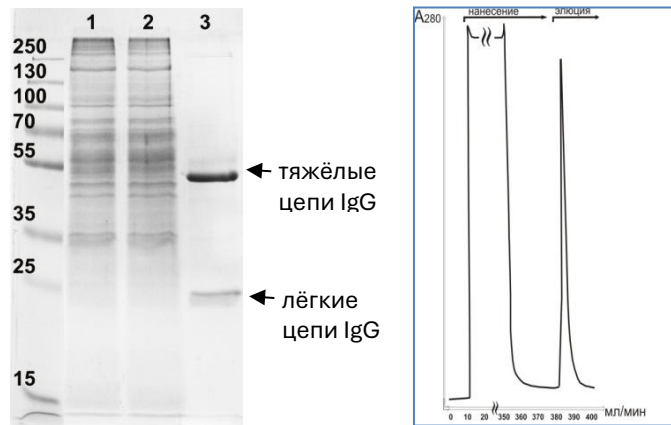
350 мл кондиционированной культуральной среды с pH 7 профильтровали через бумажный фильтр.

Профильтрованный раствор нанесли на колонку диаметром 10 мм, содержащую 1 мл носителя.

По окончании нанесения носитель промывали фосфатно-солевым буфером до тех пор, пока оптическая плотность выходящего с колонки раствора (280 нм) не вышла на базовый уровень.

Иммуноглобулины элюировали с колонки 0,1 М глициновым буфером, pH 2,8. Элюат немедленно нейтрализовали добавлением 2М раствора Трис.

Раствор нанесения, не связавшуюся с носителем фракцию и элюат анализировали методом ДСН-ЭФ в 12,5% ПААГ.



Выделение рекомбинантных гуманизированных антител из культуральной среды (восстанавливающие условия).

Слева: электрофореграмма.

1 – нанесение

2 – не связавшиеся с носителем белки

3 – элюат

Справа: профиль элюции белков с колонки.