

30 novembre 2017

**Mots-clés :**

terre de diatomées, filtration,  
IMAC, culture de cellules d'insectes,  
purification de protéines

# Réduction du temps de préparation d'échantillons de cultures de cellules d'insectes Sf9 en utilisant Sartoclear Dynamics® Lab

John Cashman

Département de biologie et biochimie. Université de Bath, BA2 7AY, Royaume-Uni

Correspondence

E-Mail: [j.s.cashman@bath.ac.uk](mailto:j.s.cashman@bath.ac.uk)

## Résumé

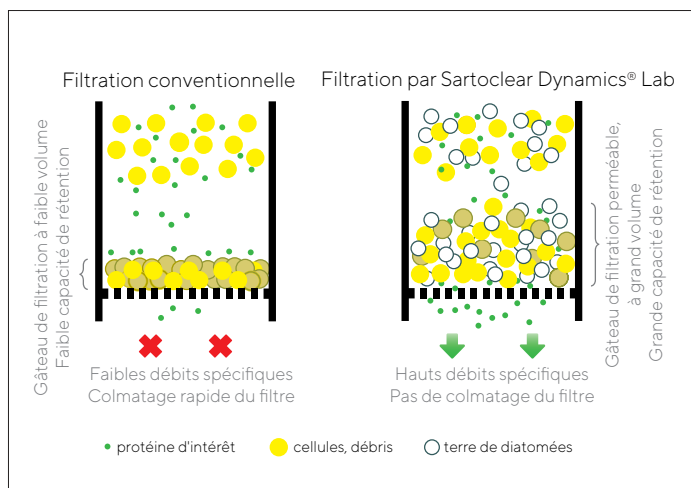
Dans cette étude, j'ai testé le kit Sartoclear Dynamics® Lab V500 en tant que nouvelle méthode pour la clarification des milieux de culture cellulaire précédant la purification d'une protéine recombinante exprimée par des cellules Sf9. Le vecteur à partir duquel cette protéine est exprimée code une séquence de signaux pour assurer la sécrétion de la protéine provenant des cellules après la dite expression. Il est donc nécessaire d'éliminer les cellules du milieu de culture avant de procéder à la purification de la protéine, mais l'utilisation de la méthode traditionnelle dans ce but (une centrifugation suivie d'une filtration) peut prendre beaucoup de temps.

Ici, je démontre que le kit Sartoclear Dynamics® Lab offre un gain de temps considérable par rapport aux méthodes conventionnelles, n'ayant constaté aucun effet notable sur le rendement en protéines, ce qui fait de ce produit un outil complémentaire idéal pour tout laboratoire cherchant à améliorer la productivité et le rendement de ses systèmes d'expression de cellules d'insectes.

# Introduction

Connaître la structure tridimensionnelle des protéines est la clé pour comprendre leurs fonctions et, pour celles impliquées dans des maladies, ces informations peuvent aider à concevoir de nouveaux médicaments avec des cibles extrêmement spécifiques.

La disponibilité de protéines pures est importante pour la détermination de leur structure, et il est aujourd'hui courant dans grand nombre de laboratoires d'utiliser de nombreux systèmes d'expression de protéines différents. Leurs choix dépendent généralement de l'origine de l'espèce, de la ou des modification(s) requise(s) et du rendement de la protéine cible. L'utilisation de séquences de signaux dans des vecteurs d'expression conduit à la sécrétion avec une pureté relativement élevée des protéines d'intérêt dans les milieux de culture cellulaire. Ceci évite le besoin en coûteux équipements de désintégration cellulaire et minimise le temps nécessaire à l'optimisation des protocoles de purifications<sup>1</sup>. Cependant, un inconvénient majeur de cette approche réside dans le temps nécessaire pour clarifier de grands volumes de milieux de culture cellulaire avant la purification. La taille des centrifugeuses disponibles peut soit limiter les volumes de culture, soit augmenter le temps de clarification lorsque l'on doit effectuer plusieurs étapes de centrifugation. J'ai également relevé de faibles débits lors de la filtration des milieux de culture de cellules d'insectes, même après l'élimination des cellules par centrifugation. Cela correspond probablement à la présence de particules submicroniques qui, concernant les cultures de cellules de mammifères, se sont avérées être restées en suspension après la centrifugation et ont causé le colmatage des membranes de filtration<sup>2</sup>. La gamme de produits de filtration Sartoclear Dynamics® Lab a été initialement développée pour réduire de manière significative le temps nécessaire à la récolte de cellules de mammifères issues de cultures cellulaires. L'ajout de terre de diatomées aux cultures favorise la formation d'un gâteau de filtration poreux au-dessus du filtre et évite ainsi son colmatage, permettant l'élimination rapide des cellules du milieu de culture cellulaire (figure 1). L'étape de centrifugation devient inutile, esquivant ainsi les problèmes de capacité et de disponibilité la concernant.



**Figure 1 : Principes de clarification des cultures cellulaires en utilisant la méthode conventionnelle et celle de filtration sur diatomées du Sartoclear Dynamics® Lab.**

Dans le cadre de mes recherches, les protéines d'intérêt sont exprimées dans des cellules d'insectes et sécrétées en dehors de celles-ci. Elles doivent donc être purifiées du milieu de culture. J'ai ainsi testé les performances du kit Sartoclear Dynamics® Lab pour la clarification de milieux de cultures de cellules d'insectes contenant une protéine cible, puis j'ai comparé les résultats avec ma méthode standard.

## Matériels et méthodes

La protéine d'intérêt a été exprimée à l'aide d'un système d'expression de baculovirus. Les cellules Sf9 (ThermoFisher Scientific, 11496015) ont été cultivées dans un milieu de culture cellulaire Sf-900™ II SFM (ThermoFisher Scientific, 10902088), conformément aux instructions du fabricant. Une culture en suspension de 1,5 L a été infectée par un baculovirus codant le gène correspondant à la protéine d'intérêt. Elle a ensuite été incubée à 27°C sous agitation à 240 tr/min pendant 90 heures.

La culture a été récoltée et divisée en trois aliquotes de 470 mL pour la clarification et la purification des protéines. L'une d'elles a été clarifiée grâce à la méthode standard : Les cellules ont été éliminées par centrifugation à 5 000 g pendant 15 minutes et le surnageant a été passé à travers un filtre en PES de 0,22 µm. Les deux autres aliquotes ont été clarifiées en utilisant les kits Sartoclear Dynamics® Lab : respectivement, 5 et 10 g de terre de diatomées (DE) ont été ajoutés à la culture qui a été ensuite mélangée pour obtenir une suspension homogène. Chacun de ces deux mélanges de culture de cellules/terre de diatomées a été filtré aussitôt sur un filtre en PES de 0,22 µm inclus dans le kit.

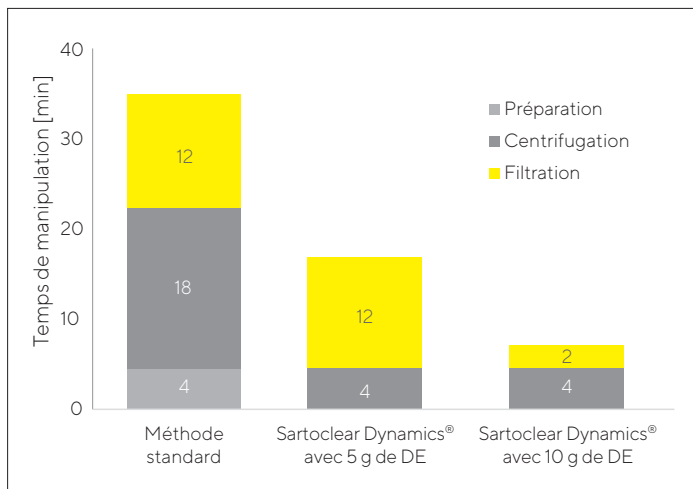
Les protéines de chaque échantillon clarifié ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC). Le milieu a été passé dans

5 colonnes d'1 mL HisTrap Excel (GE Healthcare Life Sciences, 17-3712-05), liées en série et préconditionnées avec une solution tampon HTE (50 mM HEPES, 500 mM de chlorure de sodium, pH 7.4). La colonne a été rincée avec 100 mL de solution tampon HTE et 75 mL de solution tampon HTE contenant 25 mmol/L d'imidazole pour éliminer les contaminants, puis la protéine d'intérêt a été éluée avec 25 mL de solution tampon HTE contenant 500 mmol/L d'imidazole.

## Résultats et discussion

Lors de la récolte de la culture cellulaire, la densité mesurée était de  $1,5 \times 10^6$  cellules totales par millilitre.

Le temps total passé à clarifier chaque échantillon de culture cellulaire a été mesuré (figure 2). Il a été divisé en 3 : le temps de préparation (à savoir, mesurer les volumes de culture et équilibrer les tubes à centrifuger pour la méthode standard ou ajouter la terre de diatomées à l'échantillon en utilisant le kit Sartoclear Dynamics® Lab), le temps de centrifugation (pour la méthode standard uniquement) et le temps de filtration (pour les deux méthodes).

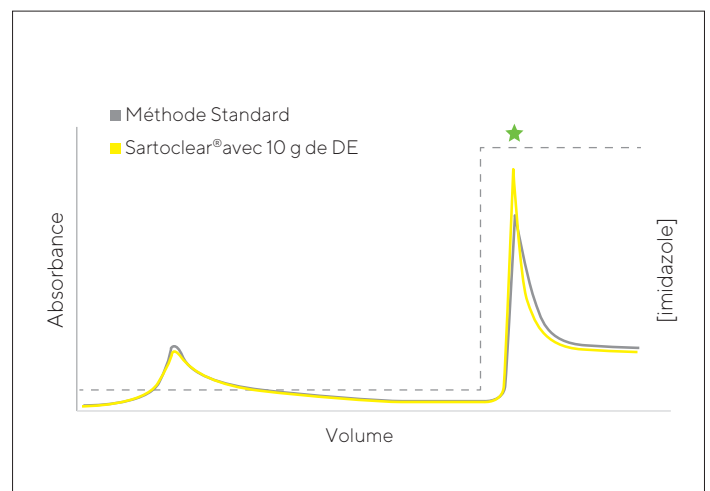


**Figure 2 : Comparaison des méthodes de clarification en temps de manipulation. Le Sartoclear Dynamics® Lab réduit considérablement le temps nécessaire pour clarifier les milieux de culture cellulaire.**

La préparation du milieu de culture cellulaire clarifié, en utilisant la méthode standard centrifugation-filtration, a pris environ 34 minutes en tout. Bien que le temps de filtration du Sartoclear Dynamics® Lab conjugué à 5 g de DE n'a pas été réduit par rapport à la méthode standard, l'absence d'étape de centrifugation a réduit le temps total de préparation de plus de 53 %. L'augmentation de la quantité de DE, passant de 5 à 10 g, a permis de réduire le temps total de préparation, égal à 6 minutes in fine, soit un gain de temps supérieur à 82 %.

Concernant le débit, le temps de filtration, dans le cas de la méthode standard, de celle avec 5 g de DE et de celle avec 10 g de DE, correspond respectivement à un débit de 2,35 ; 2,35 et 14,1 L/h. Dans l'échantillon préparé avec 5 g de DE, une certaine sédimentation de la terre de diatomées et des cellules a été observée en cours de filtration. Il est possible qu'une sédimentation précoce de la terre de diatomées ait provoqué une certaine réduction du débit. Bien qu'il soit clair qu'une majeure partie du mélange DE/cellules puisse être mise en suspension à nouveau lorsque l'on utilise des quantités de DE moins importantes, en agitant doucement l'unité de filtration pour ramener le débit à son niveau initial, il est peut-être plus prudent d'utiliser 10 g de DE pour cette méthode dans le cas de filtration de cultures ayant des densités cellulaires plus élevées.

Pour tester l'effet du kit Sartoclear Dynamics® Lab sur le rendement protéinique, les protéines de chaque échantillon ont été purifiées par IMAC et la taille des pics d'éluion a été comparée (figure 3). L'échantillon préparé avec le système Sartoclear Dynamics® Lab et 10 g de DE a effectivement généré un pic d'éluion avec une absorption maximale plus élevée que dans le cas des échantillons préparés avec la méthode standard, ce qui est potentiellement indicateur d'une plus grande présence de protéines. Cependant, le pic d'éluion provenant de l'échantillon standard était légèrement plus large en comparaison (c'est-à-dire dans un volume légèrement plus élevé), de sorte que le rendement protéinique n'était essentiellement pas affecté par le mélange de l'échantillon avec DE.



**Figure 3 : Les pics d'éluion des protéines (★) étaient comparables entre les échantillons préparés avec la méthode standard de centrifugation-filtration et le système de filtration Sartoclear Dynamics® Lab avec 10 g de DE.**

## Conclusion

Sartoclear Dynamics® Lab permet une clarification plus rapide des milieux de culture cellulaire. La non-nécessité d'une centrifugeuse et les gains de temps significatifs obtenus en utilisant ce système de filtration peuvent permettre une augmentation considérable en termes de productivité et de capacité. Il semble n'y avoir aucun effet négatif sur le rendement en protéines une fois le mélange de l'échantillon avec de la terre de diatomées effectué.

Sartoclear Dynamics® Lab est disponible dans une grande variété de formats pour la clarification des milieux de culture cellulaire, avec des kits pour la filtration de volumes allant de 15 mL à 1 L. Cela fait que cette gamme est adaptée à un large éventail d'exigences.

## Références

- 1 Berrow NS, Alderton D, Sainsbury S. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(6):e45. doi:10.1093/nar/gkm047
- 2 Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *mAbs*. 2010;2(5):480-499. doi:10.4161/mabs.2.5.12645.

## Abréviations


- DE diatomaceous earth = terre de diatomées  
IMAC immobilized metal affinity chromatography = chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés  
PES polyethersulfone = polyéthersulfone

**Germany**

Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG  
Otto-Brenner-Strasse 20  
37079 Goettingen  
Phone +49 551 308 0

**USA**

Sartorius Corporation  
565 Johnson Avenue  
Bohemia, NY 11716  
Phone +1 631 254 4249  
Toll-free +1 800 635 2906

 For further contacts, visit  
[www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)