

利用 Hamilton® Microlab STAR 和多种湿树脂实现高一致性小型化实验室工作流程的蛋白质自动纯化

Matthew Manter, Caleb Schlacter, Todd Mullis, Sunil Hwang, Nikki Sitasuwan, L. Andrew Lee* Integrated Micro-Chromatography Systems, LLC. Columbia, SC



简介

分散移液微萃取枪头是一种专利的微萃取平台，利用移液管尖端内的湍流混合，增加松散树脂和液体样品之间的相互作用时间。将这一核心技术与高度灵活的自动化液体处理系统- Hamilton 机器人技术相结合，能够以一致的方式快速富集抗体、重组蛋白和其他各种标记蛋白。与传统的色谱柱依赖于固定床不同，分散移液枪头含有松散的树脂，在两个多孔过滤器之间有很大的空隙。这里，我们以从 1 mL 等分试样中纯化毫克级抗体，以及以 96 孔板从微培养物中纯化 His 标记的重组蛋白证明了 Hamilton STAR 上微提取平台的灵活性。“准备就绪”的工作流程提供洗脱蛋白质，通过液体处理平台上的高通量缓冲液交换处理，以确保从原始样品到纯化和缓冲样品的全自动化实验室过程。

材料和方法

自动化工作流程是几种不同 INtip 化学的通用模板，用于纯化不同类型的靶标，从标记的重组蛋白到免疫球蛋白，然后使用 SizeX IMCStips™ 进行缓冲液交换。IMCStips 可与不同的亲和树脂 (用于其标记的蛋白的 Ni-IMAC，用于免疫球蛋白的 Protein A/G，用于生物素化靶标的链霉素亲和素) 一起使用，以靶向感兴趣的特定蛋白。这里显示的台面布局是一个通用模板，作为“准备就绪”的工作流程，用于 Hamilton Microlab STAR 上的亲和纯化。图形用户界面中的选项可以提供优化的工作流程以及最大限度地回收的灵活性，而快速纯化工作流程则可以进行快速定性分析。最终，这个自动化的工作流程提供了一致性，但是仍然增加了一些灵活性来改变工作流程(吸液/分液次数)和清洗步骤，以便为特定的目标定制每个工作流程。



图1.控制吸液和分液循环次数的图形用户界面，以及用于亲和纯化及后续进行缓冲液交换的典型台面布局

亲和纯化方法 (Protein A, G, A/, L 和 Ni-IMAC)



尺寸排阻色谱法 (SEC) SizeX



链霉素亲和素



表 1. 使用 MabSelect SuRe LX 50 µL 树脂 Intip 工作流程

Steps	Buffer	Spin columns			IMCStips		
		Volume (µL)	Cycle	Spin Speed	Volume µL	Aspiration µL	Aspiration Dispense Cycle
Equilibration	Conditioning Solution	500	1	100	1000	800	1
Sample	Cell Supernatant	1000	5	100	1000	800	5
Wash 1	1X PBS, 500mM NaCl	500	1	100	1000	800	3
Wash 2	1X PBS	500	1	100	1000	800	3
Elution	Sodium Acetate, pH3.5	400	1	100	400	350	3

结果

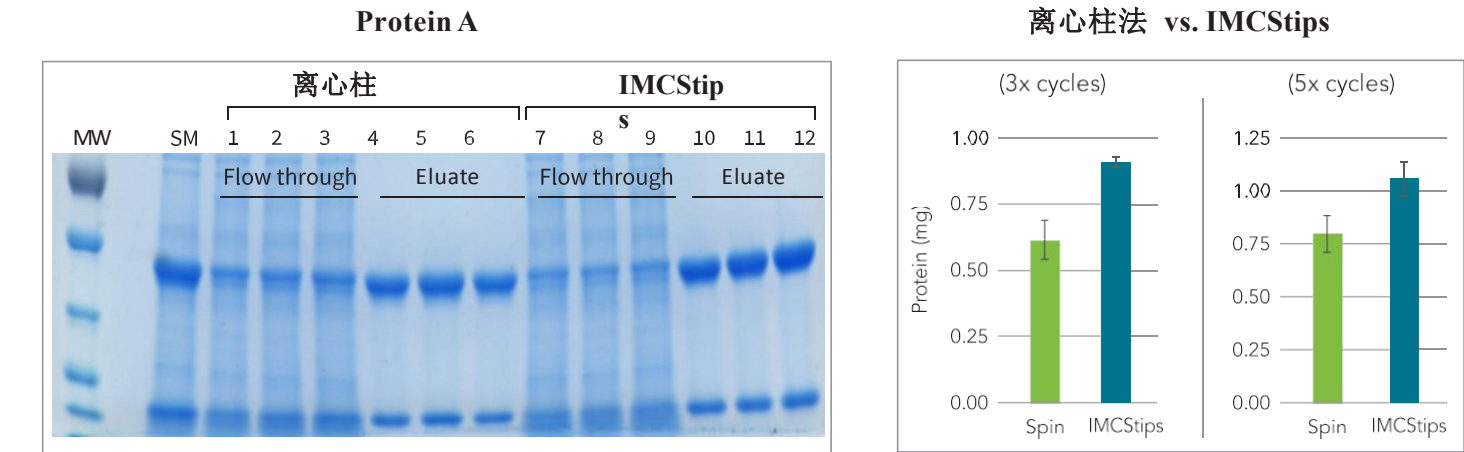


图 2.使用 MabSelect SuRe LX 树脂(50 µL 树脂体积) 通过离心 (旋转) 和 IMCStips™ 纯化单批 CHO 细胞培养液为了保持一致性，离心柱法使用 100xg RCF 5 分钟，然后样品被重新添加到柱子上，重复 3x 或 5x，类似于 tips 的纯化模式。离心柱法一致性产生的单克隆抗体少于 tips 方法，如 UV-Vis (Abs@280nm) 测量和 SDS-PAGE 所示。

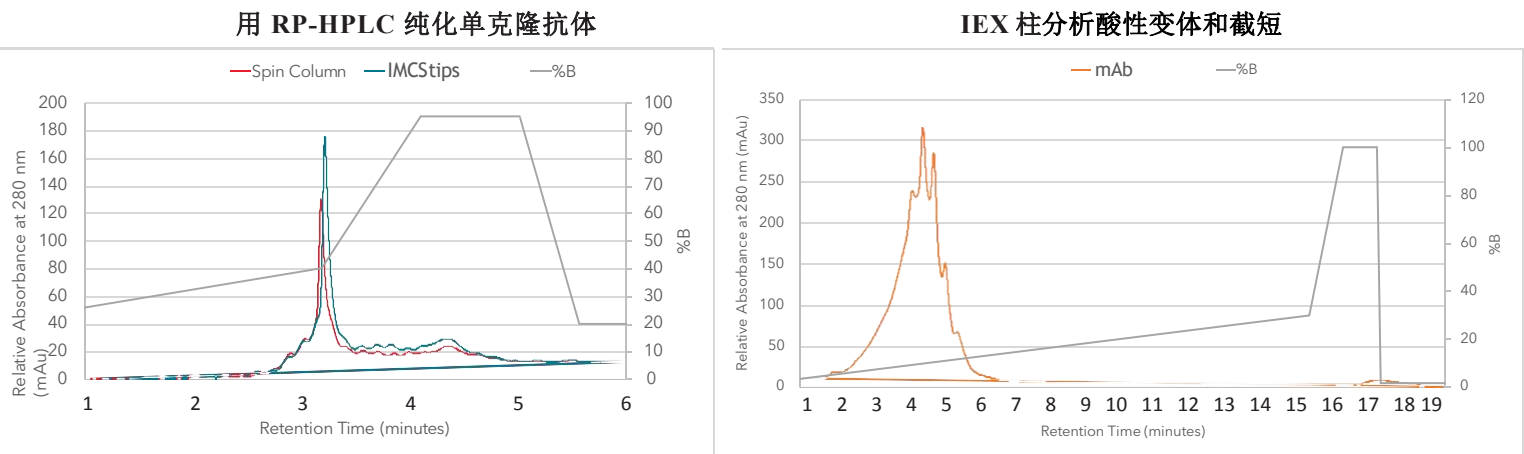


图 3.在离子交换树脂上分析纯化抗体的酸性变异和截短，并用反相高效液相色谱法检测 IgG 异构体的完整性

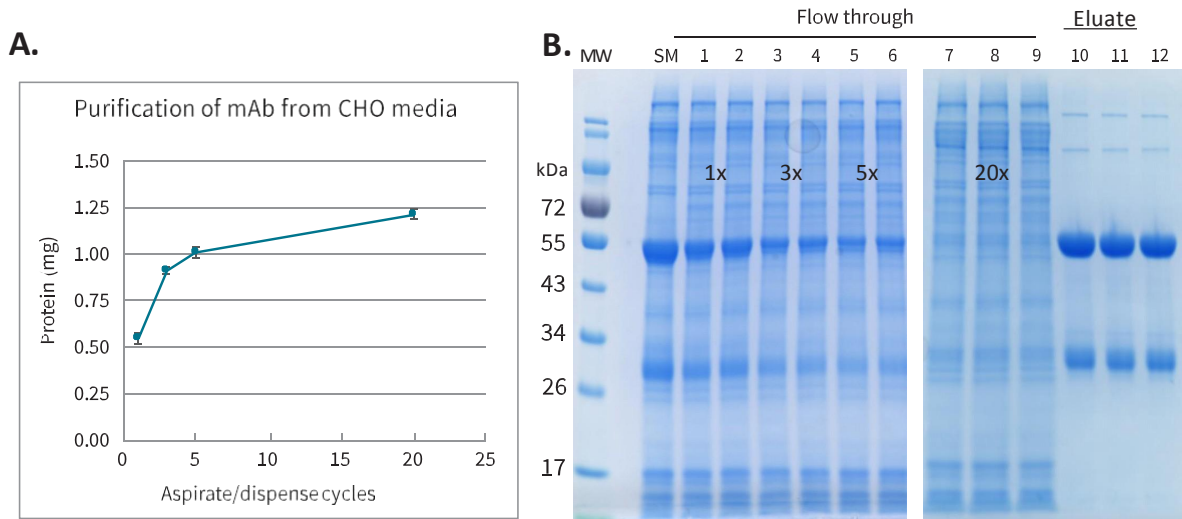


图 4. 如经 UV-Vis (Abs @280 nm) 蛋白定量所示 (A)，增加吸液/分液循环可提高最终 IgG 产量；流穿液中重链和轻链的减少也证明这一点(B)。在经过 20x 吸液/分液循环后，最终用 pH 3.5 400 µL NaOAc 进行洗脱。样品用 1/10 洗脱体积的 1 M Tris pH 8 进行中和。除了最后 20x 流穿液及洗脱液是一式三份外，其他每个循环次数是一式两份。

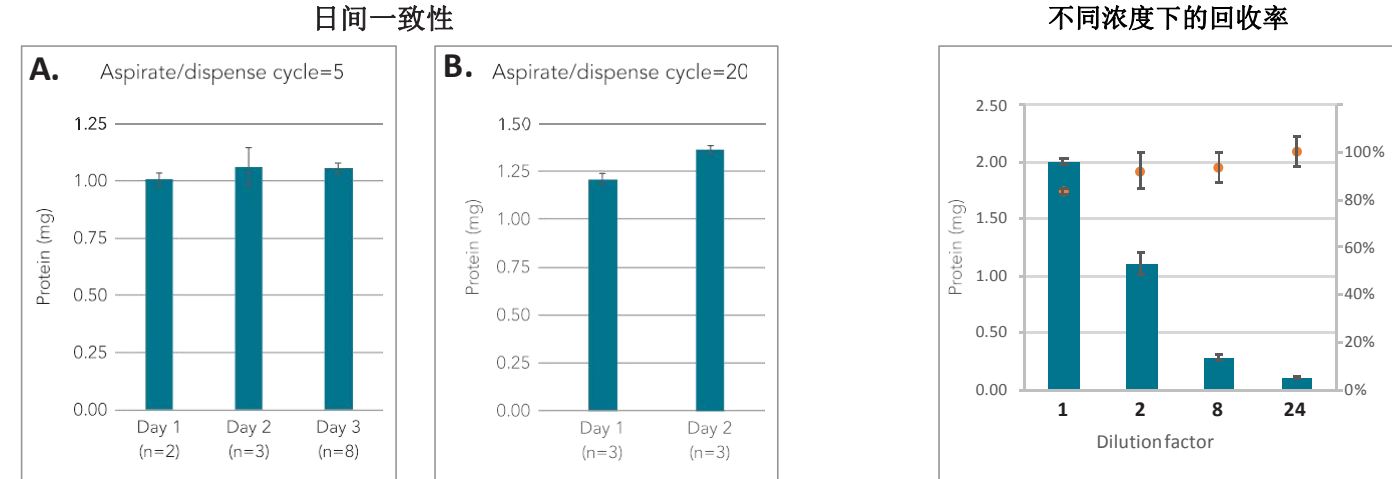


图 5.不同细胞培养基中单克隆抗体的富集，采用不同数量的 tips 和两个不同的吸液/分液循环，在 3 天内进行测试。

图 6. 用在 1x PBS 中加入 0.1% BSA 制备 CHO 培养基的系列稀释液，pH 7.4，以评估不同浓度下的载量和回收率。

Ni-IMAC

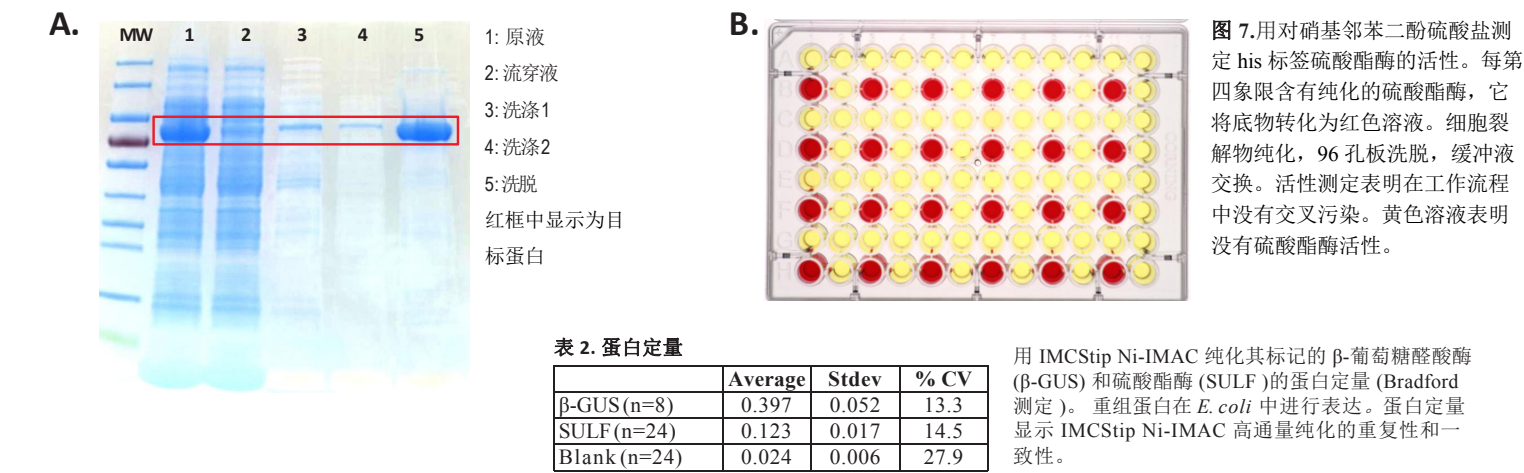


图 7.用对硝基邻苯二酚硫酸盐测定 his 标签硫酸酯酶的活性。每第四象限含有纯化的硫酸酯酶，它将底物转化为红色溶液。细胞裂解物纯化，96 孔板洗脱，缓冲液交换。活性测定表明在工作流程中没有交叉污染。黄色溶液表明没有硫酸酯酶活性。

表 2. 蛋白定量

	Average	Stdev	% CV
β-GUS (n=8)	0.397	0.052	13.3
SULF (n=24)	0.123	0.017	14.5
Blank (n=24)	0.024	0.006	27.9

用 IMCStip Ni-IMAC 纯化其标记的 β-葡萄糖醛酸酶 (β-GUS) 和硫酸酯酶 (SULF) 的蛋白定量 (Bradford 测定)。重组蛋白在 *E. coli* 中进行表达。蛋白定量显示 IMCStip Ni-IMAC 高通量纯化的重复性和一致性。

尺寸排阻

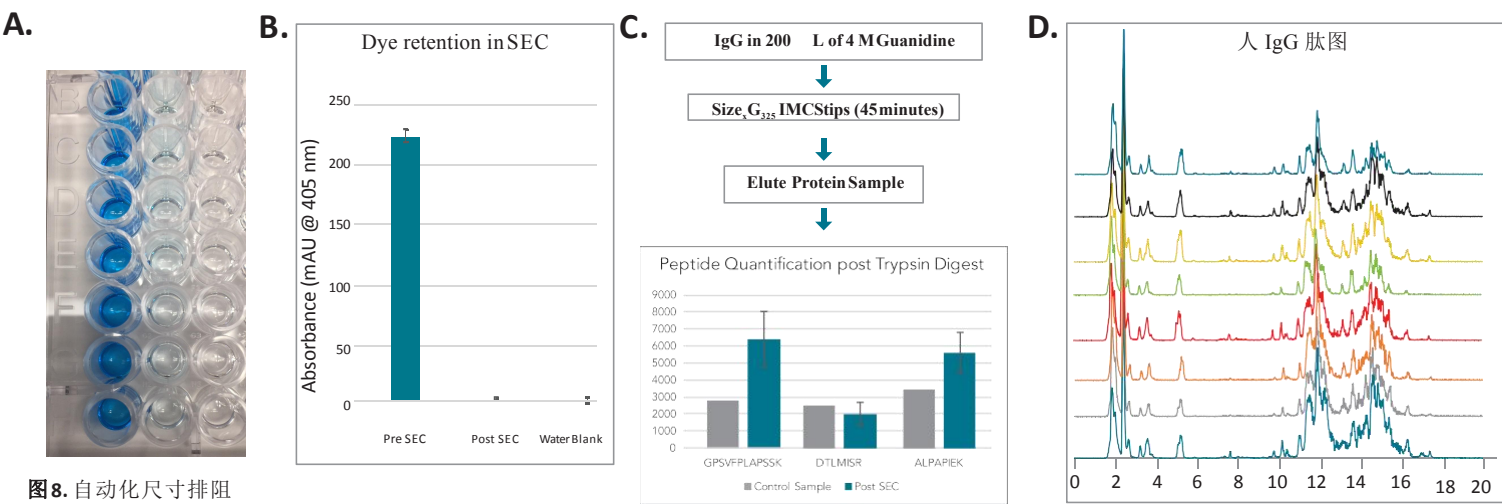
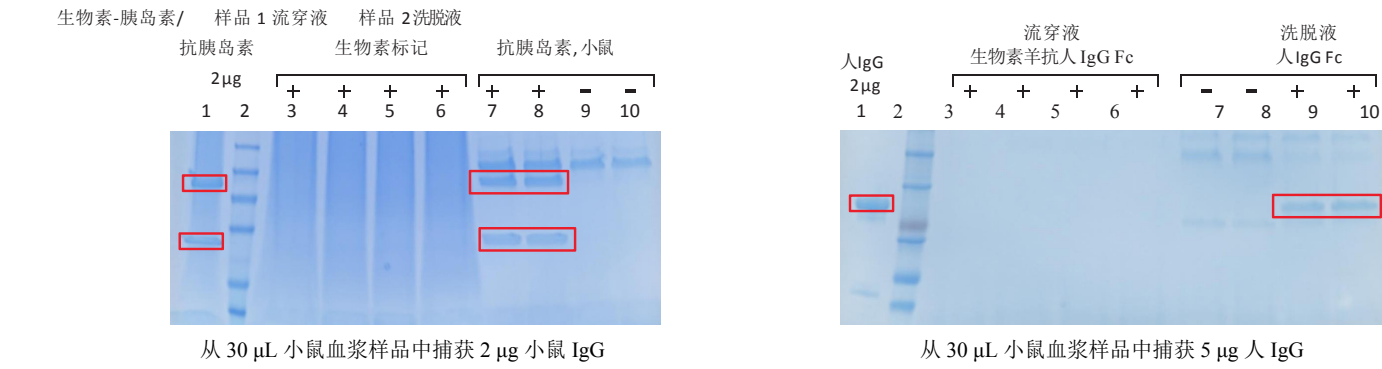


图 8. 自动化尺寸排阻

使用小分子染料 (~500 Da) 通过 INtip 化学进行尺寸排阻色谱的自动化工作流程证明了染料的 18 倍以上稀释 (A)。最左边的一排是 SEC 之前的染料溶液，中间的一排是 SEC 之后的样品，最右边的一排是水空白样品。(B) 用 4 M GnHCl、DTT 和 IAA 处理后，胰蛋白酶消化免疫球蛋白的工作流程，然后在胰蛋白酶/LysC 消化前用 SEC 脱盐。使用 0.5 M GnHCl 作为对照样品和 SEC 后样品，用 Thermo LC-MS/MS 监测三肽。总峰面积计数高于或接近对照样品，表明胰蛋白酶消化后的 SEC 样品是有效的 (C)。8 例 SEC 后 IgG 样品经胰蛋白酶/LysC 处理并用 UPLC-ESI-qTOF MS 进行分析。重叠层析和几个关键质量属性的监测表明，所有样品的结果是高度一致的 (D)。

链霉素亲和素



结论

各种目标分析物的亲和和富集是一个常规过程，贯穿于研究的早期和晚期阶段。这里展示的工作是基于自动化和高通量纯化，但仍然提供灵活性的空间，以调整过程中不同数量的样品，不同的亲和力和耦合多个工作流程，如亲和纯化后的缓冲液交换。高一致性和灵活性是实施这些用 Ni-IMAC 纯化标记蛋白工作流程时的关键点，使用 Protein A 固定树脂从细胞培养基中提取免疫球蛋白，用链霉素亲和素珠拉下生物素化的靶标或用尺寸排阻色谱进行自动化缓冲液交换过程。最终，IMCStip 与 Hamilton microlab Star 自动液体处理系统相结合，具有多种模式，可以随着科学家的需求随时间变化而提供灵活性、一致性和进化兼容性。

致谢

我们感谢哥伦比亚南卡罗来纳大学的麦克·沃拉和比尔·科瑟姆在 LC-ESI-qTOF 上分析胰蛋白酶/溶解蛋白酶 C 消化的人类 IgG 样本。

