integrated micro-chromatography systems

APPLICATION NOTE

使用 Opentrons Flex® 平台上的 Protein A 和SizeX$_{150}$ IMCStips® 进行自动化抗体纯化和缓冲液置换

Gracie Reid, Patrick A. Kates, Nolan Foreman, L. Andrew Lee
Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc., Irmo, SC 29063

概述

高质量抗体制备既需要高效纯化，也需要有效的缓冲液置换，但传统工作流程通常耗时且结果不稳定。IMCS 开发了经过验证、可自动化运行的方法，该方法将用于选择性捕获 IgG 的 Protein A IMCStips® 与用于快速缓冲液置换及小分子去除的 SizeX$_{150}$ IMCStips® 相结合。在 Opentrons Flex® 平台上执行时，这些方法可在简化的流程中实现 >80% 的回收率和 >95% 的纯度，最大程度减少操作时间，同时支持灵活的样本通量。通过降低操作复杂性并确保结果可重复，这些方法能够帮助实验室比手动操作更快、更可靠地获得符合制剂要求的抗体。

方法优势

- 在紧凑、经济的 Opentrons Flex® 平台上，实现高纯度 IgG 纯化与缓冲液置换
- 在全自动运行中，回收率稳定在 80% 以上，小分子去除率超过 95%
- 提供灵活选择：拥有多种树脂床体积（10、25 和 50 µL）的已验证方法，可适应不同样本量

引言

亲和纯化与后续的缓冲液置换是蛋白质研究和生物工艺中的关键步骤，它能够选择性捕获目标分子，同时去除干扰下游应用的杂质。在抗体工作流程中，Protein A 亲和色谱法对免疫球蛋白具有高特异性，能够富集目标蛋白，但洗脱液中通常含有酸性缓冲液、盐分或其他小分子物质，这些成分可能影响蛋白质的稳定性、生物活性和分析性能。

为应对这些挑战，IMCS 开发了一套适用于 Opentrons Flex® 平台的自动化方案。该方案整合了用于快速捕获 IgG 的 Protein A IMCStips® 与用于高效缓冲液置换及小分子去除的 SizeX150 IMCStips®。每项方法均以实现高性能、高重复性及高通量自动化的兼容性为目标，帮助实验室在减少人工操作的同时，获得高纯度、符合制剂要求的蛋白质。

Protein A 工作流程支持 10、25 和 50 µL 的树脂床体积，用户可根据具体项目需求，在结合载量、循环时间和通量之间灵活权衡。本研究通过系列实验，旨在确定结合载量并验证纯化效率，从而帮助实验室以灵活、可扩展且经济高效的方式实现其 Protein A 工作流程的自动化。

结果

结合实验

使用树脂床体积分别为 10、25 和 50 µL 的 Protein A IMCStips® 对纯化的人 IgG 进行了结合特性分析。针对 10 µL 与 25 µL 规格的吸头，评估的浓度范围为 0.25 至 4.0 mg/mL；而 50 µL 规格的吸头则在 0.25 至 10 mg/mL 的浓度范围内进行测试，以评估其在高滴度条件下的性能。具模型拟合的代表性结合曲线如图 1 所示，基于 Langmuir 等温线拟合的结合数据展示于图 2。通过 25 次结合循环收集的数据，其最大结合容量（q_{max}）与解离常数（K_D）值汇总于表 1。这些结果表明，Protein A IMCStips® 可实现可预测且可扩展的结合性能，使用户能够根据自身具体需求，选择在载量、循环次数和通量之间取得平衡的树脂体积。

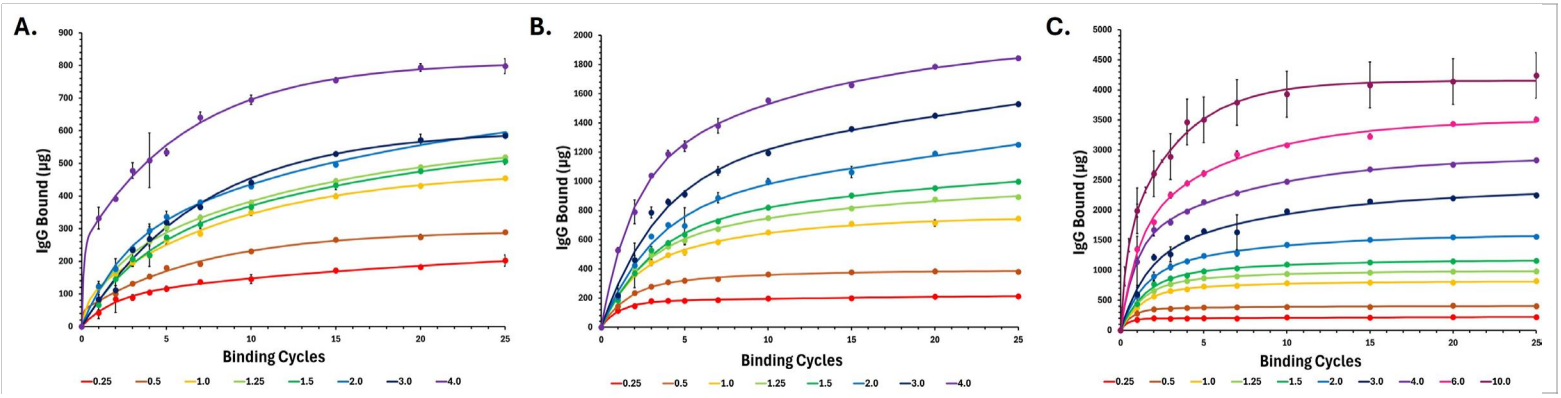


图1：Protein A IMCStips®上的IgG结合曲线

在Protein A IMCStips®上测得的不同体积树脂床的IgG代表性结合曲线：(A) 10 µL 与 (B) 25 µL 规格在0.25 - 4.0 mg/mL浓度范围内的结合曲线，以及 (C) 50 µL 规格在0.25 - 10.0 mg/mL浓度范围内的结合曲线。数据点为实验测量值，实线为拟合结合曲线。结合IgG量随循环次数变化绘制，显示树脂结合容量的逐步饱和过程。

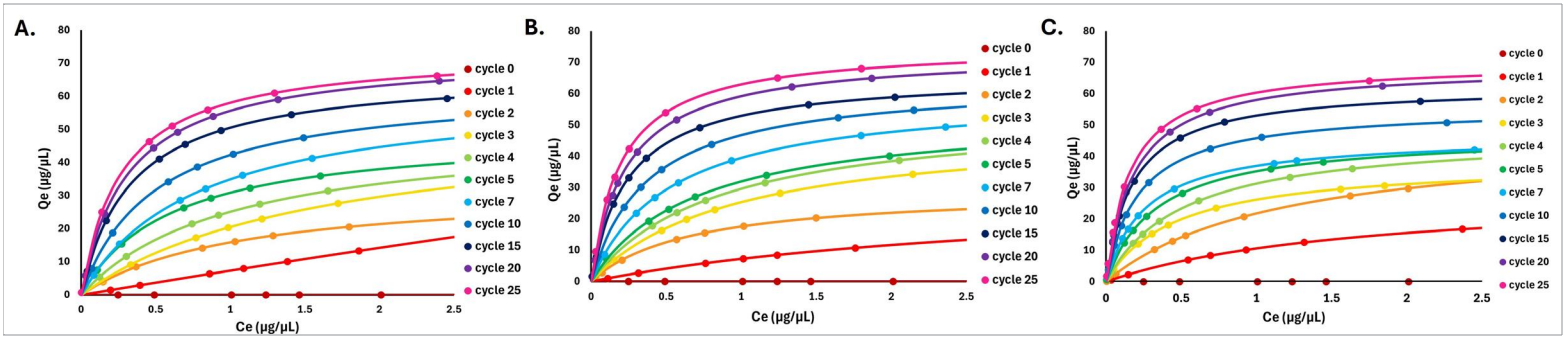


图2. 结合实验的Langmuir等温线分析

Langmuir 等温线图展示了(A) 10 µL、(B) 25 µL 和 (C) 50 µL 三种树脂床体积在 0-25 次结合循环中，IgG 平衡结合量(q_e)随平衡浓度(Ce)的变化关系。数据点为实验测量值，彩色曲线代表用于拟合的各次结合循环，q_{max}和K_D值通过拟合获得（汇总于表1）。

表1. ProteinA IMCStips®的结合容量与解离常数

表中所示为基于 IgG 结合数据（最高达 25 次循环）的 Langmuir 等温线拟合所确定的最大结合容量（q_{max}）与平衡解离常数（K_D）值

Resin Volume (µL)	q_{max} (µg/µL)	K_D (mg/mL)
10	73.7	0.27
25	75.5	0.20
50	70.1	0.16

亲和纯化

使用 10 µL 与 50 µL 两种规格的 Protein A IMCStips®，分别对浓度为 0.27 mg/mL 与 0.14 mg/mL 的 IgG 加标HEK细胞培养基进行三重重复纯化实验。如表2所示，10 µL 规格吸头的回收率始终超过 80%，且显著高于 50 µL 规格的回收率，这表明对于低滴度样本，较小体积的树脂具有更高纯化效率。在 0.14 mg/mL 上样浓度下，10 µL 规格吸头测得的表现回收率超过 100%。该结果源于以产品标称滴度作为假定起始浓度进行计算，实际反映出对培养基中真实 IgG 含量的明显低估。

表2. 10 µL与50 µL树脂床Protein A纯化的IgG回收率

从加标浓度分别为 0.273 mg/mL 与 0.1365 mg/mL 的 HEK 细胞培养基中纯化 IgG 的百分比回收率。回收率计算基于产品标称滴度；数值大于 100% 表明初始浓度存在低估。

Sample	Initial Concentration (mg/mL)	% Recovery (10 µL)	% Recovery (50 µL)
HEK1-1	0.27	95.9	84.1
HEK1-2		97.1	85.1
HEK1-3		95.4	87.0
HEK2-1	0.14	103	85.2
HEK2-2		108	84.7
HEK2-3		111	79.8

使用 50 µL 规格的 Protein A IMCStips® 对 IgG 浓度为 4.25 mg/mL 与 8.5 mg/mL 的 CHO 细胞培养上清液进行三重重复纯化，以评估其在较高蛋白载量下的性能。如表 3 所示，4.25 mg/mL 样本的回收率持续稳定在 80% 以上，证明 Protein A IMCStips®适用于较宽的浓度范围。而 8.5 mg/mL 样本的回收率为 45%，对应约 3.8 mg 抗体回收量——这与实测所得树脂结合容量~70 mg/mL 的结果相符。

表3. 50 µL 树脂床 Protein A 纯化的 IgG 回收率

从加标浓度分别为 8.5 mg/mL 与 4.25 mg/mL 的 CHO 细胞培养基中纯化 IgG 的百分比回收率。

Sample	Initial Concentration (mg/mL)	Elution 1 (mg/mL)	Elution 2 (mg/mL)	% Recovery
CHO1 – 1	8.5	11.606	1.097	44.8
CHO1 – 2		11.816	1.078	45.5
CHO1 – 3		11.426	1.051	45.4
CHO2 – 1	4.25	10.171	0.903	78.2
CHO2 – 2		10.610	0.850	80.9
CHO2 – 3		10.428	0.946	80.3

SDS-PAGE 分析证实了 Protein A 洗脱液的高纯度（图 3 与图 4 ）。在约 53 kDa 和 30 kDa 处可观察到清晰的条带，分别对应 IgG 的重链与轻链，且未检测到明显杂带。这些结果表明，Protein A IMCStips® 能够直接从复杂基质中实现高产率、高纯度的抗体纯化，无需依赖耗时费力的人工层析操作。对于需处理多样本的实验室而言，这意味着能在更短时间内获得稳定可靠的抗体回收产物，并可直接用于下游分析。

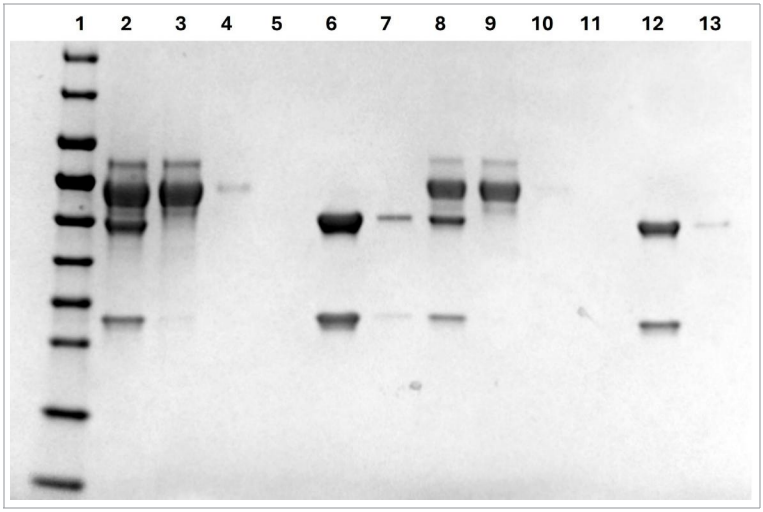


图3：HEK 样本 Protein A 洗脱液的 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 凝胶电泳图显示了从 0.273 mg/mL 和 0.1365 mg/mL 加标浓度样本中纯化的 IgG 结果。泳道 1 为蛋白质分子量标准。泳道 2 至 13 依次为各浓度样本的不同纯化阶段组分：初始样本、穿流液、洗涤 1、洗涤 2、洗脱 1、洗脱 2。所有样本均在含 5% β-巯基乙醇的 Laemmli 缓冲液中制备，并于上样前加热处理。

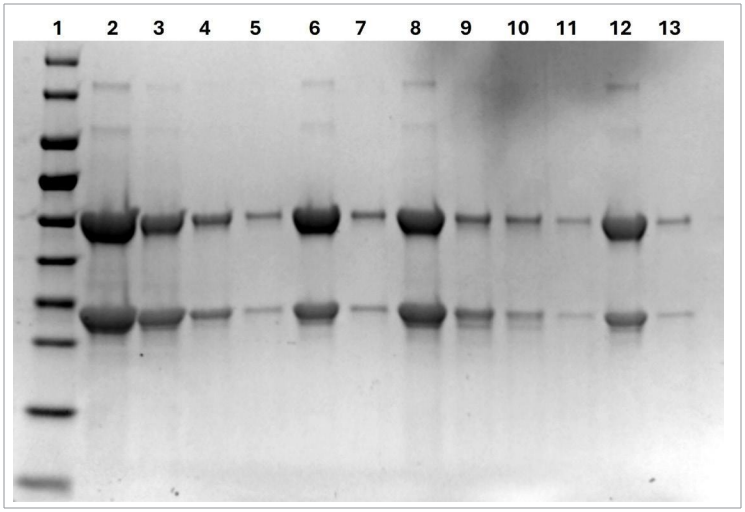


图4：CHO 样本 Protein A 洗脱液的 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 凝胶电泳图显示了从 8.5 mg/mL 和 4.25 mg/mL 加标浓度样本中纯化的 IgG 结果。泳道 1 为蛋白质分子量标准。泳道 2 至 13依次为各浓度样本的不同纯化阶段组分：初始样本、穿流液、洗涤 1、洗涤 2、洗脱 1、洗脱 2。初始样本、穿流液、洗脱 1 和洗脱 2 的上样量为每泳道 1 µL，而洗涤 1 与洗涤 2 的上样量为每泳道 10 µL。所有样本均在含 5% β-巯基乙醇的 Laemmli 缓冲液中制备，并于上样前加热处理。

SizeX$_{150}$ 缓冲液置换

使用SizeX$_{150}$ IMCStips® 对 0.1 M 甘氨酸（pH 3.0）中收集的 HEK 50 µL Protein A 洗脱液进行缓冲液置换，转换至 1× PBS。在两种测试蛋白上样量下，回收率均超过 80%（表4，图5）。此外，以咪唑作为模型污染物验证了小分子去除效果。通过咪唑梯度稀释液建立的校准曲线显示良好的线性关系（R^2=0.99）。缓冲液置换前后样本的定量分析证实，重复实验中污染物去除率超过 98%（表5，图6）。通过将高回收率与近乎完全的污染物清除相结合，SizeX$_{150}$ IMCStips® 可提供即用型浓缩样本。该方法无需额外的脱盐流程，并确保与下游检测的兼容性。

表4. SizeX$_{150}$ 缓冲液置换后的 IgG 回收率

Sample	Average Total Protein Loaded (µg)	Elution volume (µL)	Initial Concentration (mg/mL)	Final Concentration (mg/mL)	% Recovery
HEK1 – 1	106	157	0.7019	0.5687	84.8
HEK1 – 2		157	0.7115	0.5861	86.2
HEK1 – 3		157	0.7141	0.5789	84.9
HEK2 – 1	53	158	0.3589	0.2738	80.4
HEK2 – 2		158	0.3647	0.3067	88.6
HEK2 – 3		158	0.3378	0.2798	87.2

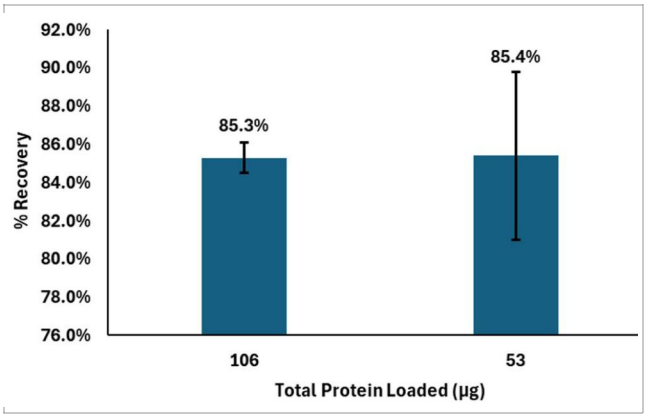


图5. SizeX$_{150}$ 缓冲液置换后的 IgG 回收率百分比

样本在 0.273 mg/mL 与 0.1365 mg/mL 蛋白浓度下置换至 1×PBS 缓冲液。柱状图数据表示为均值±标准差（n=3）。

表5. SizeX$_{150}$ 缓冲液置换后的咪唑清除率

Sample	Area (mAU*min)	Concentration (mM)	% Removal
1	117.3919	5.55	98.9
2	73.1925	3.49	99.3
3	65.3968	3.13	99.4
4	66.8071	3.20	99.4
5	55.6886	2.68	99.5
6	59.9384	2.88	99.4
7	0.0228	0.09	99.9
8	14.9941	0.79	99.8

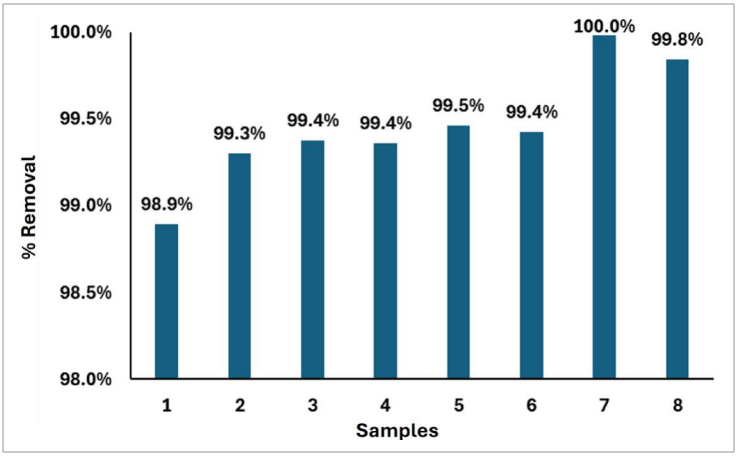


图 6. SizeX$_{150}$ 缓冲液置换后的咪唑去除率百分比

图表显示了将含 500 mM 咪唑的缓冲液（20 mM 磷酸钠，500 mM NaCl，pH 7.4）置换至 1× PBS 后，咪唑的去除率百分比。数据基于 8 次重复实验（n=8）得出。通过高效液相色谱-紫外检测法（HPLC-UV）参照咪唑标准品校准曲线测定咪唑浓度。

结论

IMCS 为 Opentrons Flex® 平台开发的自动化方案，通过 Protein A IMCStips® 实现了高效 IgG 纯化，并借助 SizeX$_{150}$ IMCStips® 完成了高效的缓冲液置换。结合实验提供了树脂载量数据，可指导优化方法与树脂体积的选择；而亲和纯化实验则持续实现了 80% 以上的回收率与 95% 以上的纯度。随后的缓冲液置换过程在保持高回收率的同时，实现了超过 98% 的小分子去除率，该结果已通过 HPLC-UV 分析验证。虽然本研究在中通量规模下完成，但相同的验证脚本可并行处理多达 96 个样本，从而大幅提升通量而无需增加人工操作时间。相较于传统手动纯化与缓冲液置换方法，该自动化方案降低了操作差异性，最大限度地减少了人工干预，缩短了整体处理时间，以更高的效率和可扩展性提供了稳定可靠的高纯度结果。

材料与方法

化学品与试剂

MabSelect PrismA Protein A IMCStips® 分别采用 10 µL（货号：02-TK-P1 (R80A-10-96)）、25 µL（货号：02-TK-P1 (R80A-25-96)）与50 µL（货号：02-TK-P1 (R80A-50-96)）的树脂床体积；SizeX$_{150}$ IMCStips®（货号：02-TK-P1 (R76-350-96)）均由 IMCS（美国南卡罗来纳州 Irmo）提供。纯化的人多克隆IgG（货号：Hu-003-C）购自 ImmunoReagents 公司（美国北卡罗来纳州 Raleigh）。

仪器设备

所有自动化操作均在配备 96 通道移液头的 Opentrons Flex®平台（美国纽约长岛市）完成。蛋白质浓度通过 NanoDrop™分光光度计（赛默飞世尔科技）测定。SDS-PAGE 使用 Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell 电泳系统（美国加利福尼亚州 Hercules）进行。小分子去除率通过配备紫外检测器的 Vanquish™ 高效液相色谱系统（赛默飞世尔科技）定量分析。

结合动力学实验

使用纯化人 IgG（以 1× PBS 稀释至 4.0、3.0、2.0、1.5、1.25、1.0、0.5 及 0.25 mg/mL 浓度）测试 10、25 与 50 µL 树脂床体积的 Protein A IMCStips®。针对 50 µL 规格吸头，额外增加 6.0 与 10 mg/mL 浓度点以更好表征高载量性能。每个浓度与树脂体积组合均进行三次重复实验。每次运行中，800 µL 样本以 25 个循环进行吸液-排液操作，树脂床在每个循环中的流速控制为：吸液 20 µL/s，排液 10 µL/s，单循环总时长约 130 秒。实验在第 1、2、3、4、5、7、10、15、20 及 25 循环后暂停以进行蛋白定量。结合蛋白量通过起始上样量差值计算获得。

Protein A 纯化实验

0.27 mg/mL 的 HEK 细胞培养基直接使用，并以 1× PBS 按 1:1 稀释至终浓度 0.14 mg/mL。每个浓度均使用装载 50 µL 或 10 µL MabSelect PrismA™的 Protein A IMCStips® 进行三次重复纯化。通过两种树脂体积处理 HEK 样本，以对比回收率并论证低滴度样本适用的树脂床体积选择方案。此外，采用 8.5 mg/mL 与 4.25 mg/mL IgG 浓度的 CHO 细胞培养上清液，使用 50 µL 吸头进行三次重复实验以评估高蛋白载量下的性能。吸头使用 1× PBS 平衡后，通过吸排循环上样 1000 µL 样本，随后以 800 µL 1× PBS 洗涤两次，最终用 300 µL 0.1 M 甘氨酸（pH 3.0）分两次洗脱 IgG。

SizeX$_{150}$ 缓冲液置换实验

SizeX$_{150}$ IMCStips® 使用前以 1× PBS 平衡。进行两项实验：

（1）亲和纯化后缓冲液置换：将 50 µL IMCStips® 获得的HEK Protein A 洗脱液分次上样 150 µL 至 SizeX$_{150}$ IMCStips®（总蛋白载量约 106 µg（0.27 mg/mL）与 53 µg（0.14 mg/mL）），洗脱至 1× PBS 中，每个样本收集两份洗脱组分。通过分光光度法（A280）测定洗脱液浓度以计算回收率，并制备 SDS-PAGE 样本。

（2）咪唑去除实验：配制模型缓冲液（20 mM 磷酸钠、500 mM NaCl、500 mM 咪唑，pH 7.4）作为 8 个独立样本（n=8），每个样本上样 150 µL 并洗脱至 1× PBS。置换后咪唑浓度通过 HPLC-UV 参照咪唑标准品校准曲线定量分析。

HPLC-UV检测

咪唑浓度通过 214 nm 紫外检测定量。以咪唑梯度稀释液建立标准曲线，用于计算置换后样本浓度。通过对比置换后浓度与起始浓度（500 mM）计算去除率百分比。

无锡微色谱生物科技有限公司
地 址：江苏省江阴市月城镇北环路 19 号
电 话：17715681752
邮 箱：custserv@micro-sep.com
Web: www.micro-sep.com