

应用文献

使用 IMCStips 在 INTEGRA ASSIST 移液机器人上实现微克级和毫克级的半自动亲和纯化

Huey J. Nguyen, Patrick A. Kates, David A. Miles, L. Andrew Lee, and P. Nikki Sitasuwan

Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc., Irmo, SC USA 29063

IMCStips® PRODUCT

Protein A

1250 µL

Protein A (MabSelect SuRe™ LX)

Binding Capacity (per tip)	Tip Quantity	Catalog Number
1 mg IgG	8	02-TK-I1(R80-25-8)
1 mg IgG	96	02-TK-I1(R80-25-96)

描述:

IMCStips®与 INTEGRA ASSIST 移液机器人配合使用，用于免疫球蛋白的半自动小规模纯化。

方法优势

- 高重现性，移液无误差
- 减少人工操作时间，人体工学体验无与伦比
- 分散固相萃取 (dSPE) 移液吸头促进树脂与分析物之间的最大接触，从而在更短时间内获得更高回收率

引言

蛋白 A 固定化树脂被学术界和工业界实验室用于纯化免疫球蛋白 (IgG)。小规模纯化通常以离心柱形式或96孔板格式的磁珠进行。作为一种替代方案，IMCStips 采用了一种专利纯化技术，可使用多通道移液器并行纯化多个样品。通过将INTip纯化与 INTEGRA 的 ASSIST 移液机器人整合，任何科学家都可以轻松地将这一工作流程引入其实验室。

IMCStips 相较于其他纯化技术具有优势的关键因素在于每个移液吸头内部松散容纳的色谱介质 (图1)。

每个吸头均包含底部和顶部多孔滤膜。顶部滤膜与树脂之间的距离较长，其位置与气溶胶屏障相同。吸头内放置有一个分散环，用于收缩液体流路，从而在液体样品与固体树脂之间引入湍流混合。

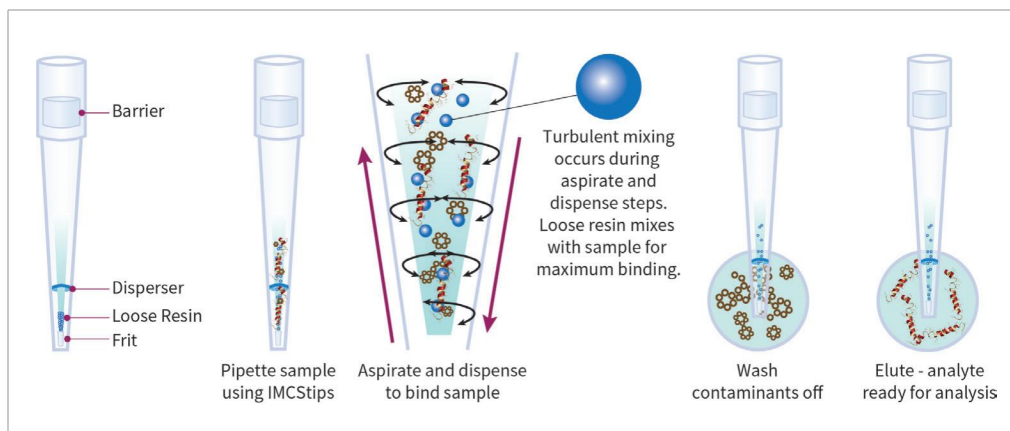


图1. IMCStips采用专利分散固相萃取 (dSPE) 技术。与固定床 SPE (fbSPE) 装置不同，IMCStips含有松散填充的树脂，在吸入和排出循环 (混合循环) 过程中与样品溶液混合，确保树脂与目标分析物之间最大程度的接触。专利分散器的加入进一步增强了吸头内的湍流混合。纯化遵循典型的结合、洗涤、洗脱工作流程。

与使用固定床柱的传统色谱技术不同，移液器溶液中的样品在吸入和排出步骤中均与树脂接触 (图2)。随后的洗涤步骤通过将每个移液器在各孔板之间移动来进行。松散树脂消除了吸入过程中的背压问题，并重置柱床以解决潜在的沟流或空隙问题。每个样品与树脂之间的接触时间通过修改吸入和排出循环 (也称为混合循环) 来调节。



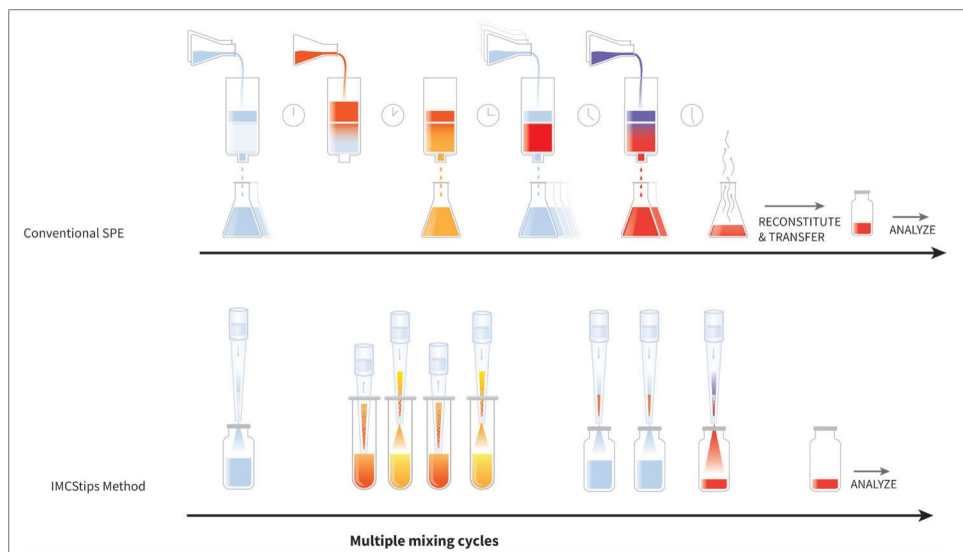


图2. 传统的固定床固相萃取 (fbSPE) 和基于吸头的分散SPE (dSPE) 方法是从混合物中提取分析物的两种可行工作流程。IMCStips的独特之处在于移液器内专利分散环与松散容纳树脂的配合使用，树脂在吸入和排出循环（混合循环）过程中进行混合。dSPE方法类似于批次萃取，即含有目标分析物的树脂和液体混合物在固定时间段内进行端对端混合。在此情况下，移液器含有用于保留树脂的滤膜。

在此，我们展示了在 ASSIST 移液机器人上使用 Protein A IMCStips 进行 IgG 捕获，通过在不同抗体浓度下增加混合循环数并评估洗脱参数。结合 INTEGRA 的 ASSIST，可在 90 分钟内对多达 12 个样品进行小规模纯化，无需任何人工干预。这为任何有兴趣实现样品制备自动化、提高通量以及通过调整缓冲液、混合循环或树脂来测试概念验证工作流程的科学家提供了一个经济实惠、易于使用的切入点。

结合动力学

IMCStips 在 ASSIST 移液机器人上的结合动力学数据是通过使用 VIAFLO 8 通道 1250 μL 电子移液器获得的。在 VIAFLO 电子移液器上设定 800 μL 体积用于平衡和样品结合。在开始样品结合之前，在 1x PBS 中通过 3 次吸打用以平衡 IMCStips。通过用 1x PBS 和 0.1% IgG 耗竭 BSA（牛血清白蛋白）稀释储备抗体溶液（10 mg/mL）来制备不同浓度的多克隆人 IgG (hulgG)。

结合材料的比例基于流通液相对于起始材料的吸光度值差异来计算。蛋白质通过一系列吸入（100 $\mu\text{L/s}$ ）和排出（30 $\mu\text{L/s}$ ）步骤进行结合，并额外保持 25 秒以确保在混合循环期间所有液体均从吸头中排出。在以下混合循环数后使用 NanoDrop 在 280 nm 处测量流通液：1、2、3、4、5、10、15、20、25 和 30。使用五种不同浓度，固定样品体积为 1 mL，浓度范围为 0.2 mg/mL 至 1 mg/mL（图3）。

抗体捕获取决于抗体浓度和每种树脂上亲和配体的密度。在 ASSIST 移液机器人上使用 IMCStips 可观察到两种结合动力学，一种快速，一种慢速。基于该特定树脂量，较低样品量（0.2 和 0.4 mg）下的快速结合可能是与表面暴露配体结合的结果；它不受通过树脂孔隙扩散的限制。随着 IgG 量的增加，更多的表面配体被占据，随后的抗体结合需要接触孔隙内的配体。这第二种较慢的捕获速率保留了更高的抗体量，需要增加混合循环来捕获这些抗体。该产品线设计为仅需 30 个混合循环即可在 1 mL 溶液中捕获至少 90% 的人多克隆抗体。将混合循环数增加至 40 将提高 IgG 的总体捕获率，但同时也需要额外的处理时间。更大的树脂床可通过利用更大量的外部配体实现更快的工作流程，但这种方法也会产生更大的死体积。

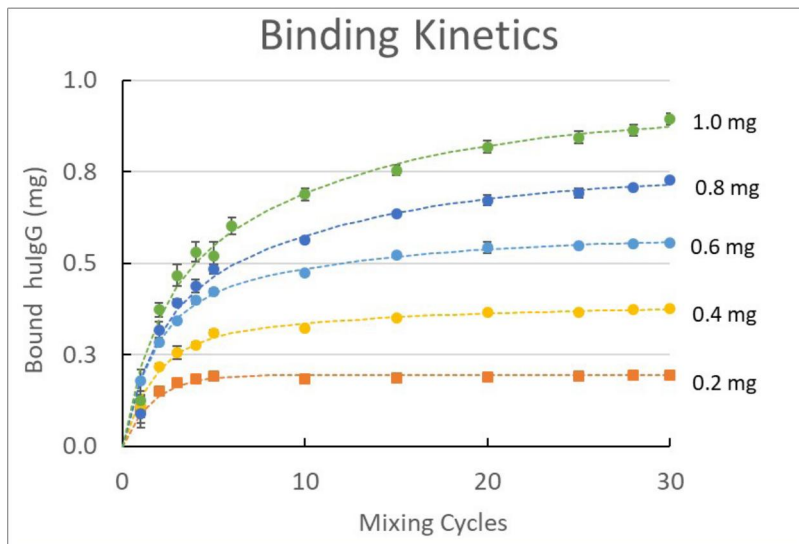


图3. 这些结合曲线是通过在 INTEGRA ASSIST 上使用 VIAFLO 1250 μL 电子多通道移液器运行固定移液程序生成的；每个样品的吸入和排出体积设定为 800 μL 。然后样品溶液中加入 1x PBS、0.1% IgG 耗竭 BSA 中的多克隆人 IgG (hulgG)。IMCStips (P/N 02-TK-11(R80-25-8)) 在 1 mg 水平下 30 个混合循环内可结合高达 90% 的抗体。增加混合循环数可因总体停留时间增加而提高结合率（结果未显示）。误差棒表示三个平行样品平均值的一个标准差。

结合容量

为确定 IMCStips 的结合容量，将人IgG (hulgG) 样品进行 25 个样品混合循环和两次独立洗脱（每次 300 μ L，共 600 μ L）。用于确定抗体回收率的参数从 hulgG 浓度 0.2 mg/mL 开始，在 1 mL 1x PBS、0.1% IgG 耗竭 BSA 中增加至 6 mg/mL（图4）。

在较低起始样品量（0.2、0.4和0.6 mg）下，IMCStips 在 25 个混合循环后获得了 80% 以上的回收率；较高起始样品量（0.8、1.0 mg）的回收率为 75%。通过将混合循环数增加至30或更高，可将 1 mg/mL hulgG 的回收率提高至80%（尽管这需要更长的结合时间）。当每个样品中的抗体浓度增加至超过 1 mg/mL 时，结合速率转向慢速结合动力学。因此，需要更长的停留时间，导致混合循环数增加。

洗脱动力学

使用IMCStips在25个混合循环下结合样品，捕获了较少量的hulgG（400 μ g）。根据先前结果，该条件足以在90分钟内捕获100%的hulgG。洗脱缓冲液固定为100 mM乙酸钠，pH 3.4，第一次和第二次洗脱均使用300 μ L（图5）。回收率基于每个混合循环后的吸光度值计算。

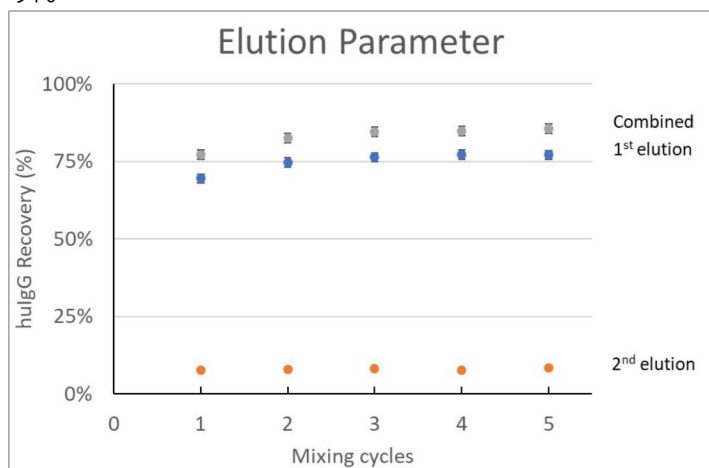


图5. 混合循环数对分析物回收率的作图。为在第一次洗脱中获得一致的回收率，该步骤需要 3 个混合循环。由于树脂和滤膜产生的死体积，第二次洗脱可额外提供 10% 的分析物回收率。增加超过三个循环不会改变回收率。

结论

本文所示工作使用了含有 MabSelect SuRe LX 树脂的 IMCStips，置于 INTEGRA 1250 μ L 宽口 GripTip 中，使这种基于吸头的纯化方法与 INTEGRA 的移液机器人兼容。INTEGRA ASSIST 和 ASSIST PLUS 使用 VIAFLO 电子多通道移液器，具有可编程的吸入和排出速度以及精确的X轴和Z轴定位。该亲和纯化方案被编程为在不到 90 分钟内并行纯化 8 个样品。这些已证明的动力学和容量可用于定制纯化免疫球蛋白的理想工作流程。洗脱参数表明，3 个混合循环足以获得一致的回收率，而第二次洗脱步骤可略微改善回收率。总体而言，该工作流程展示了 IMCStips 在使用 INTEGRA 移液机器人进行 IgG 纯化时的一致性能。

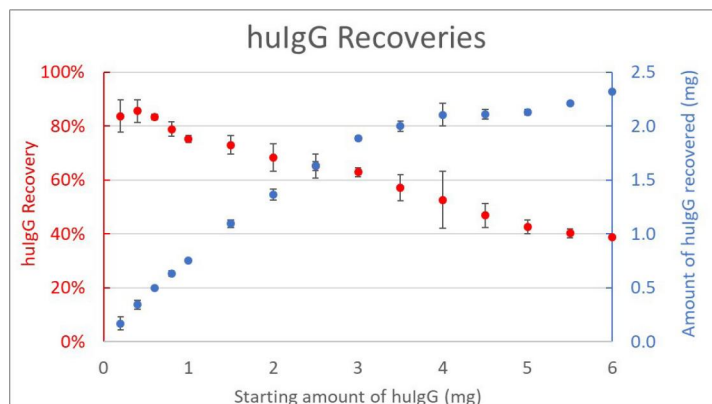


图4. 表观静态结合容量（忽略 6 mg 样品上样量时的轻微增加）在该产品线中接近 2 mg。如果目标回收率在 25 个混合循环下为 >80%，则样品上样量的截止值接近 1 mg；而如果可接受的回收率百分比为 60%，则样品上样量接近 2 mg。

低 pH 缓冲液通常用于从蛋白A 树脂上洗脱抗体。使用 1.05 mg/mL hulgG 样品，在 25 个样品混合循环和两次 300 μ L 洗脱步骤（各2个混合循环）下，测试了三种不同的洗脱缓冲液（0.1 M 甘氨酸 pH 3.0、0.1 M 柠檬酸 pH 3.0 和 0.1 M 乙酸钠 pH 3.4）。这三种缓冲液（甘氨酸和柠檬酸缓冲液n = 3，乙酸钠缓冲液n = 5）平均回收率为80%（图6），表明三种缓冲液之间无显著差异。

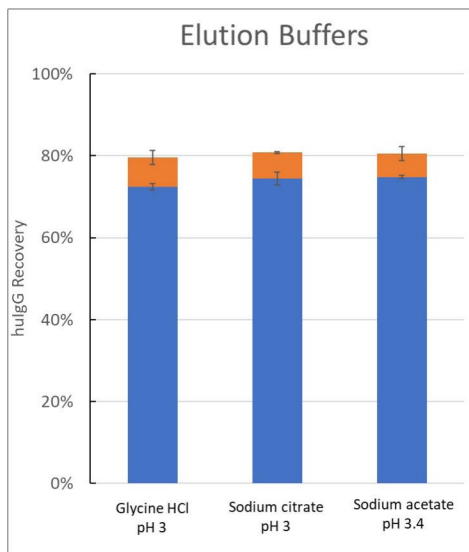


图6. 无论缓冲液类型如何，低 pH 洗脱均足以回收hulgG。

材料与方法

化学品和试剂

蛋白 A 亲和纯化的多克隆 hulgG，购自 ImmunoReagents。不含免疫球蛋白和蛋白酶的牛血清白蛋白，购自 Rockland。甘氨酸、氢氧化钠、乙酸和盐酸购自 Fisher。乙酸钠购自 Millipore Sigma。柠檬酸钠缓冲液购自 Boston Bioproducts。Tris 缓冲液和磷酸盐缓冲盐水，购自 Alfa Aesar。Eppendorf™ 96 深孔板购自 Fisher Scientific。

IMCStips (P/N: 02-TK-I1(R80-25-8)) 填充固定量的 MabSelect SuRe LX 树脂制造，结合容量可由装填规格获知。移除硅胶密封件，并通过将吸头与预吸液的多通道系统接合，使 1000 μL 空气通过吸头来去除储存溶液。

仪器

所有实验均使用 INTEGRA ASSIST 移液机器人 (INTEGRA Biosciences P/N: 4500) 和 VIAFLO 8 通道 1250 μL 电子移液器 (INTEGRA Biosciences P/N: 4624) 进行。使用 Thermo Fisher Scientific 的 NanoDrop 2000 在 280 nm 处测量吸光度值。

结合动力学

有效结合容量

有效结合容量通过在 1x PBS (含 1 mg/mL BSA) 中运行不同抗体浓度 (0.2-6 mg/mL) 的纯化方法来测量。纯化方法包含平衡步骤 (2 个循环)、样品混合步骤 (25 个循环)、三个洗涤步骤 (各 3 个循环) 和两个洗脱步骤 (各 2 个循环)。洗脱的蛋白质在 NanoDrop 上于 280 nm 波长处测量，合并结果以确定总洗脱蛋白量。蛋白质回收率以百分比和毫克数表示，并作为蛋白质浓度的函数作图。

洗脱参数

蛋白 A IMCStips 在样品孔中使用前先用 1x PBS 平衡。蛋白 A IMCStips 在样品孔中进行 25 个样品混合循环 (吸入 100 $\mu\text{L/s}$, 排出 30 $\mu\text{L/s}$, 吸入和排出后各保持 25 秒)。在 25 个样品混合循环后，额外使用 350 μL 排出体积进行吹出和吸头触碰步骤，以确保在洗脱前液体被排出。测试了不同体积的洗脱缓冲液 (0.1 M 乙酸钠, pH 3.4) (吸入 100 $\mu\text{L/s}$, 排出 60 $\mu\text{L/s}$, 吸入和排出步骤各额外保持 15 秒)。在每个洗脱混合循环后使用 NanoDrop 测量所得洗脱液。蛋白质回收率和未洗脱蛋白质作为洗脱混合循环的函数作图。在找到最佳洗脱混合循环后，筛选了不同类型的洗脱缓冲液 (0.1 M 甘氨酸 pH 3.0、0.1 M 柠檬酸钠 pH 3.0 和 0.1 M 乙酸钠 pH 3.4)。

致谢

编辑: Pamela Quizon 和 Matthew Polk。插图、排版和设计: Megan Capel。