

使用含有 Protein A 树脂的 IMCStips® 从 CHO 培养基中自动纯化抗体

IMCStips® Product:

Protein A

描述:

IMCStips®与Hamilton®
Microlab STAR工作站配合用于
蛋白质和免疫球蛋白的纯化

Available Tip Size: 1 mL size

Catalog Numbers:

树脂量	Catalog Number Rack of 96
25 µL resin	02-TK-H6 (R80-25-96)
50 µL resin	02-TK-H6 (R80-50-96)

方法优势:

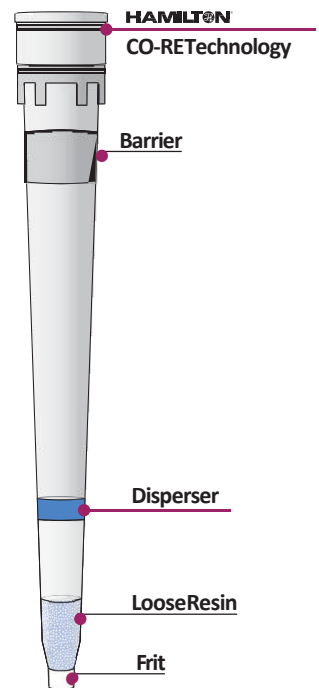
- 高重现性
- 减少人工操作时间
- 松散分散型树脂——树脂与分析物之间接触最大化
- 可提供定制自动化脚本
- 无需额外设备

Nikki Sitasuwan, Todd Mullis, Sunil Hwang, L. Andrew Lee
Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc. - Irmo, SC

引言

固定于色谱介质上的重组蛋白A (rPA) 被广泛用于许多学术和工业实验室中免疫球蛋白 (IgG) 的纯化。近年来已有报道表明, 使用传统柱格式或吸头柱格式以rPA实现纯化过程的自动化, 可快速筛选新型抗体候选物。在此前的研究中, 作者指出, 填充床吸头柱在较大树脂床体积下会遇到一些堵塞问题。

在此, 我们展示了在Hamilton® Microlab STAR工作站上使用IMCStips, 以MabSelect SuRe LX树脂进行IgG的INTip纯化。IMCStips采用Hamilton的CO-RE技术设计, 可在吸头上提供气密密封, 从而在吸头安装和弹出过程中最大限度地减少机械应力。在1 mL宽口吸头格式中使用50 µL的大树脂床, 从CHO培养基中纯化重组IgG, 在5个吸入/分配循环内可实现约80%的回收率, 而随着吸入和分配循环次数增加, 可实现接近完全的回收。与传统填充树脂不同, IMCStips的分散萃取技术利用吸头内的湍流混合来增加相互作用时间并提高萃取效率。与离心柱格式相比, IMCStips结合Hamilton Microlab STAR工作站上精确的流速控制以及重复的吸入和分配循环, 可提供更高的产率和更快的工作流程速度。



Protein A IMCStips® 的台面布局与工作流程

亲和纯化方法 (Protein A)



图1. 亲和纯化后进行缓冲液置换的典型台面布局

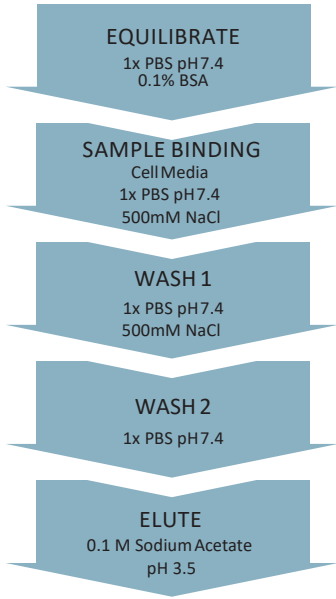


图2. 使用 Hamilton Microlab STAR 工作站进行基于 Protein A 的 IgG 纯化的工作流程。

结果

纯化工艺的开发使用MabSelect SuRe LX 树脂 (GE Healthcare) 来纯化在CHO细胞中表达的人源化 IgG1。初步研究比较了基于离心柱的纯化方法与 IMCStips INTip 化学方法。对于两种方法，均将相同的1 mL样品体积加载到离心柱和 IMCStips上。离心柱和 IMCStips 均装载了 50 μ L 亲和树脂。离心柱树脂/样品在离心前通过颠倒混匀。将流通液重新施加到离心柱顶部，颠倒混匀，然后离心。重复该过程以模拟INTip纯化过程中进行的重复吸入和分配循环。将样品在离心柱上重新施加5次确实使总产率比3次提高了15-20%。然而，收集流通液并将样品溶液重新施加到离心柱需要更多人工操作时间，从而导致更长的样品制备时间。尽管专门尝试了在离心柱上多次重新施加样品，INTip亲和纯化方法的回收率始终高出 20-30% (图3)。

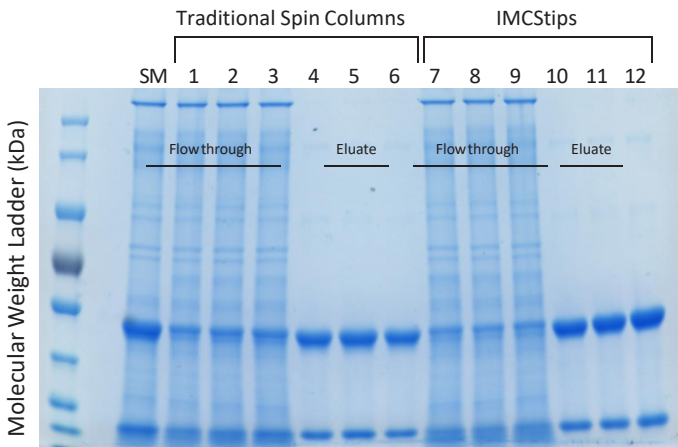
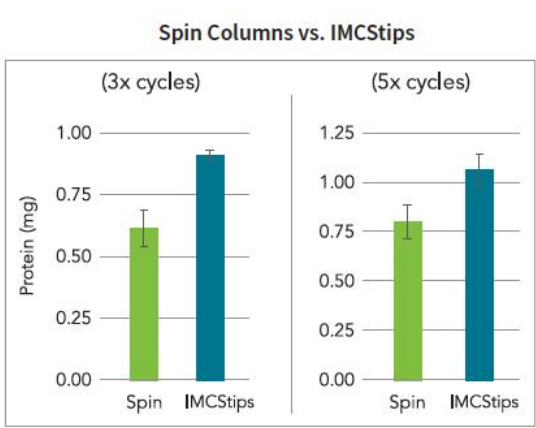


图3. 使用MabSelect SuRe LX树脂 (50 μ L树脂床) 通过离心 (spin) 和IMCStips®对单批次CHO细胞发酵液进行纯化。为保持一致性，离心方法使用200 x g RCF离心5分钟，流通液样品重新施加到柱上3次或5次，类似于吸头工作流程。如UV-Vis测量 (280 nm吸光度) 和SDS-PAGE所示，离心柱格式的一致性产生的mAb少于基于吸头的格式。

还对 INTip 亲和纯化测试了增加吸入和分配循环次数的影响，范围从单次循环到 20 次循环。约 70% 的目标 IgG 在 3 次循环内被纯化，80% 的 IgG 在 5 次循环内被纯化。虽然重复移液循环将总产率提高至最高 1.25 mg，但超过 5 次循环后，每微克纯化蛋白的时间效率降低 (图4)。

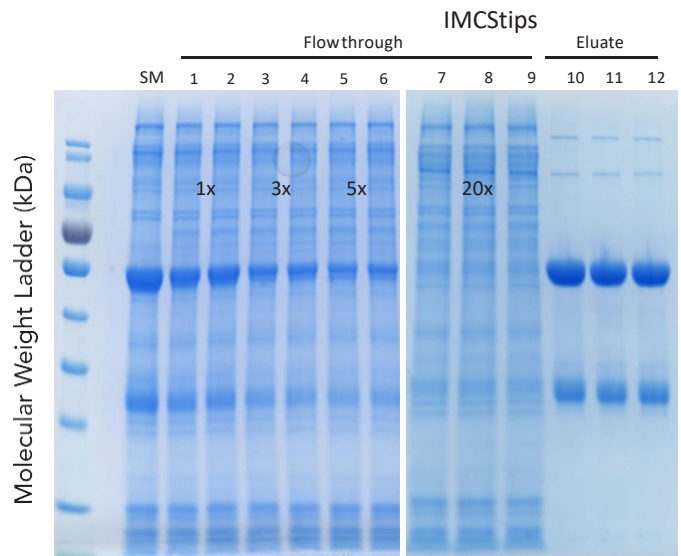
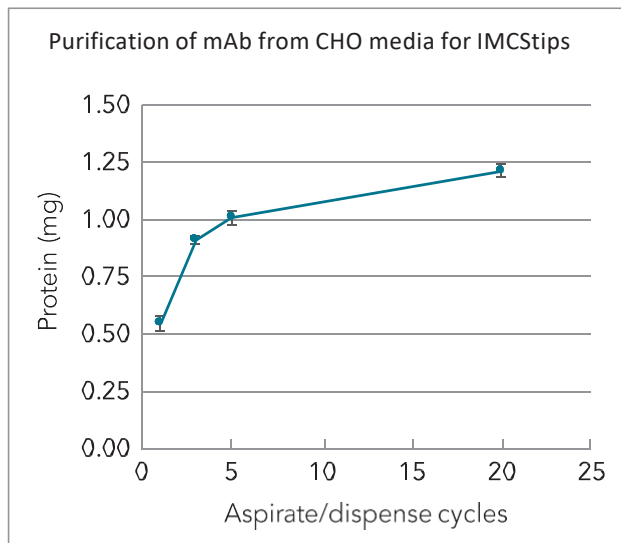


图4. 增加吸入/分配循环次数可提高IgG的最终产率，如通过 UV-Vis 蛋白定量 (280 nm吸光度) 所示，也如流通培养基中重链和轻链的耗竭所示。洗脱液为 20 次吸入/分配循环后，最终洗脱体积为 400 μ L NaOAc pH 3.5。样品用 1/10 体积的 1 M Tris pH 8中和。每个循环为重复运行，但最终 20 次流通液和洗脱液为三份重复。

IMCStips分散萃取的优势之一是树脂床体积可以大于传统填充床柱。树脂不会被压实，也不需要更高压力来实现适当的流速。尽管树脂床较大，为50 μ L，但在2 mg/mL至0.083 mg/mL的不同滴度范围内均实现了超过90%的回收率，这超过20倍的动态范围（图5）。同一批次细胞培养基的亲亲和纯化日间重现性显示变异小于10%（图6）。

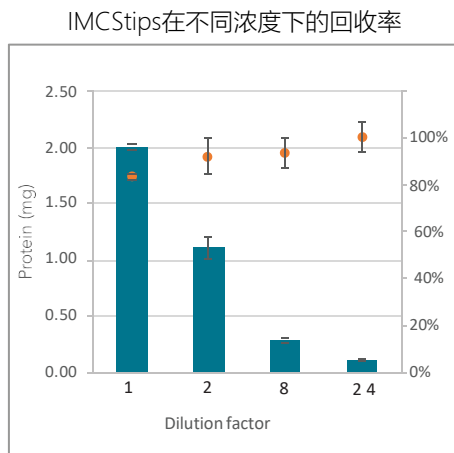


图5. 使用0.1% BSA的1x PBS (pH 7.4) 制备CHO培养基的系列稀释液，以评估不同浓度下的容量和回收率。

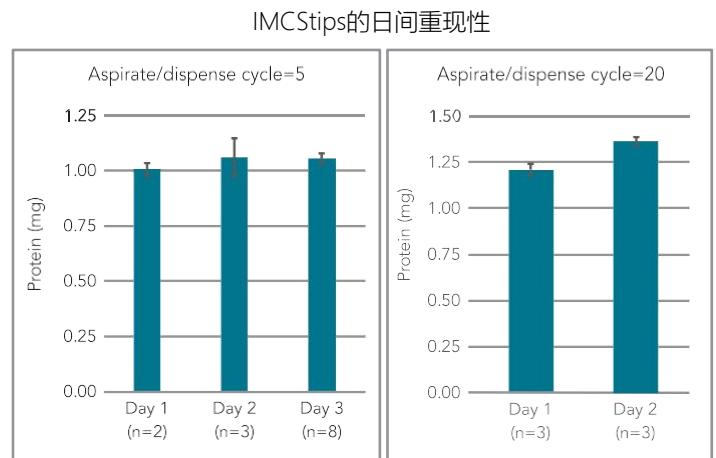


图6. 使用不同数量的吸头和两种不同的吸入/分配循环，在3天内测试了从细胞培养基中富集mAb的效果。

如 SEC 和 RP-UHPLC 所示，IMCStips 纯化的抗体质量与传统离心柱格式和 FPLC 工作流程一致（图7）。所有纯化过程均显示低水平的聚集体，将进行进一步研究以进一步扩展该自动化工作流程。

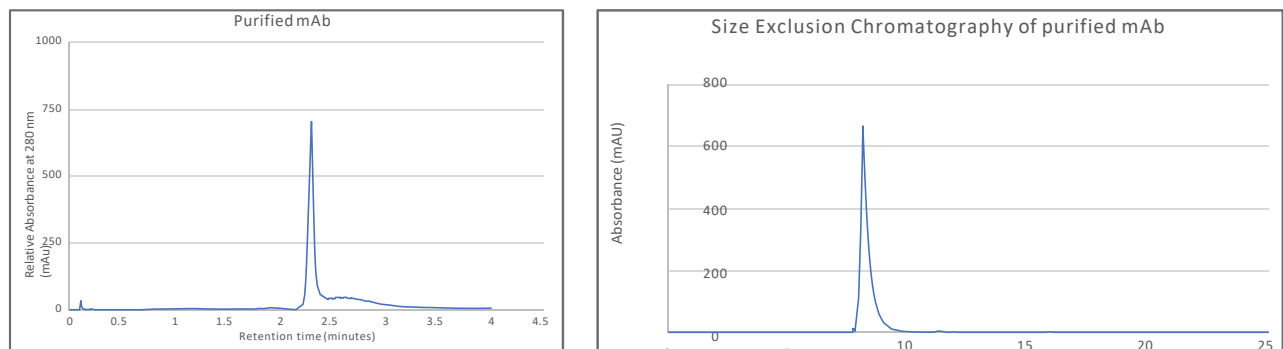


图7. 使用含 rPA 树脂的 IMCStips® 纯化的 mAb 通过反相 UHPLC (左) 和非变性SEC (右) 分析，显示与传统纯化方法 (未显示) 相似的图谱。

材料与方法

来自血清的人抗体和来自 CHO 培养基的人源化抗体

人血清样品取自健康志愿者。额外混合人血清样品购自 Thermo Fisher。在 CHO 细胞中表达的人源化抗体由合作者提供。在加载到 IMCStips 或离心柱之前，培养基经离心并使用 0.45 微米 PES 膜过滤器过滤。

人源化 IgG 的传统离心柱纯化

将装有20微米孔径的空离心柱装载 50 µL MabSelect SuRe LX 树脂。根据供应商规格和内部测量，计算浆液密度以确保每个离心柱装载 50 µL树脂。然后用 500 µL 1x PBS (pH 7.4) 通过将液体移液到树脂顶部来洗涤树脂。所有样品均在室温下以100 x g RCF离心2分钟。将1 mL细胞上清液加载到每个柱上，流通液重新施加3次或5次，以模拟吸头萃取过程的3至5次吸入/分配循环。第一次洗涤溶液使用1x PBS、500 mM NaCl (pH 7.4) ，随后使用1x PBS (pH 7.4) 进行第二次洗涤。洗脱使用400 µL 100 mM NaOAc缓冲液 (pH 3.5) 单次洗脱。洗脱液立即用1/10体积 (40 µL) 的1 M Tris pH 8中和。

Automation:



HAMILTON

Hamilton® Microlab STAR Workstation:
Automated Liquid Handler with a 96-Channel
Multi-Probe head

结论

各种目标分析物的亲和富集是在早期至晚期研究阶段中常规实施的流程。此处展示的工作基于使用 IMCStips 和大树脂床的自动化和高通量纯化，可在单个吸头中实现高达 2 mg 的 IgG 纯化。IMCStip 的性能优于离心柱格式 20-30%，工作流程速度比离心方法更快。IMCStips 的分散设计使树脂和样品混合，允许在窄吸头格式中使用大树脂床而不牺牲产率。只要对低滴度样品使用钝化剂，浓度范围从 2 mg/mL 降至 0.083 mg/mL 的回收率始终高于 90%。日间重现性显示小于 10%，如果吸入/分配循环保持在 20 次以下，整个工作流程可在 30 分钟内完成。总体而言，IMCStips 与 rPA 固定化树脂 (MabSelect SuRe LX) 的性能展示了使用自动化进行 IgG 纯化的顶级性能，实现快速、免手动的工作流程。



The image shows a graphical user interface (GUI) for controlling Hamilton Microlab STAR workstation cycles. The interface is organized into several sections, each with a title and two input fields for 'Mixing Cycles' and 'Mixing Volume'. The sections are: 'Testing Mode' (Activation), 'Wash 1', 'Condition' (with a 'Check to run Wash 2' checkbox), 'Wash 2 (Optional)', 'Equilibration', 'Elution', and 'Desalting Samples'. Each section has a 'Mixing Cycles' field (set to 3) and a 'Mixing Volume' field (set to 200). At the bottom right, there are 'CANCEL' and 'CONTINUE' buttons.

Graphical user interface to control aspirate and dispense cycles

在Hamilton Microlab STAR工作站上使用IMCStips进行分散移液萃取以纯化IgG

含有50 µL MabSelect SuRe LX树脂床的IMCStips为内部制造，并在使用前储存在20%乙醇中。将含有储存液的IMCStips加载到Hamilton甲板上。使用96 CO-RE头将储存液分配到废液槽中。然后将IMCStips用1x PBS (pH 7.4) 平衡，随后进行样品结合，可为单次吸入/分配循环或多次吸入/分配循环 (3、5、20次) 。洗涤、洗脱和中和溶液与上述离心柱格式相同。整个程序和操作均在标准Hamilton Microlab STAR工作站上进行，配备4个通道和1个CO-RE 96头及标准实验室器皿。未使用额外的定制设备或定制实验室器皿。

通过SEC和RP-UHPLC分析纯化的IgG

分析型SEC和RP在配备二极管阵列检测器的Vanquish UHPLC系统上进行。将约2-5微克纯化的IgG加载到MAbPac™ SEC-1 (Thermo Fisher) 上，以0.2 mL/min使用50 mM磷酸钠、300 mM NaCl作为运行缓冲液。对于RP分析，将纯化的IgG加载到AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 x 50 mm, 3.5 µm (Agilent) 上，使用水、0.1% TFA作为流动相A，异丙醇、乙腈、水 (70:20:10) 、0.09% TFA的混合物作为流动相B。流速为1 mL/min，梯度从15% B开始，在0.5分钟时升至25%，1.5分钟时升至35% B，3分钟时升至60% B。色谱柱在60% B下洗涤1分钟，然后在15%下重新平衡1分钟。