

应用纪要

## 使用蛋白A偶联磁珠和Andrew+实现抗体快速自动纯化

---

Yamin Htet, Stephan M. Koza, Weibin Chen

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

您想进一步了解Andrew+移液机器人吗？

申请产品演示

---

### 摘要

单克隆抗体一直是一类快速增长的生物药<sup>1</sup>。高通量小规模分析平台在一般研究中越来越受到追捧，其有助于使用微型生物反应器的生物药开发<sup>1</sup>。就此而言，亲和纯化是一种应用较广泛的分析前纯化策略，因为进一步分析往往需要高纯度抗体样品<sup>2</sup>。磁珠作为一种简单易用的分离介质，可以简化纯化过程，避免使用复杂仪器<sup>2</sup>。

目前，磁珠分离领域现有的许多自动化方案仍然包含若干手动干预步骤<sup>3</sup>。全自动抗体纯化方案将提高生物治疗药物分析工作流程的通量、节省时间并提升效率。

本文介绍了一种快速的全自动抗体纯化方案，可结合Andrew+移液机器人从细胞培养基中分离目标抗体。该方案可轻松调整以灵活适应高滴度或低滴度样品，得到所需浓度的纯化抗体。此外，也可以将低滴度样品浓缩成更高浓度的纯化抗体。

该快速方案全自动完成、重现性高、稳定性好，非常适合用于进一步分析。

## 优势

- 使用Andrew+的全自动蛋白A磁珠纯化方案
- 快速纯化方案（8个样品只需35 min）
- 20 µg~180 µg抗体载样量和0.2 µg/µL~1.5 µg/µL培养基样品滴度的回收率高于75%

---

## 简介

纯化步骤在治疗性抗体的工艺开发、生产和质量控制(QC)中是一项例行操作<sup>4</sup>。由于蛋白A选择性地与IgG抗体结合并且具有高亲和力，因此蛋白A亲和纯化是一种广泛应用的纯化策略<sup>1</sup>。同样，磁珠凭借其易用性也成为一种常用的纯化介质<sup>1</sup>。蛋白A偶联磁珠兼具蛋白A的高选择性以及从纯化样品中有效去除磁珠的优点<sup>1</sup>。

使用磁珠分离方法的现有自动化方案包含若干手动干预步骤，例如将磁珠添加至96孔板、转移样品板、在清洗和洗脱步骤期间将缓冲液添加至样品板以及将纯化样品转移到新样品板<sup>3</sup>。

本文介绍了一种使用Andrew+移液机器人（部件号：176850100）的全自动抗体纯化方案。该机器人使用Domino、微孔板抓取器（部件号：186009776）以及互联装置，例如96-PCR Plate Magnet+（部件号：186009956）和Microplate Shaker+（部件号：186009594），只需极少的手动干预。Andrew+的自动化功能使分析人员能够根据通量需求灵活使用单通道或8通道移液来处理样品。

---

## 实验

### 样品描述

移除CHO细胞的条件细胞培养基样品由合作者提供。使用澄清样品，无需进一步离心。使用的其他试剂和化学品如下表所示。

方案规格	材料	体积
磁珠	Magne®蛋白A磁珠, Promega Corporation	50 µL
细胞培养基	移除CHO细胞的条件细胞培养基	不定
平衡缓冲液	1x磷酸盐缓冲盐水(PBS), pH 7.4	3 x 150 µL
结合缓冲液	1x PBS, pH 7.4	不定
清洗缓冲液	1x PBS, pH 7.4 水	2 x 150 µL 2 x 150 µL
洗脱缓冲液	甘氨酸-盐酸, 200 mM, pH 2.5	2 x 50 µL
中和缓冲液	Tris-HCl, 2.0 M, pH 7.5	20 µL
样品平台	96孔twin.tec PCR板, 带裙边, 绿色, Eppendorf (部件号: 951020443)	200 µL/孔

表1. 抗体纯化方案所用试剂

## 方法条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC H-Class Bio系统
检测条件:	TUV检测器, 220 nm和280 nm
样品收集:	96孔twin.tec PCR板, 带裙边, 绿色 , Eppendorf (部件号 : 951020443)
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专 用柱, 200 Å, 1.7 µm, 4.6 × 150 mm (部件号: 186005225)
柱温:	关
样品温度:	4 °C

进样针位置:	5.0 mm (缺省值2.0 mm)
进样体积:	2 $\mu$ L
流速:	0.4 mL/min
运行时间:	7 min
流动相:	100 mM乙酸铵, pH 5.25 (含乙酸)
梯度:	等度洗脱

## 数据管理

色谱软件:	Empower 3
-------	-----------

## 仪器

为防磁珠意外进入液相色谱系统, 程序中设置了两项措施。将磁铁 (96孔深槽磁板, Permagen, 部件号: MSPU650) 放置在样品管理器96孔PCR板下方, 以完全捕获最终样品中的任何异常磁珠。针对液相色谱方法修改后的样品板参数如图1所示。将液相色谱方法中的进样针位置从缺省值2.0 mm更改为5.0 mm以适应变化。

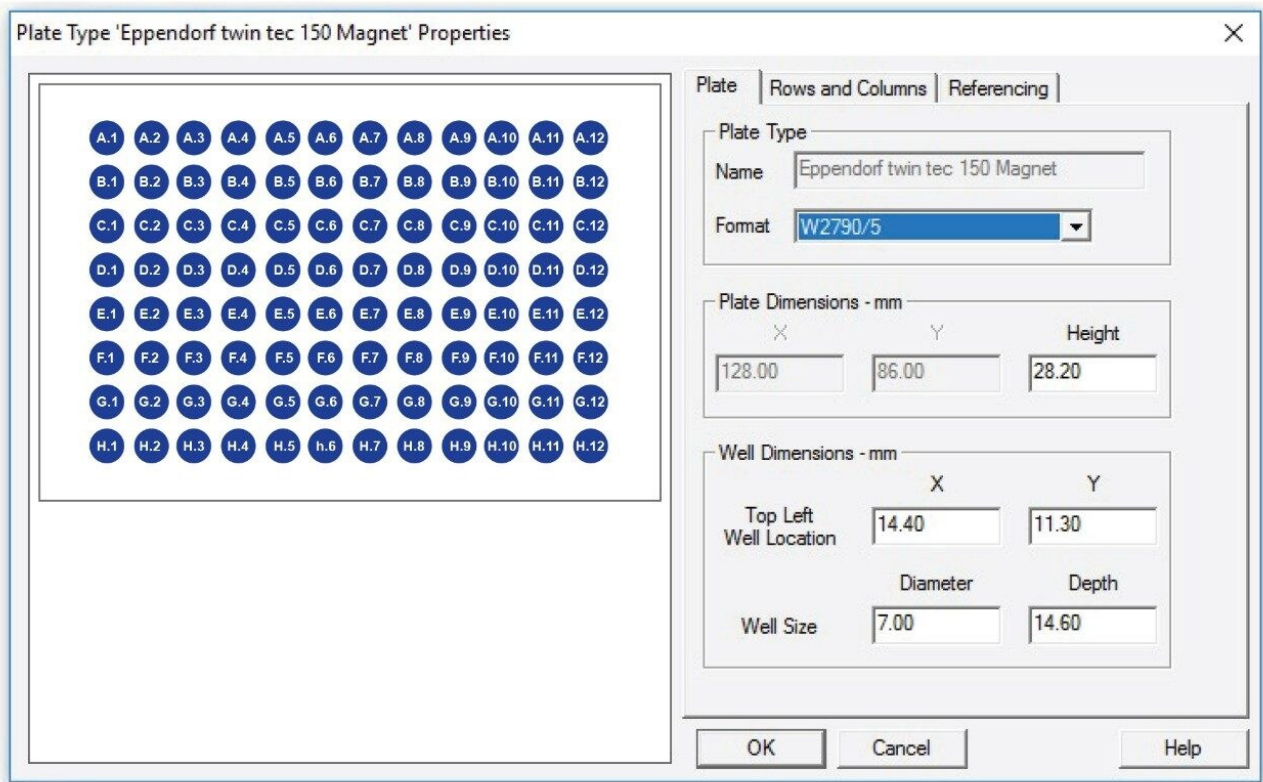


图1. Empower中的样品板参数，针对下方带有磁棒的96孔PCR板专门设置。

## 结果与讨论

使用磁珠进行抗体纯化的一般原理如图2所示<sup>5</sup>。简单来讲，就是先将样品与蛋白A偶联磁珠在结合缓冲液中一起温育一定时间，其间轻柔混合。然后洗出杂质，使用酸性洗脱缓冲液从磁珠上洗脱结合的抗体。

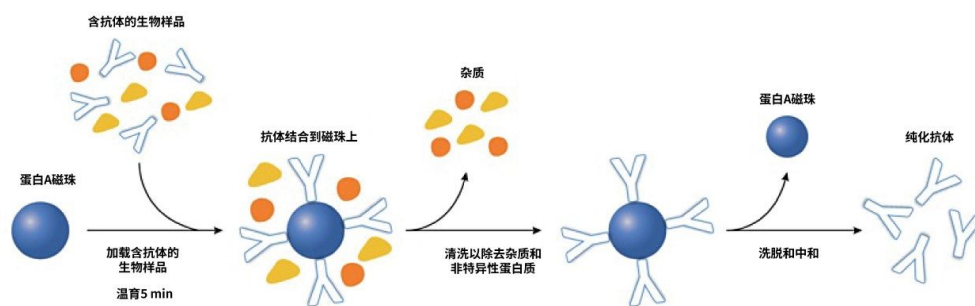


图2.使用蛋白A偶联磁珠进行抗体纯化的通用方案

## 抗体快速自动纯化方案对于生物治疗药物开发至关重要

该通用方案相对简单，但包含若干平衡/清洗步骤，且对多个样品手动执行常规方案可能费时费力。我们的全自动方案使用户无需采取任何手动干预步骤即可进行抗体纯化，大幅提高样品通量。自动化实验期间执行的步骤流程图见图3。其中介绍了三种程序，分别适用于不同抗体滴度和载样量（低载样量 $\leq 50 \mu\text{g}$ ，标准载样量 $\leq 75 \mu\text{g}$ ，高载样量 $> 75 \mu\text{g}$ ）的细胞培养基。低载样量方案包含额外的多次上样步骤，以便在最后洗脱浓度较高的样品。如果不需要更高滴度的纯化抗体供进一步分析，也可以对低滴度样品使用标准方案（载样量 $50 \mu\text{g}$ ， $0.5 \text{ mg/mL}$ ）。高载样量方案的温育时间长达10 min，而标准温育时间为5 min。如有必要，也可以在上样前用结合缓冲液(1x PBS, pH 7.4)稀释高滴度样品。

## Andrew+的自动化功能

在磁珠分离和蛋白质纯化领域，Andrew+提供了一种简化的全自动方案。相比之下，其他磁珠处理器仅提供半自动方案，需要1~5个手动干预步骤才能完成类似程序<sup>3</sup>。

## 抗体快速自动纯化方案可提高样品通量

本文介绍的快速自动化方案在纯化过程中只需极少的手动干预，8个样品的总运行时间仅35分钟。而使用Promega提供的同类型磁珠在其他类似装置上完成蛋白质纯化所需的总运行时间为1小时20分钟<sup>6</sup>。由此可见，Andrew+可通过互联装置有效简化基于磁珠的抗体纯化方案，如图4所示。



图3.抗体自动纯化程序的流程图，其中介绍了三种程序，分别适用于不同抗体滴度和载样量（低载样量 ≤ 50 μg，标准载样量 ≤ 75 μg，高载样量 > 75 μg）的细胞培养基。RT：室温。



图4.8样品抗体快速自动纯化方案的Andrew+ Dominos和互联装置配置。在全自动方案中，Andrew+需要使用两个互联装置（Magnet+和Shaker+）、一个微孔板夹具或微孔板抓取器。8个样品的运行时间为35 min。

## 自动开发抗体纯化方案

自动开发工作包括调整移液设置、吸头位置、移液技术和振摇速度，以尽量提高回收率。

### 移液设置/处理液体粘度

由于20%乙醇溶液的粘度低、挥发性强，磁珠悬浮其中，因此将移液器设置调整为低粘度模式，吸液和分配速度快于正常速度，如此可确保所有孔中分配的磁珠数量相似。如果改用其他供应商的磁珠，则可能需要调整这些设置。

分析细胞培养基样品时，将移液器设置调整为使用高粘度模式移取每个样品，以确保缓慢吸取和分配样品，避免剧烈搅拌，否则可能向蛋白质溶液中引入气泡。

### 吸头位置

关于移液器吸头位置，所有平衡步骤均使用“With respect to liquid”（相对于液体）选项，以免在纯化前吸取和丢弃磁珠。其他步骤均使用“With respect of bottom”（相对于底部）选项，以在洗脱前完全去除所有结合缓冲液。

### 移液技术/混合

通过多次抽吸确保样品充分混合及分配，在样品源多次混合样品可确保磁珠均匀分配。磁珠容易沉降，溶液在吸



入各个孔之前需要充分混合。因此，必须避免反复移液模式。建议在样品源试管中加入0.5~1.5 mL磁珠浆液，以便充分混合浆液。对于0.5~1.5 mL浆液，使用混合体积300  $\mu$ L以实现充分混合。

细胞培养基样品也需要在吸取前混合，因此采用类似的移液技术（移液前，在样品源抽吸三次）。

### 振摇速度和时间

在结合步骤，磁珠必须保持悬浮状态才能尽可能与样品结合，使用Microplate Shaker+可实现这一目的（图4）。理想的速度和时间为1350 rpm，5 min。如果改用其他供应商的磁珠，则可能需要调整样品振摇速度和时间。但要注意振摇动作不得过于剧烈，否则会导致样品起泡过多。

### 测定抗体回收率

利用条件培养基和蛋白A纯化样品测得mAb单体的SEC峰面积，据此测定经蛋白A纯化后的抗体回收率。虽然在条件培养基的SEC分离中低丰度宿主细胞蛋白可能与mAb共洗脱，但这种共洗脱对结果的影响非常小，只会导致蛋白A纯化的抗体回收率被低估。图5展示了培养基在纯化前（图5A，绿色迹线）、纯化后（图5C，红色迹线）和上清液（图5B，橙色迹线）的体积排阻色谱图。上清液由培养基中除抗体以外的组分组成，是抗体与磁珠上的蛋白A结合后剩余的溶液。

$$\% \text{回收率} = 100 \times (\text{校正后峰面积}_{\text{纯化样品}} / \text{峰面积}_{\text{加载的蛋白A}})$$

$$\text{校正后峰面积}_{\text{纯化样品}}^{\#} = \text{峰面积}_{\text{纯化样品}} \times (\text{总体积}_{\text{纯化样品}}) / (\text{总体积}_{\text{加载的蛋白A}})$$

<sup>#</sup>按第二个公式校正洗脱蛋白质的峰面积（峰面积<sub>纯化样品</sub>），因为蛋白质洗脱体积（总体积<sub>纯化样品</sub>）为120  $\mu$ L，而蛋白质上样体积（总体积<sub>加载的蛋白A</sub>）仅100  $\mu$ L。

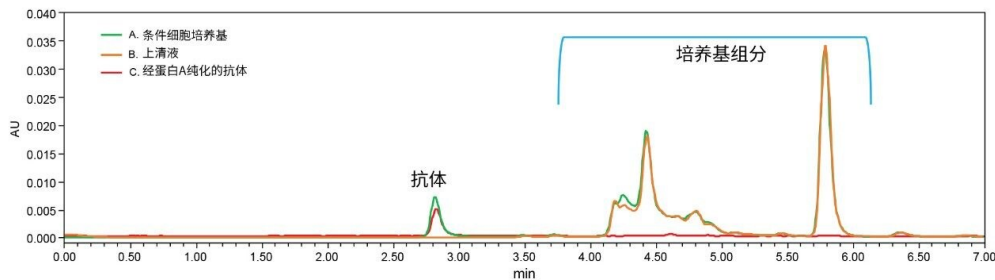


图5.细胞培养基样品在纯化前（A，绿色迹线）、纯化后（C，红色迹线）和上清液（B，橙色迹线）的体积排阻色谱图

## 抗体快速自动纯化方案具有良好的重现性和稳定性

Andrew+能够借助快速自动化方案使抗体获得高回收率，对于滴度约 $\leq 0.75$  mg/mL的样品，回收率值通常高于75%，并且具有可靠的重现性(%RSD $\leq 10\%$ )。手动程序和自动程序所获得的回收率相当，如图6所示。

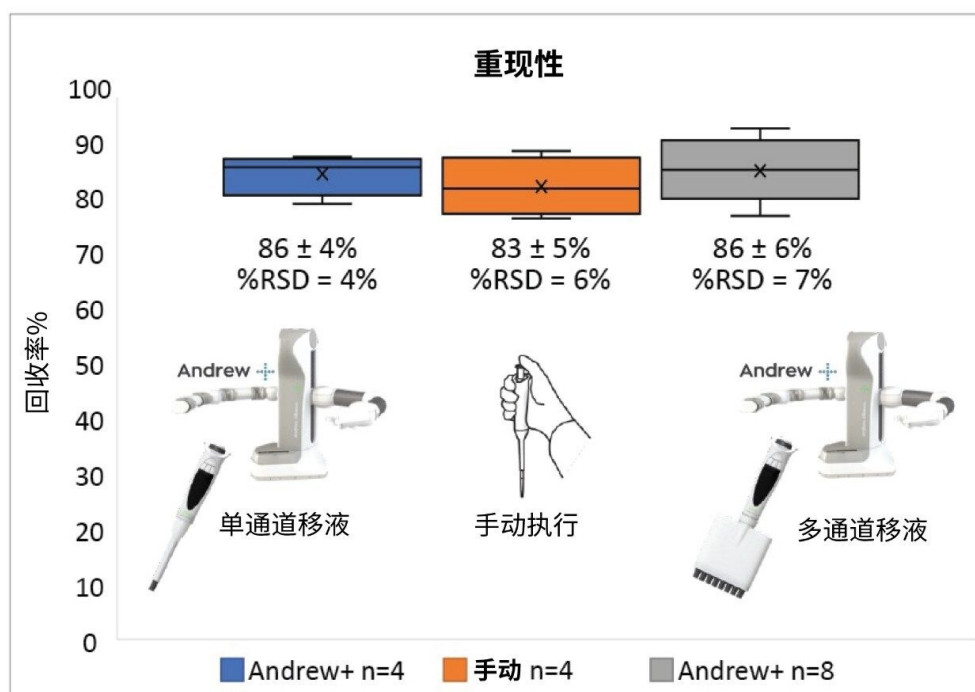


图6.手动程序( $n=4$ )与Andrew+移液机器人 ( $n=4$ 和 $n=8$ ) 获得的抗体回收率比较。标记(x)表示平均值。

通过改变捕获步骤所用的蛋白A磁珠数量 (图7A) 和洗脱缓冲液pH值 (图7B) 证明自动化方案的稳定性。使用磁珠时需要在匀浆中对磁珠进行移液操作。为评价磁珠使用数量对抗体回收率的影响，使浆液在标准用量( $50 \mu\text{L}$ )基础上 $\pm 10\%$ 。这些存在变异的实验仍然获得了令人满意的抗体回收率 ( $>50\%$ , 图7A)。

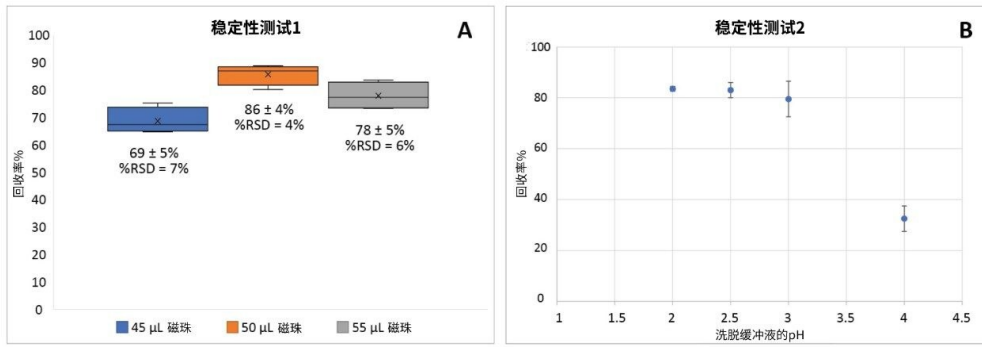


图7.自动化方案的稳定性评估。(A)使用三种不同数量的磁珠 (45  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$  [标准]、55  $\mu\text{L}$ ,  $n=4$ ) 和(B)四种不同pH水平的缓冲液 (pH = 2、2.5 [标准]、3、4,  $n=2$ ) 时抗体的回收率比较。标记(x)表示平均值。

另一个可能对抗体回收率产生显著影响的变量是洗脱缓冲液的pH。标准方案使用pH 2.5的甘氨酸-盐酸(0.2 M)作为洗脱缓冲液。为测试稳定性,本研究利用pH范围2~4的洗脱缓冲液进行洗脱(图7B)。当洗脱缓冲液的pH在2~3之间时,回收率不受影响。但采用pH 4的洗脱缓冲液时观察到回收率较低。因此,该纯化方法在pH 2~3之间保持稳定。

## 快速自动化方案对于低滴度和高滴度样品均适用

低滴度样品( $\leq 50 \mu\text{g}$ )可通过多次上样获得高浓度纯化抗体。将滴度为 $0.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的细胞培养基上样三次(总共180  $\mu\text{g}$ ),每次100  $\mu\text{L}$ 并耗时5 min,再结合交替清洗步骤,可获得与培养基样品单次上样相当的抗体回收率(80%) (图8)。

虽然5 min标准温育时间对于低滴度样品已经足够,但是对于高滴度样品( $>75 \mu\text{g}$ ),需要更长的温育时间(10 min)才能获得高回收率。150  $\mu\text{g}$ 培养基载样量的样品纯化使用5 min温育时间得到的回收率为65%。将温育时间从5 min延长至10 min后,得到的回收率由65%增加至87%,如图8所示。或者,也可以在上样前用结合缓冲液稀释高滴度样品。

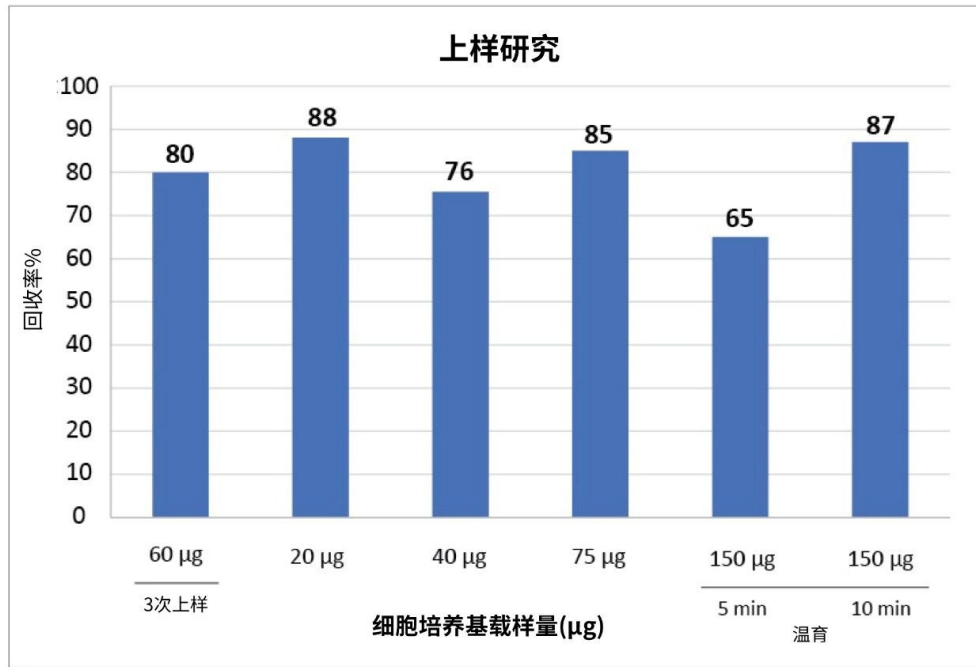


图8.不同抗体载样量 (20 μg、40 μg、75 μg、150 μg和180 μg) 细胞培养基样品的抗体回收率。通过上样三次60 μg样品结合中间清洗步骤( $n=2$ )获得多次上样的数据。上样体积为100 μL；培养基样品滴度范围为0.2 μg/μL~1.5 μg/μL。

## 结论

抗体快速纯化方案的重现性高、稳定性好，可以从细胞培养基中高产率（回收率高>75%）提取抗体。该方案全自动完成，无需手动干预，可提高通量。该方案可轻松调整以灵活适应高滴度和低滴度样品，得到所需浓度的纯化抗体。此外，也可以将低滴度样品浓缩成更高浓度的纯抗体。

## 参考资料

1. Choe, W.; Durgannavar, T. A.; Chung, S. J. Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of

High Affinity Proteins and Peptides.*Materials* 2016, 9, 994.

2. Brechmann, N. A.; Eriksson, P.; Eriksson, K.; Oscarsson, S.; Buijs, J.; Shokri, A.; Hjalms, G.; Chotteau, V. Pilot-Scale Process for Magnetic Bead Purification of Antibodies Directly From Non-Clarified CHO Cell Culture.*Biotechnol.Prog.*2019 Jan, 35(3), 1–10.
3. Kuhn, E.; Fabbami, L.; Heuvel, Z. V. D.; Murphy, S.; Jaffe, J. D.; Carr, S. A. Automation of the Multiplexed Peptide Immune-MRM-MS Workflow on Bravo AssayMAP Platform.Broad Institute, Cambridge, MA; Agilent Technologies, Santa Clara, CA.
4. GE Healthcare.Antibody Purification Handbook.
5. Magne Protein A Beads and Magne Protein G Beads for Antibody Purification.Promega Corporation: Madison, WI, 2015.
6. Bratz, M.; Godat, B.; Wiczorek, D.; Nath, N. A Robust High-Throughput Method for Antibody Purification using Magnetic Beads on the KingFisher Flex Platform.Promega Corporation: Madison, WI, 2016.
7. Li, Feng; Vijayasankaran, N.; Shen, A.; Kiss, R. I.; Amanullah, A. Cell Culture Processes for Monoclonal Antibody Production.*mAbs.*2010 Sept, 2(5), 466–477.

## 致谢

感谢合作者慷慨提供细胞培养基。

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

在LC和LC-MS样品前处理工作流程中实现自动化液体处理 <  
<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135070059>>

ACQUITY UPLC色谱柱 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513206>>

---

720007343ZH, 2021年8月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)