采用磁珠技术进行高载量，小规模抗体纯化

Fredrik Borg, Ann Bergh, Stefan D Eriksson, Gunnar Glad, Therese Granér, Anna Gröberg, Helena Hedlund and Ulf Hellberg
GE Healthcare Bio-Sciences AB, SE-751 84, Uppsala, Sweden

背景

从血清，腹水以及细胞培养上清中纯化抗体的熟知方法是利用葡萄球菌蛋白A或链球菌蛋白G与IgG的Fc段的高亲和力进行纯化。使用蛋白A或蛋白G磁珠进行抗体纯化正是利用了其与抗体高度特异结合的优点，同时提供了一种简单，易于操作的工具，用于从ul到ml级别的抗体快速分离。

特点

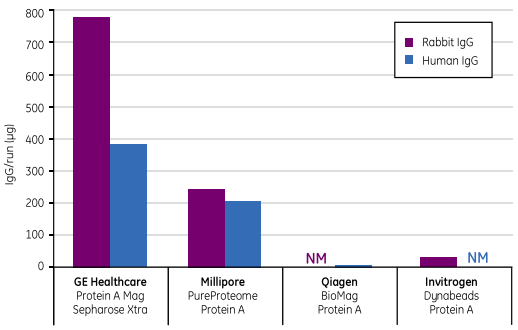
表1. 蛋白A Mag Sepharose™ Xtra和蛋白G Mag Sepharos Xtra的特征

基质	含磁铁的高度交联的球形琼脂糖（琼脂糖凝胶）
颗粒大小	37至100 μm
配体	蛋白A和蛋白G
浆浓度	10%
吸附容量	>27 mg人IgG/ml 培养基
纯度	>90%
产量	>270 ug人IgG/次
磁珠属性	对于磁场具有快速强烈的反应，能在数秒内进行磁珠吸附
可放大性	可进行小（μl）到大（μl）规模的纯化

抗体吸附容量-基准研究

为了研究抗体的吸附容量，对不同磁珠产品进行比较基准研究。容量的大小是根据不同生产商的操作指南分别对过量的人IgG和兔IgG纯化来进行判断。结果表明蛋白A Mag Sepharose Xtra和蛋白G Mag Sepharose Xtra与Millipore，Qiagen和Invitrogen的同类产品相比具有明显更高的吸附容量。采用蛋白A Mag Sepharose Xtra和蛋白G Mag Sepharose Xtra单次实验可收获大约380 μg的人纯化IgG和780 μg 的兔IgG。

容量比较—蛋白A磁珠



容量比较 –蛋白G磁珠

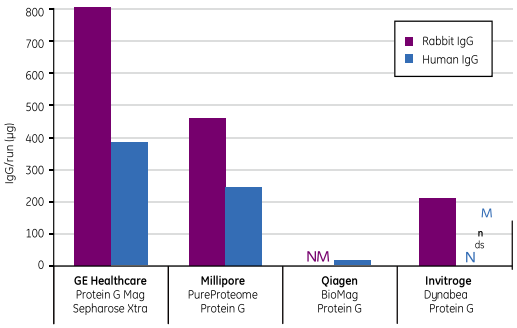


图1.不同蛋白A和蛋白G磁珠对人IgG和兔IgG吸附容量的比较。每根柱条表示单次纯化所收获的纯IgG的量。NM=未测出。所有的比较实验都选择在通用医疗集团实验室进行。

洗脱条件的筛选

析因实验设计中对洗脱缓冲液中的pH和NaCl以及精氨酸浓度的作用进行研究。研究中的响应为回收率，共开展18个实验。上样量约为24 mg人IgG/ml 沉淀介质。用洗脱缓冲液洗脱介质3遍，残留的蛋白用脱洗缓冲液进行脱洗。然后对回收率和物料平衡进行计算。

介质：	蛋白A Mag Sepharose Xtra
介质均浆体积：	每次试验100 μl（10 μl的沉淀介质）
样品：	将CHO细胞表达的单克隆人IgG抗体稀释至0.8 mg/ml
吸附缓冲液：	PBS（10 mM磷酸盐，140 mM NaCl，2.7mM KCl），pH7.4
洗脱缓冲液：	20 mM醋酸钠，0-750 mM NaCl，0-1 M精氨酸，pH 3-4
脱洗缓冲液：	100 mM甘氨酸-HCl，pH 2.8

表2.实验设计

实验次数	PH	NaCl浓度(mM)	精氨酸浓度(mM)
1	3.5	375	0.5
2	4.0	750	0
3	3.0	750	0
4	4.0	0	1.0
5	3.5	375	0.5
6	3.0	0	0
7	4.0	0	0
8	4.0	750	1.0
9	3.5	375	0.5
10	3.0	750	1.0
11	3.0	0	1.0
12	3.0	375	0.5
13	4.0	375	0.5
14	3.5	0	0.5
15	3.5	750	0.5
16	3.5	375	0
17	3.5	375	1.0
18	3.5	375	0.5

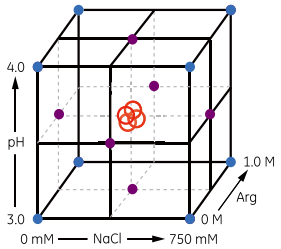


图2.立方体是根据表2中实验设计所列出的实验空间

研究评估

回收率数据通过DoE软件MODDE（版本9.0，Umetrics）进行评估。洗脱缓冲液若采取低pH值配合缓冲液中的NaCl可导致沉淀发生，而缓冲液过高pH和高NaCl浓度又会导致回收率过低。因此在图3的DOE平面图中将NaCl浓度设定到0。结果显示洗脱pH<3.2时回收率最佳，而加入精氨酸能轻微的提高回收率。

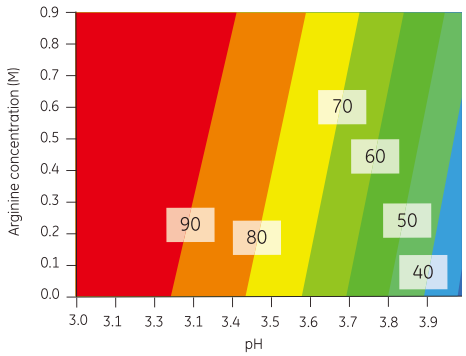


图3.回应轮廓平面图显示洗脱缓冲液中不同pH和精氨酸浓度下的回收百分率。

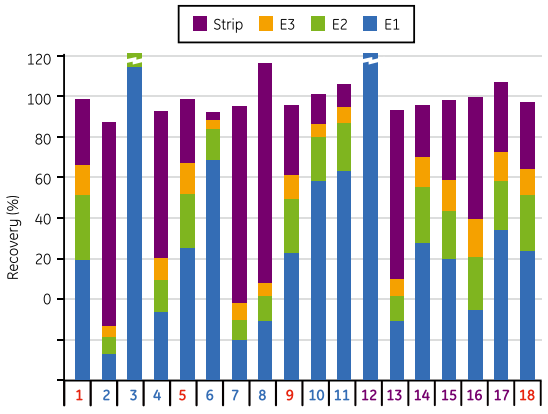
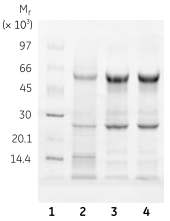


图4.原始数据图显示了三种洗脱成分和脱洗成分中的产物回收。其中第1,5,9和18次实验为重复的中间点。第3和12次实验显示物料平衡，结果明显高于100%，表明在这些洗脱成分中有沉淀的发生。

大体积的低表达小鼠IgG$_{2b}$的纯化

磁珠纯化的一个重要优势在于能应用于不同体积的样品和介质匀浆。本研究成功地纯化了50 ml细胞上清稀释液（0.07 mg Ab/ml）中低表达的单克隆小鼠IgG2b，并使用1.75 ml的蛋白A Mag Sepharose Xtra对其进行浓缩。上样量为20 mg/ml的沉淀介质，所有的实验均为两次重复。SDS-PAGE分析的结果表明其纯化产物具有高度的特异性，且产物回收率约为70%。纯化的小鼠IgG$_{2b}$从50 ml浓缩至3.5 ml。

介质：蛋白A Mag Sepharose Xtra
介质均浆体积：1.75 ml （175 µl沉淀介质）
样品：杂交瘤细胞小鼠IgG2b
吸附缓冲液：50ml （用25 ml吸附缓冲液稀释 25 ml的细胞上清）
吸附缓冲液：PBS (10 mM磷酸盐，140 mM NaCl，2.7mM KCl)， pH7.4
洗脱缓冲液：100 mM甘氨酸-HCl， pH 2.8



泳道
1. 低分子量标准
2. 样品
3. 洗脱混合物，纯化1
4. 洗脱混合物，纯化2

图5. 采用蛋白A Mag Sepharose Xtra纯化得到的小鼠IgG$_{2b}$的SDS-PAGE分析结果（还原条件，Deep Purple™总蛋白染色）

可重复的抗体纯化

为了考察蛋白G Mag Sepharose Xtra的重复性，分别进行六次独立的纯化操作。上样量为介质总吸附容量的一半。洗脱成分的产量和纯度通过吸收值测定和SDS-PAGE分别进行判断。结果表明使用蛋白G Mag Sepharose Xtra无论在产量和纯度方面均有高度的重复性（RSD <2%）。

介质：	蛋白G Mag Sepharose Xtra
介质均浆体积：	100 µl （10 µl沉淀介质）
样品：	大肠杆菌中收集的人IgG
吸附缓冲液：	300 µl
吸附缓冲液：	PBS（10 mM磷酸盐，140 mM NaCl，2.7mM KCl）， pH7.4
洗脱缓冲液：	100 mM甘氨酸-HCl， pH 2.8

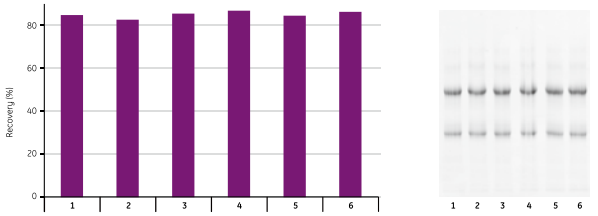


图6. 蛋白G Mag Sepharose Xtra上进行的六次重复纯化。左：每次纯化回收的纯化蛋白量。右：SDS-PAGE分析 (还原条件，Deep Purple总蛋白染色) 。

总结

蛋白A Mag Sepharose Xtra和蛋白G Mag Sepharose Xtra可提供：

- 高容量，小规模的抗体纯化
- 高纯度和高回收率
- 轻松筛查抗体，具有高度重复性
- 可放大性：可从小（µl）或大（ml）体积样品中进行抗体的简单捕获。