

Bio-Monolith Protein G 色谱柱 — 更多 mAb 滴度测定选择

应用简报

生物制剂与生物仿制药

作者

Phu T. Duong

安捷伦科技（中国）有限公司

前言

近年来，单克隆抗体 (mAb) 已成为可满足多种疾病治疗需求的主要生物制药产品。这些经特别设计的抗体具有特定基因构成，能够更好地靶向病原。在这些抗体的开发过程中，Protein A 和 Protein G 分析型亲和色谱柱可用于测定各种细胞培养上清液中的抗体滴度或浓度，以选出高产量的克隆。惰性聚合物 Monolith 可用作 Protein A 和 Protein G 色谱柱的担体。两种色谱柱都对抗体具有较高亲和性，因此它们能够仅结合细胞培养上清液中的抗体。然而它们的选择性各有不同，如表 1 所示。

本应用简报主要介绍 Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱。该色谱柱专为获得高速、高载样量而设计。文中给出的数据表明它同时具备线性与特异性。线性分析结果表明色谱柱在细胞培养上清液 mAb 准确定量分析中的超高性能。此外，使用寿命分析数据能够反映色谱柱具有高重现性、较长寿命以及出色的稳定性与低反压。Bio-Monolith Protein G 色谱柱是 Bio-Monolith Protein A 色谱柱的补充产品，可为单克隆抗体滴度测定提供更多选择。

表 1. Agilent Bio-Monolith Protein A 和 G 亲和色谱柱对不同 IgG 亚类的结合亲和性 [1,2]

抗体	Protein A	Protein G
人		
人 IgG1	++++	++++
人 IgG2	++++	++++
人 IgG3	-	++++
人 IgG4	++++	++++
人 IgA	++	-
人 IgD	++	-
人 IgE	++	-
人 IgM	++	-
小鼠		
小鼠 IgG1	+	++
小鼠 IgG2a	++++	++++
小鼠 IgG2b	++++	+++
小鼠 IgG3	+	+++
小鼠 IgM	+/-	-
抗体片段		
人 Fab	+	+
人 F(ab')2	+	+
人 scFv	+	+
人 Fc	+	+
人 K	+	+
人 λ	+	+

++++ = 强亲和性

+++ = 中等亲和性

++ = 弱亲和性

+= 微弱亲和性

- = 无亲和性

材料与方法

- 磷酸二氢钠一水合物（西格玛奥德里奇公司，部件号 S3522，分子量 137.99）
- 磷酸氢二钠二水合物（西格玛，部件号 71643，分子量 177.99）
- 一水柠檬酸（西格玛，部件号 C7129，分子量 210.14）
- 氯化钠（西格玛，部件号 S5886，分子量 58.44）
- 磷酸，85%（重量%）水溶液，纯度为 99.99%（基于痕量杂质检测）（西格玛，部件号 345245）
- 氢氧化钠溶液，50% – 52% 水溶液，IC 洗脱液（FLUKA 72064，分子量 40）
- 甘氨酸（用于电泳），纯度 ≥ 99%（西格玛，部件号 G8898，分子量 75.07）
- 冰乙酸（西格玛，部件号 A9967，分子量 60.05）

- 盐酸，36.5% – 38.0%，生物试剂，用于分子生物学研究（西格玛，部件号 H1758）
- 大肠杆菌细胞裂解试剂盒（西格玛，部件号 CB0500）
- 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞上清液和裂解液、昆虫细胞上清液、CHO 细胞衍生的人源单克隆抗体（IgG2 和 IgG3），购自 CreativeBio Labs

方法

流动相 A 结合缓冲液与清洗缓冲液，含有 50 mM 的磷酸钠缓冲液，pH 7.4。分别将 27.6 g 磷酸二氢钠一水合物与 35.6 g 磷酸氢二钠二水合物各溶解于 1 L 去离子水中，制得两种储备液 (0.2 M)。

含有 50 mM 磷酸钠缓冲液与 50 mM 氯化钠的 2 L pH 7.0 磷酸钠溶液的配制方法为：

- 将 195 mL 磷酸二氢钠一水合物储备液与 305 mL 磷酸氢二钠二水合物储备液混合。利用磁力搅拌器振摇混合
- 加入 5.8 g 氯化钠，并继续搅拌
- 加入 1 L 去离子水
- 测定溶液 pH，用 NaOH 或 3 M 磷酸将 pH 调节至 7.0
- 将溶液倒入 2 L 容量瓶，并加水定容至刻度

流动相 B 为含有 0.1 M 柠檬酸的 pH 2.0 洗脱缓冲液，配制方法是将 21 g 一水柠檬酸溶解于约 600 mL 水中并缓慢搅拌。利用 1 M HCl 将 pH 调节至 2.0，然后倒入 1 L 容量瓶并加水稀释。

CHO 细胞上清液、裂解液、昆虫细胞裂解液（所有样品均经过离心）以及人源单克隆抗体 IgG1、IgG2 和 IgG3 均购自纽约的 Creative BioLabs。大肠杆菌裂解液根据西格玛奥德里奇公司的推荐方案制备 [3]。试剂盒包括细菌细胞裂解试剂 CellLytic B (500 mL)、溶菌酶溶液 (10 × 1 mL)、核酸酶 (25000 单位) 以及混合蛋白酶抑制剂 (5 mL)。裂解液的制备方法是将 1.0 g 细胞体加入 10 mL CellLytic B 试剂中，然后添加 0.2 mL 溶菌酶、0.1 mL 蛋白酶抑制剂和 500 单位的核酸酶。将混合物短暂涡旋混合 10 min（手动或使用振荡器），以确保充分提取可溶性蛋白。将混合物以 5000 rpm 离心 10 min，使所有不溶物沉淀。将可溶性蛋白质成分（上清液）从细胞碎片（沉于试管底部的胞体）中小心除去。上清液中的蛋白质浓度可通过 Bradford 蛋白浓度分析法估计，本例中为 40 mg/mL。

根据本文所述，将 IgG1、IgG2 或 IgG3 加标至部分上清液中。利用结合缓冲液（或缓冲液 A）将上清液稀释至 10 mg/mL 的最终浓度，然后向其中加入 2 mg/mL 经纯化的人源单克隆抗体（如 IgG1、IgG2 或 IgG3 等）。

条件

色谱柱：Agilent Bio-Monolith Protein G 亲和色谱柱，直径 5.2 mm，长 4.95 mm（部件号 5190-6900）
 结合缓冲液：A: 50 mM 磷酸钠，pH 7.4
 洗脱缓冲液：B: 0.1 M 柠檬酸，pH 2.0
 样品：参见色谱图
 进样量：参见色谱图
 流速：1.0 mL/min（或参见色谱图）
 梯度：
 时间 (min) % A
 0 100
 0.4 100
 0.5 0
 2.0 0
 2.1 100
 4.2 100
 温度：25 °C
 检测器：UV, 280 nm
 系统：Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱

结果与讨论

特异性与选择性

如表 1 所示，Protein G 色谱柱对不同人源单克隆抗体亚类的结合亲和性高于 Protein A 色谱柱，并且只有 Protein G 对 IgG3 亚类具有亲和性。图 1A 中的数据表明了 Bio-Monolith Protein G 色谱柱的特异性及其滴度监测能力，即确定上清液中抗体是否存在及其浓度的能力。研究中使用含有纯化重组人源 mAb IgG3（CHO 细胞上清液加标物）的样品进样至色谱柱中。这一 mAb 在 CHO 细胞系中得到了表达。数据表明 IgG3 是由该色谱柱捕获并从中洗脱的唯一一种蛋白质，流速 1.0 mL/min 时在 1.6 min 左右出峰，其中所有宿主细胞蛋白质均未被色谱柱捕获，而是以流穿峰形式被洗脱。

为表明 Protein A 与 Protein G 色谱柱不同的选择性，两种色谱柱中均分别进样单克隆抗体 IgG1、IgG2 和 IgG3 进行了分析。上述两种色谱柱均可捕获 IgG1 和 IgG2（相关数据未显示），但 Bio-Monolith Protein A 未能捕获 IgG3，后者作为流穿峰被洗脱，因此 IgG3 仅可被 Bio-Monolith Protein G 捕获并从中洗脱（对比图 1A 和 1B）。

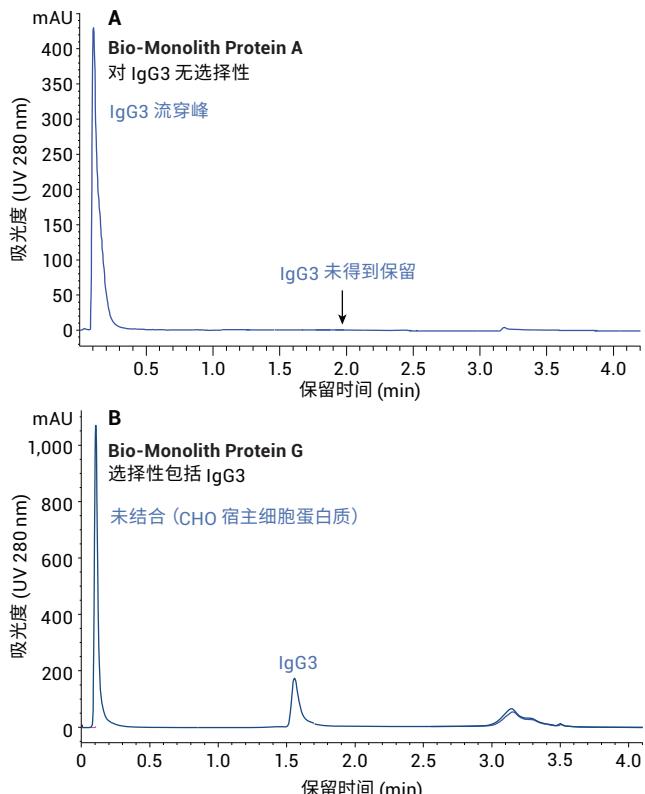


图 1. A) Bio-Monolith Protein A 色谱柱对 IgG3 不具备结合力。IgG3 以流穿峰形式被洗脱。2 mg/mL 人源 IgG3 与结合缓冲液混合（色谱柱进样量 3 μL）。B) Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱能专属性快速捕获加标 IgG3 的收获细胞培养物中的 IgG3（5 μL 2.0 mg/mL IgG3 混合 10 mg/mL CHO 细胞上清液进样至色谱柱）

此外本研究还进行了更加可靠的检测来确证 Bio-Monolith Protein G 色谱柱的特异性，即它对宿主细胞蛋白质并不具有结合亲和性。实验中使用的宿主细胞蛋白质来自大肠杆菌细胞裂解液、CHO 细胞裂解液、上清液以及昆虫细胞裂解液。上述裂解液中含有的宿主细胞蛋白质提取自含十二烷基硫酸钠（可显著影响与色谱柱非特异性结合的物质）的裂解缓冲液。这些样品中均不含抗体，仅含有宿主蛋白质。进行这项检测的原因为，如果色谱柱设计不合理，处理棘手样品时将得到非特异性结果。图 2 表明色谱柱没有吸附任意宿主细胞上清液中的任何蛋白。所有宿主蛋白质均以流穿峰的形式被洗脱。数据表明 Bio-Monolith Protein G 色谱柱对宿主细胞蛋白质无亲和性。

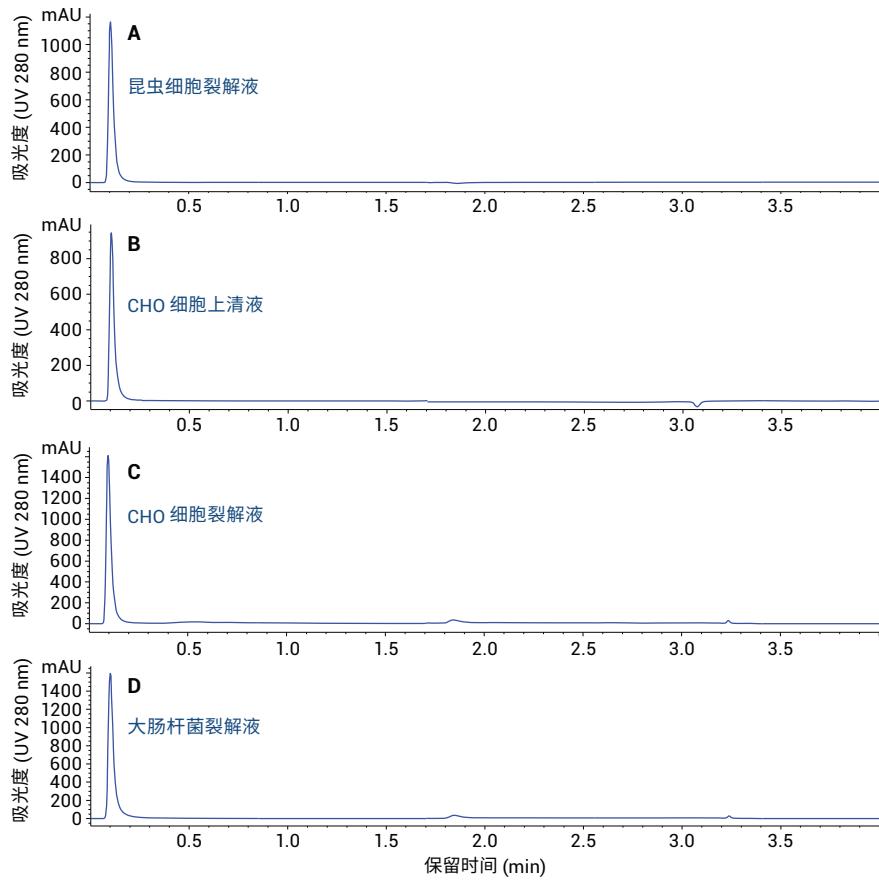


图 2. 采用 Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱与利用结合缓冲液稀释的 10 mg/mL 宿主细胞蛋白质得出的特异性分析结果。所有样品的进样量均为 5 μ L。A) 昆虫细胞裂解液, B) CHO 细胞上清液, C) CHO 细胞裂解液, D) 大肠杆菌裂解液

准确定量

在开发初期阶段选择细胞系时 mAb 滴度的准确定量至关重要，生产阶段也是如此，因为此时通过细胞培养上清液中的 mAb 量即可确定最佳收获时间。为证明 Bio-Monolith Protein G 色谱柱在准确定量 mAb 方面的能力，本研究使用不同量 (μ g) 的纯化 IgG 进样至色谱柱。将峰面积数据与生成的 IgG 量用于绘制线性曲线，以确定分析准确性。图 3 为通过 Protein G 色谱柱得到的峰面积线性，数据表明色谱柱可用于具有不同浓度范围的收获细胞培养介质中 mAb 的定量分析。色谱柱最低进样量为 2 μ g IgG。进样 2 μ g 时，信噪比不高于 1:1（相关数据未显示）。这一色谱柱的最大载样量约为 400 – 500 μ g IgG（相关数据未显示），涵盖了细胞系选择和生产过程中所能达到的量。

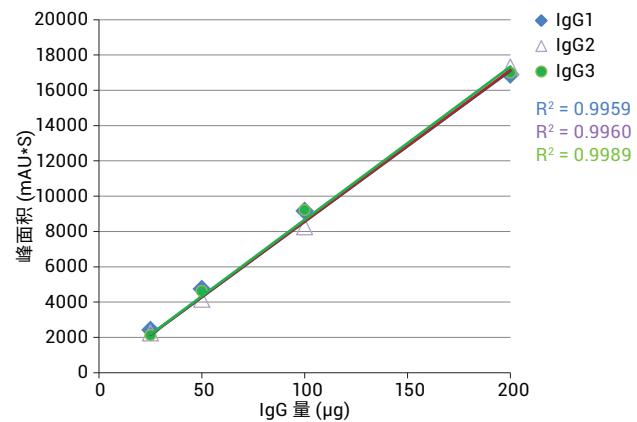


图 3. Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱定量分析单克隆抗体。线性曲线包括 25 – 200 μ g IgG 的峰面积数据

比其他供应商的 Protein G 色谱柱具有更宽的载样量范围

图 4A 显示 Bio-Monolith Protein G 色谱柱与其他供应商的 $2.1 \times 30\text{ mm}$, 4000\AA Protein G 色谱柱在宽 IgG3 载样范围下的线性对比结果。安捷伦色谱柱能够达到 $25 - 200\text{ }\mu\text{g}$ IgG3 的线性载样范围，而其他色谱柱仅可

在 $25 - 100\text{ }\mu\text{g}$ IgG3 内生成线性的数据，与他们文献中的推荐范围一致。在较高载样范围下无法保持线性的原因是色谱柱无法在高载样量下保留所有物质。实际上在载样量为 $200\text{ }\mu\text{g}$ 时，其他供应商的 Protein G 色谱柱会出现 mAb 的流穿峰（部分 IgG3 无法在色谱柱上保留，并以流穿峰形式被洗脱），如图 4B 所示。

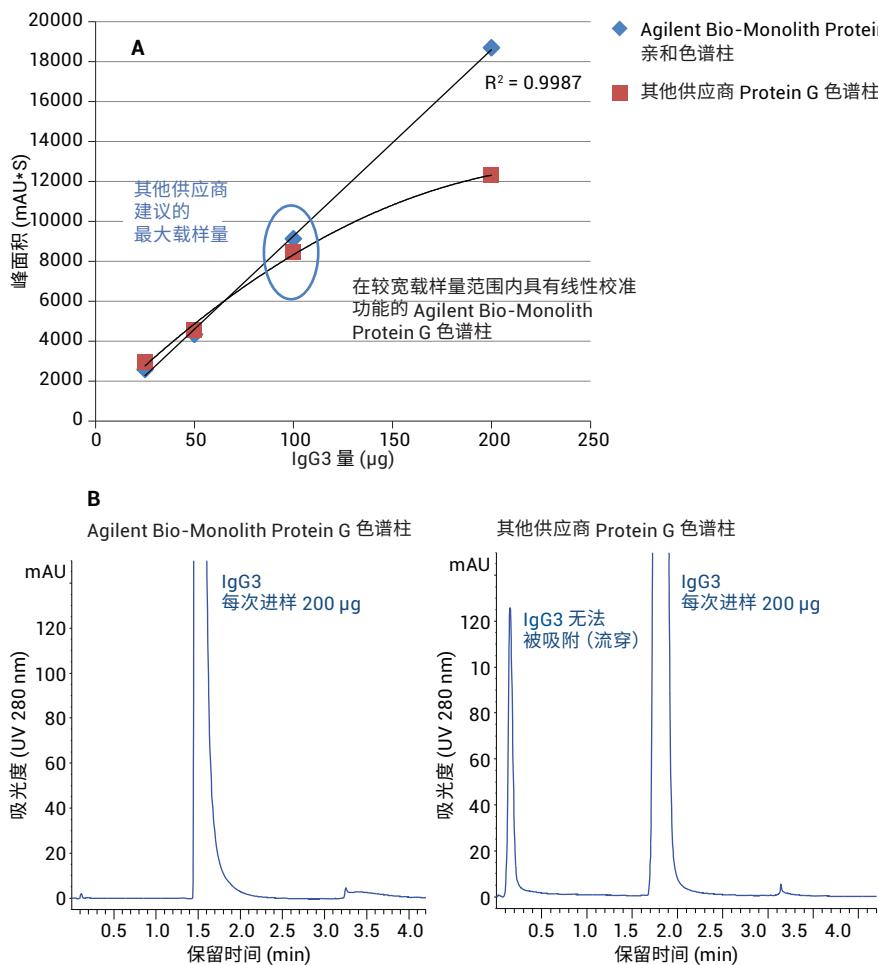


图 4. A) Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱与其他供应商的 Protein G 色谱柱的线性载样范围对比。B) 在 $200\text{ }\mu\text{L}$ 载样量下，其他供应商的色谱柱出现了流穿峰，而 Bio-Monolith Protein G 则未观察到流穿峰。说明 Bio-Monolith Protein G 具有更高载样量

快速分离

Bio-Monolith Protein G 专为快速分离而设计。图 5 通过 IgG3 在 1.0、1.5、2.0 和 2.5 mL/min 等流速下的分析结果，证明了此色谱柱在多种流速下的快速 mAb 捕获和洗脱能力（色谱柱的最高运行流速可达 3.0 mL/min，相

关数据未显示）。表 2 展示了流速和运行梯度。IgG3 峰的保留时间随流速升高而缩短。但所有流速下的相对峰面积均相似。这表明在所有流速条件下色谱柱均具有相似的回收率（表 3）。

表 2. 评估 Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱保留性能时所采用的流速和运行梯度

时间 (min)	%A	%B
1.0 mL/min		
0	100	0
0.4	100	0
0.5	0	100
1.7	0	100
1.8	100	0
4.2	100	0
1.5 mL/min		
0	100	0
0.3	100	0
0.4	0	100
1.3	0	100
1.4	100	0
3.0	100	0
2.0 mL/min		
0	100	0
0.2	100	0
0.3	0	110
0.9	0	100
1.0	100	0
2.1	100	0
2.5 mL/min		
0	100	0
0.1	100	0
0.3	0	100
0.7	0	100
0.8	100	0
1.7	100	0

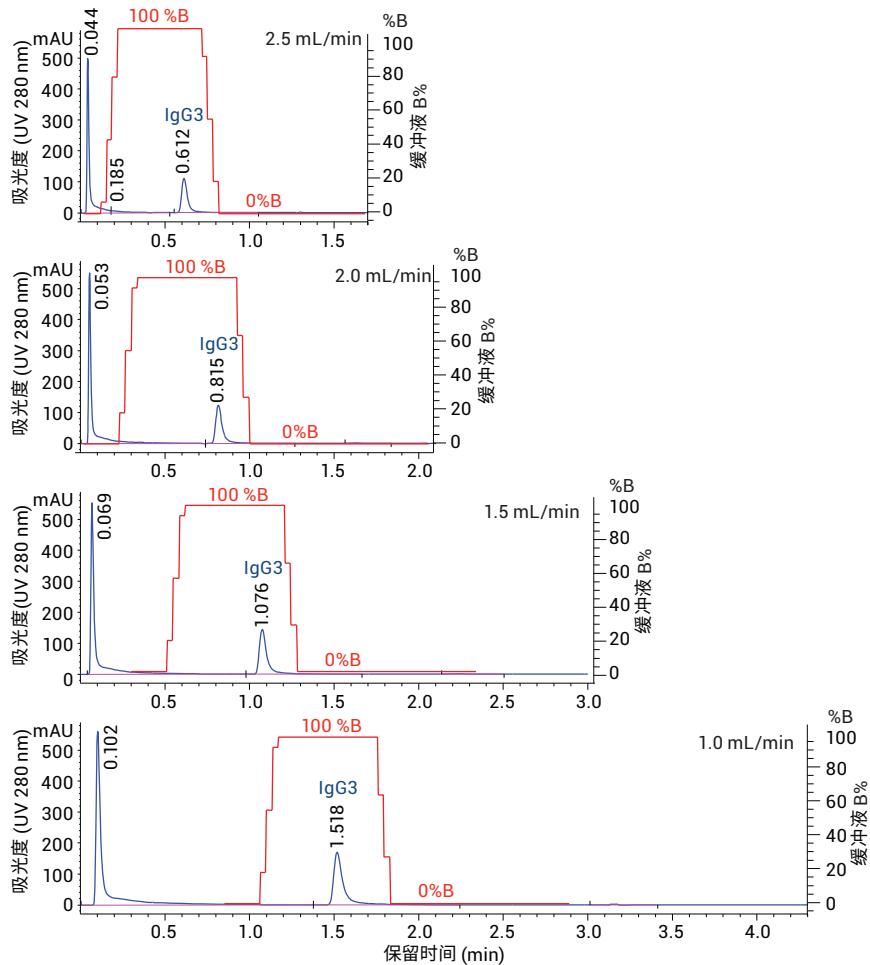


图 5. 在多种流速下对 IgG3 在 Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱上结合性能的评估。进样量为 5 μ L (2.0 mg/mL IgG3 混合 5 mg/mL CHO 细胞宿主蛋白)

表 3. Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱在所有流速下均表现出相似的流穿峰与 IgG3 峰之比

流速 (mL/min)	峰总面积 (mAU \cdot S)	流穿峰面积 (mAU \cdot S)	流穿峰相对 峰面积 (%)	IgG3 峰面积 (mAU \cdot S)	IgG3 相对 峰面积 (%)
2.5	798	521	65.3	277	34.7
2.0	1,056	709	67.1	347	32.9
1.5	1,390	932	67.1	458	32.9
1.0	2,069	1392	67.3	677	32.7

图 6 显示了色谱柱反压的线性曲线。当色谱柱流速在 1 – 2.5 mL/min 范围内以 0.5 mL/min 的增量增大时，反压以线性方式增大。色谱柱的最大反压为 150 bar。Bio-Monolith Protein G 色谱柱的常用分离流速为 1.0 mL/min。仪器流速设定在 1.0 mL/min 时，色谱柱反压约为 24 bar。流速升高至 2.5 mL/min 时，色谱柱反压升至约 60 bar。如前所述，高反压对色谱柱 IgG 结合力的影响最小。

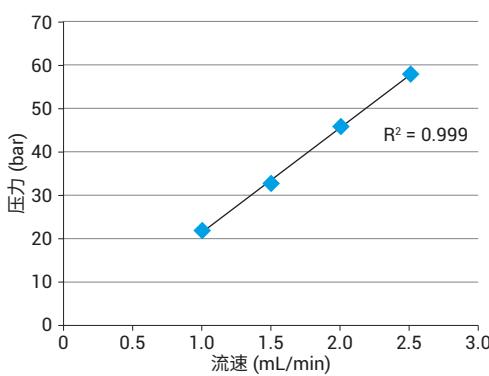


图 6. 流速与反压之间的关系。Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱的反压随流速线性升高而线性增加

对不同洗脱缓冲液的兼容性

图 7 显示了不同洗脱缓冲液对 Bio-Monolith Protein G 色谱柱的兼容性。IgG3 峰可通过多种酸性洗脱液洗脱得到。表 4 展示了酸性洗脱液的强度和 pH 值。这些洗脱液都能够以相似的保留时间将 IgG3 从色谱柱上洗脱下来（其他 IgG 得到的数据与此类似），而 12 mM HCl 除外；与其他洗脱缓冲液洗脱的 IgG3 峰保留时间相比，12 mM HCl 得到的 IgG3 峰保留时间更长。将浓度提高至 0.1 M 后，这种洗脱缓冲液的强度则能够获得与其他洗脱缓冲液类似的 IgG3 保留时间。

同样值得注意的是，每种酸性洗脱液得到的 IgG3 峰在峰宽和拖尾因子方面均会稍有不同。这表明不同的 IgG 条件下，酸性洗脱液类型及其强度会对保留时间、峰宽以及拖尾因子产生不同影响。因此必须通过实验根据 IgG 和数据预期来确定酸性洗脱液种类及其浓度。

表 4. 不同酸性洗脱液对 IgG 的兼容性与作用效果

峰编号	酸性	1 mL/min 下的压力 (bar)		
		PW	5% TF	1 mL/min 下的压力 (bar)
1	0.1 M 柠檬酸, pH 2.0	0.058	1.68	24
2	0.1 M HCl	0.053	1.58	24
3	5% 乙酸	0.071	1.85	24
4	0.1 M 甘氨酸	0.075	1.82	24
5	12 mM HCl	0.068	1.69	24

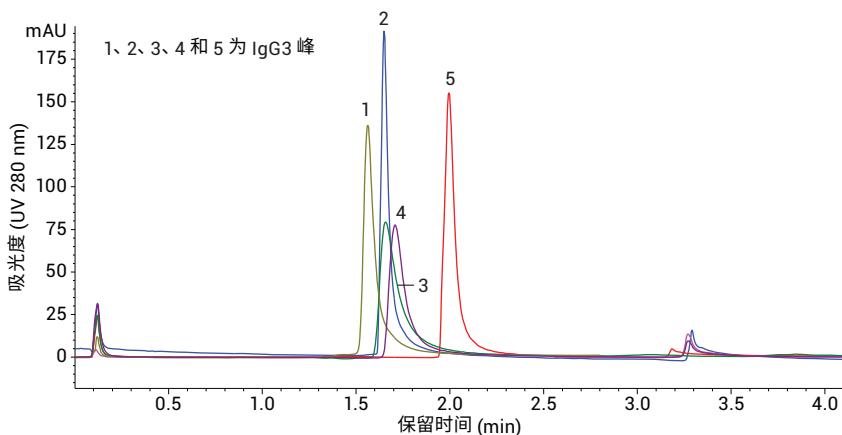


图 7. 使用不同酸性洗脱液从 Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱上洗脱得到的人源 IgG3 峰

原位清洗后的色谱柱性能恢复

图 8 表明 Bio-Monolith Protein G 色谱柱能够在原位清洗 (CIP) 后恢复其全部性能。方法是在使用加标 IgG3 的 CHO 细胞上清液和裂解液进样 1000 次以上之后，使用 IgG3 进样。数据表明色谱柱杂质较多时，IgG3 的峰宽增大，峰高降低（对比原位清洗前后的图 8A 和 8B）。

图 8A 中的数据还表明部分 IgG3 未被色谱柱捕获，而是以流穿峰形式被洗脱。色谱柱经清洗后恢复了全部性能，因此能够捕获全部 IgG3（见图 8B）。图 9 显示色谱柱正确清洗前后宽载样动态范围下的线性对比数据。CIP 前后的 IgG3 峰面积非常接近并且具有良好的线性。数据表明色谱柱得到了有效清洗并适用于表 5 中的清洗方案。

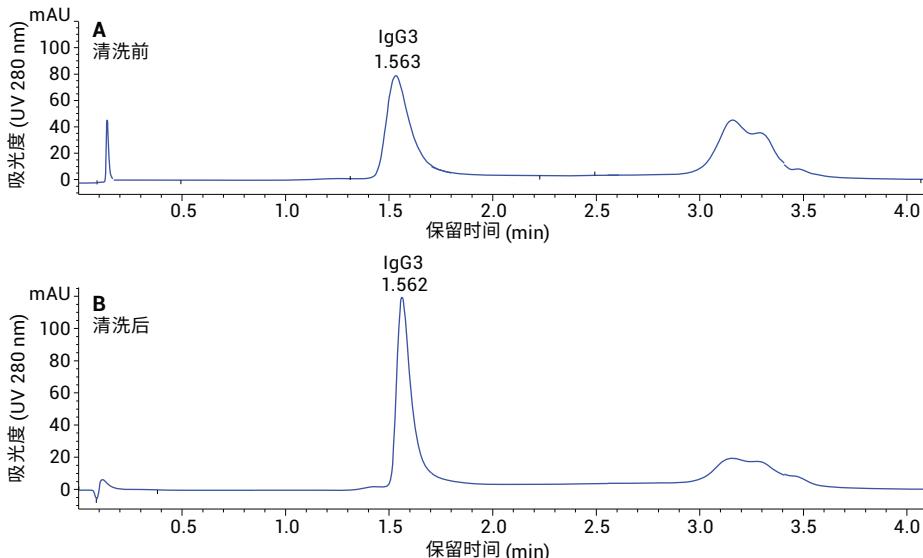


图 8. A) 在超过 1000 次进样后对 Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱进样 IgG3。色谱柱有较多杂质。B) 色谱柱经清洗后恢复了全部性能

表 5. Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱的原位清洗方案。为防止污染物进入色谱柱的剩余部位，首先应当以 0.2 – 0.5 mL/min 的流速反向冲洗色谱柱

步骤	解决方案	色谱柱冲洗用量 (CV)
1	0.1 M NaOH	10 – 20
2	去离子水	10 – 20
3	0.5 mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.4	10 – 20
4	使用结合缓冲液重新平衡色谱柱	50

有些情况下，仅仅对整体柱进行简单的再生是不够的。样品分子可能无法从色谱柱上彻底洗脱，甚至有可能沉淀在色谱柱中。这类污染物沉积在整体柱上，可能导致分离度和键合能力的降低、反压升高，或使色谱柱完全堵塞。因此，必须根据样品中存在的污染物类型设计特殊的原位清洗程序。有关再生建议的更多信息请参见用户指南。

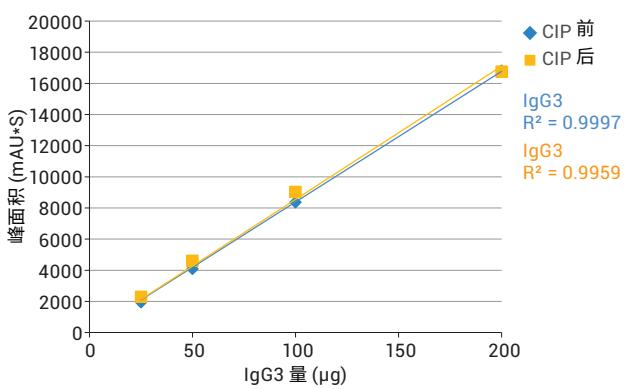


图 9. 宽载样动态范围内的 Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱在原位清洗前后的线性对比

使用寿命与重现性

图 10 和 11 显示了 IgG3 和 CHO 细胞上清液以及裂解液在 Bio-Monolith Protein G 色谱柱中连续 1000 次进样的结果。色谱柱首先接受 CHO 细胞上清液与裂解液的 40 次进样，然后接受 10 次 IgG3 进样。运行中将序列设置为不停顿的 1000 次进样以实现清洗目的。峰保留时间与峰面积的完整性（图 9）以及 IgG3 的峰拖尾因子和峰宽（图 10）几乎未发生变化，并且未对色谱柱的结合、分离和洗脱性能产生影响。

图 11 表明在 1000 次进样研究中峰宽和拖尾因子所受影响极小。

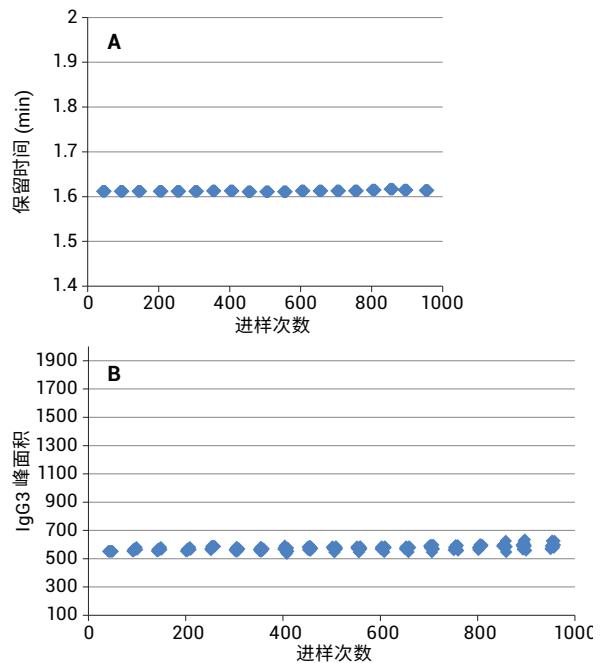


图 10. Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱在原位清洗之前进样 1000 次得到的重现性。A) 保留时间。B) IgG3 峰面积。每 40 次进样后记录 10 次进样，共计进行超过 1000 次进样。IgG3 的保留时间和峰宽未发生变化（标准偏差 = 2.5, n = 100）

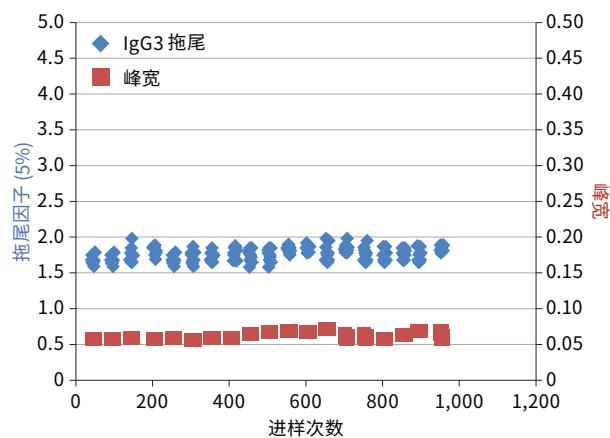


图 11. IgG3 在 Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱中进样超过 1000 次时的峰宽和拖尾因子一致性

结论

Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱对单克隆抗体亚类具有极高的亲和性。显然，该色谱柱能够捕获并准确定量宽线性载样范围内的上清液中的 mAb。色谱柱能够在不同的流速下有效地定量分析单克隆抗体，并且不影响数据质量。运行反压明显较低，说明 Bio-Monolith Protein G 色谱柱能够在低于 600 bar 的 HPLC 仪器中使用。该色谱柱可配合不同酸性洗脱液灵活使用，因此可使实验设计变得简单直观。Agilent Bio-Monolith Protein A 和 G 色谱柱可互相补充，因此 Protein G 色谱柱对 Protein A 色谱柱无法结合的 mAb 具有亲和性，反之亦然。这两种色谱柱能为更广泛的 mAb 异构体快速滴度测定提供更多选择。

参考文献

1. Richman, D. D.; Cleveland, P. H.; Oxman, M. N.; Johnson, K. M. The binding of 1. Staphylococci protein A by the sera of different animal species. *J. Immunol.* **1982**, *128*, 2300-2305.
2. Frank, M. B. Antibody Binding to Protein A and Protein G beads; 5. In *Molecular Biology Protocols*; Frank, M. B., Ed.; Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA, **1997**.
3. Anon. CellLytic B Plus Kit. Catalog numbers CB0500 and CB0050. Technical Bulletin. Sigma-Aldrich, Corp. St. Louis, MO, USA.

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅供研究使用。不可用于诊断目的。

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018
2018年7月6日，中国出版
5991-6094ZHCN



Agilent Technologies