

延长 Bio-Monolith Protein A 色谱柱在滴度测定中的使用寿命



作者

Andrew Coffey,
Sandeep Kondaveeti
安捷伦科技有限公司

摘要

Bio-Monolith Protein A 色谱柱已证实是快速筛选细胞培养上清液中 IgG 浓度的出色工具。较宽的动态范围（色谱柱进样从少于 1 μg 到多于 150 μg ）意味着可以从细胞培养上清液原液中快速获得准确的 IgG 浓度，从而快速进行克隆筛选或确定最佳收集时间。

过去，此类原始样品通常会造成色谱柱污染、非特异性结合或残留问题，导致色谱柱寿命缩短。原位清洗 (CIP) 等流程可以帮助恢复色谱柱性能，但是本应用简报展示了一种无需使用 CIP 中间步骤即可延长使用寿命的方法。

前言

滴度测定是指测定蛋白质浓度，是任何细胞培养流程中的重要组成部分。对于单克隆抗体，采用 Protein A 的亲和色谱是捕获、释放（和定量）靶标免疫球蛋白 IgG 的理想工具。快速的亲和色谱分析对于确定最高效的克隆、评估各种工艺参数的影响或监测批次进度以确定最佳收集时间来说至关重要。但是，细胞培养上清液原液是一种复杂的样品基质，会快速污染传统的 Protein A 亲和色谱柱。作为替代，包含 1.2–1.5 µm 通道的大孔径整体式固定相可提供出色的稳定性，最大程度减少残留。Bio-Monolith Protein A 色谱柱包含带有天然 Protein A 涂层的高度交联的聚(甲基丙烯酸环氧丙酯-二甲基丙烯酸乙二醇酯)聚合物。其对微克级的 IgG1 和 IgG2 分析表现出了良好的性能^[1]，足以用于滴度测定、极小规模纯化及后续分析，甚至可以在 2D-LC 配置中与互补技术结合使用。

本应用简报证明，在尚未进行 CIP 之前，色谱柱寿命已得到延长，可比之前进行更多次分析，使客户因此受益。

实验部分

试剂与化学品

所有试剂均为 HPLC 级或更高等级。

设备与材料

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别，且均购自 Sigma-Aldrich（现属于 Merck）或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 (Millipore) 纯化。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵（部件号 G5654A）
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler（部件号 G5668A），配备样品冷却装置（选件 100）
- Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱（部件号 G7116A），配备生物惰性热交换器（选件 019）
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR（部件号 G7115A），配备生物惰性流通池（选件 028）

软件

OpenLab 2.3 CDS

方法条件

HPLC 条件	
色谱柱	Bio-Monolith Protein A
结合缓冲液 (洗脱液 A)	50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4
洗脱缓冲液 (洗脱液 B)	100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.6
梯度曲线	时间 (min) %B 0.0–0.5 0 (结合) 0.6–1.8 100 (洗脱) 1.9–4.0 0 (再生)
流速	1 mL/min
柱温	24 °C
检测	UV, 280 nm
进样量	根据需要 (2–40 µL)

样品

样品溶液含 CHO 细胞裂解物上清液，用磷酸盐缓冲液按 1:3 v/v 稀释，并加入人 IgG，最终浓度 5 mg/mL。

CHO 细胞裂解物上清液的空白样品只使用磷酸盐缓冲液按 1:3 v/v 稀释，用于测定蛋白质残留。

结果与讨论

在进行一系列进样以确定长期性能之前，首先对 Bio-Monolith Protein A 色谱柱进行了一系列进样以绘制校准曲线。为获得校准曲线，利用加标了 5 mg/mL 人 IgG 的 CHO 细胞上清液进行一系列进样，如图 1 所示。用结合缓冲液（100% 流动相 A:50 mmol/L 磷酸钠，pH 7.4）冲洗后，逐次增加加标样品的进样量，样品进样之间进行空白进样。然后切换至洗脱缓冲液（100% 流动相 B:100 mmol/L 柠檬酸，pH 2.6）洗脱结合的人 IgG。在此洗脱条件下，观察到进样量为 200 µg（显示为橙色，不包括在线性拟合中）时，峰响应大于 3000 mAU，超出了检测器的线性范围。通过绘制峰面积与蛋白质进样量的关系图，可获得如图 2 所示的校准曲线。

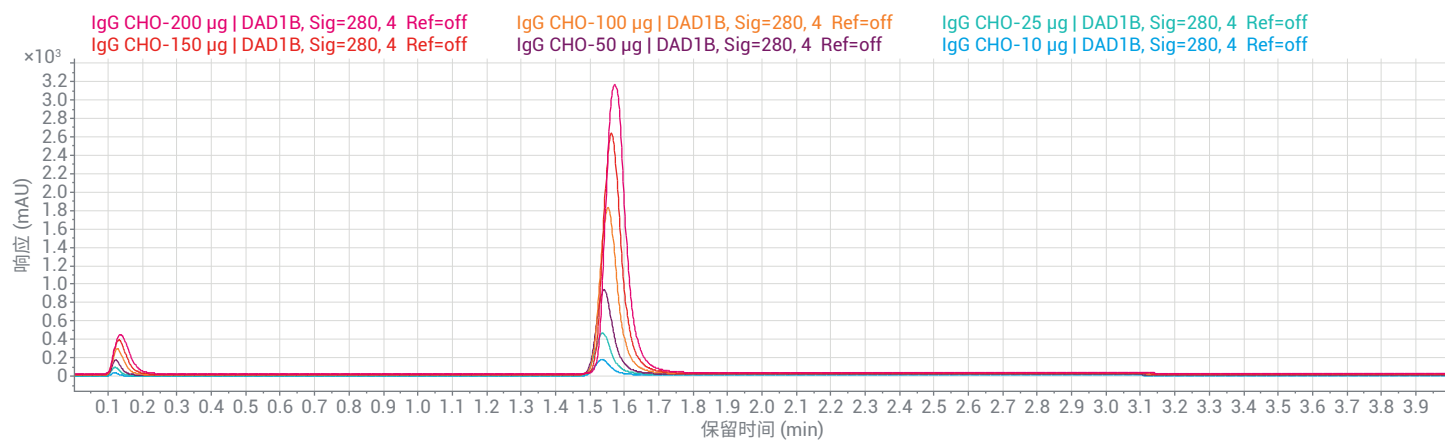


图 1. 显示进样量不断增加的色谱图

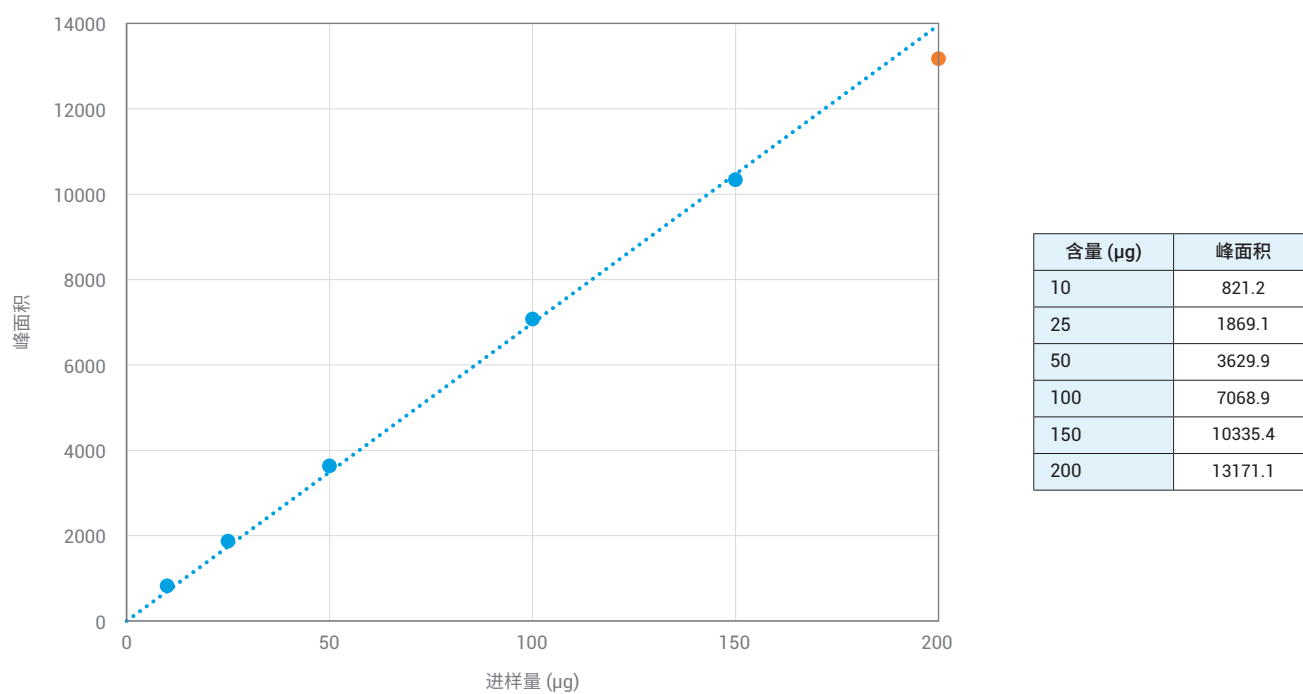


图 2. 人 IgG 含量逐渐增加的校准曲线

为避免检测器饱和，可能需要进一步稀释蛋白质浓度过高的细胞培养上清液。

校准后，使用稀释的细胞培养上清液对 Bio-Monolith Protein A 色谱柱进行空白梯度进样，以确保没有 IgG 残留或可能与 人 IgG 共洗脱的宿主细胞蛋白非特异性结合（图 3）。然后运行一个序列，其中包括 50 次细胞培养上清液稀释液（加标了 人 IgG）进样，然后重复进样空白直到进样超过 800 次。图 4 显示了第 1、250、500 和 750 次进样的叠加色谱图。在实验过程中（历时 4 天），未观察到峰形变差的情况。峰高和拖尾因子保持一致，无需因样品基质复杂而进行色谱柱清洁。

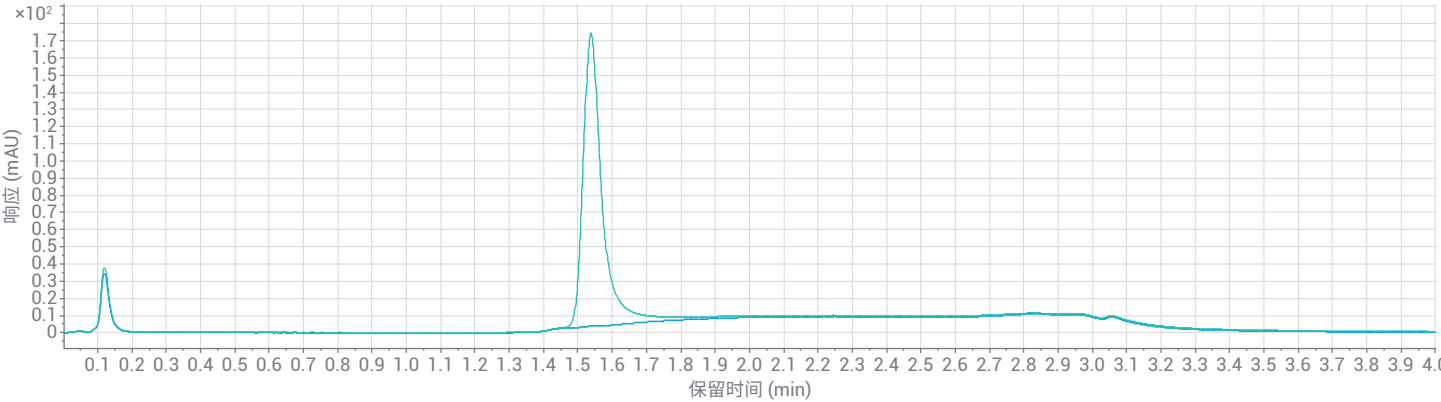


图 3. 首次进样（10 µg 人 IgG）后的首次空白进样（只含上清液）

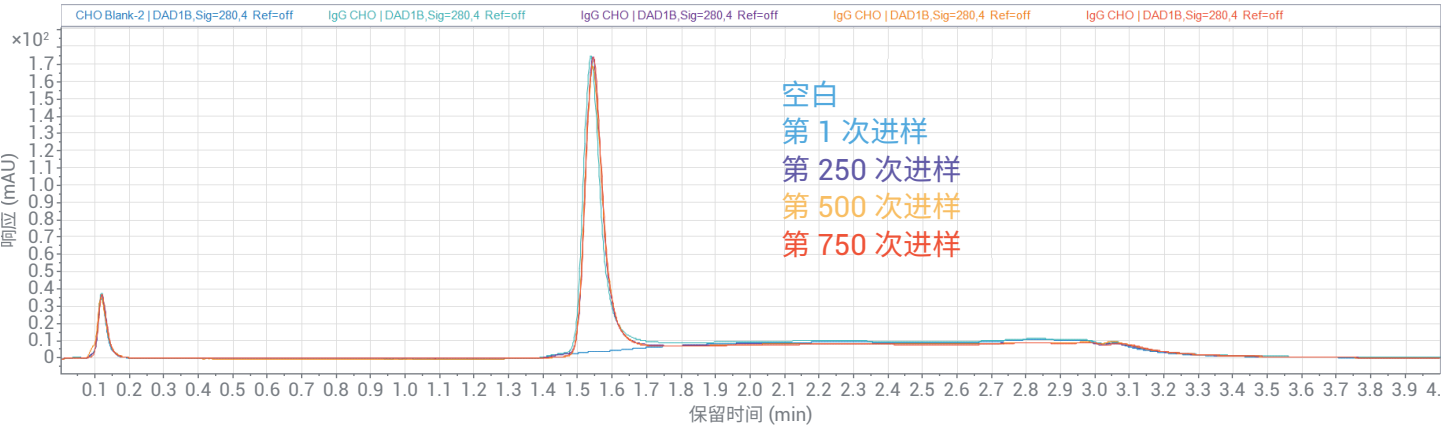


图 4. 第 1、250、500 和 750 次进样的色谱叠加图，仅表现出极小的峰形和峰面积变化

图 5 显示了 50 次加标人 IgG 的细胞培养上清液稀释液进样后的首次空白进样结果。即使经过 50 次进样，IgG 的残留仍然很少，低于 0.2%。这些少量残留在后续的空梯度进样后消失。

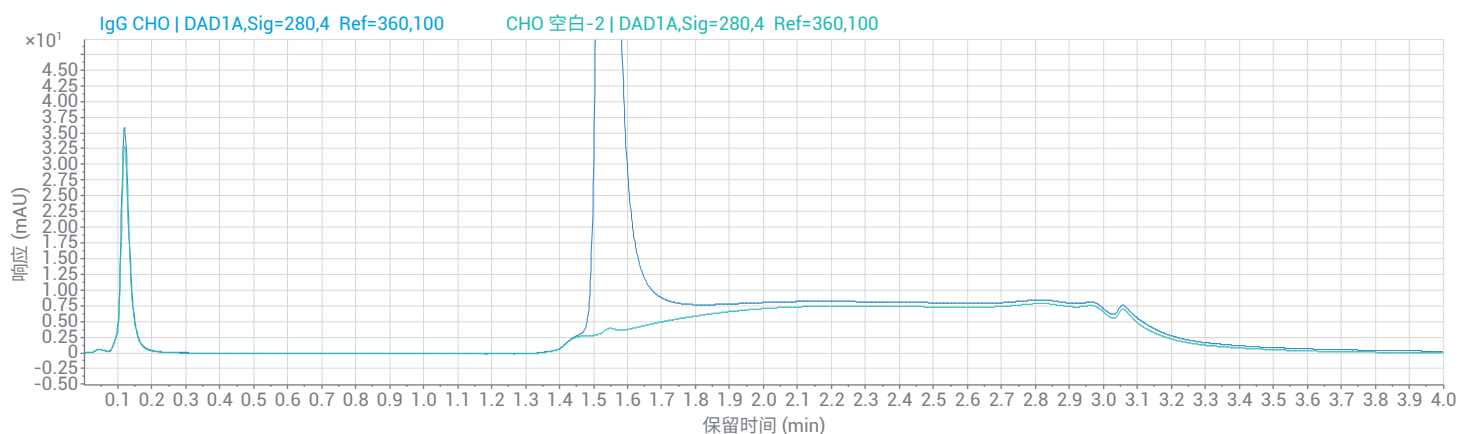


图 5. 第 50 次样品进样及之后的上清液空白进样，显示出极低的残留 (< 0.2%)

结论

Bio-Monolith Protein A 色谱柱经过微小修饰减少了堵塞，极少或没有出现宿主细胞蛋白的非特异性结合。这些色谱柱表现出极小的残留和出色的使用寿命，即使在进样 750 次细胞培养上清液原液后，峰形也几乎没有变差。

这为快速、准确地测定抗体滴度水平提供了出色的工具，适用于一次筛选数百个样品。

参考文献

1. Dumont, E. *et al.* mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column (使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱进行 mAb 滴度分析)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-5135EN，**2017**

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

DE.3805555556

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020
2020 年 6 月 26 日，中国出版
5994-2168ZHCN