

高通量微量色谱简介

白皮书

作者

Scott Fulton
BioSystem Development
美国威斯康星州麦迪逊市

概述

生物制剂对于制药行业的重要性与日俱增，因此对蛋白质分析技术的高精度、高灵敏度和高通量要求也在不断提高。这些技术应用于整个开发过程中，从研发阶段开始，到优化和表征、临床前试验和临床试验（针对生物制剂和相关蛋白质生物标记物），以及生产工艺开发和控制。待分析的复杂样品包括蛋白表达系统的研究样品到生物样品，例如用于制备细胞裂解液的血清以及细胞培养上清液。

以下为蛋白质分析的两个总目标。一个是精确定量样品中的特异性蛋白质。诸如 HPLC 和免疫分析之类的几种技术广泛用于特异性蛋白质的定量。所有这些方法均涉及先使用物理方法、或更常见的亲和方法从复杂样品中选择性分离目标蛋白质，再采用通常基于光学吸收、荧光或化学发光的检测方法进行检测。

蛋白质分析的另一个目标是确定目标蛋白质的特征，例如其整体结构、特异性结构特征以及活性。LC/MS 和 NMR 等多种分析技术用于蛋白质的结构分析，以测定如肽谱或翻译后修饰等特征。无论在哪种情况下，首先必须从复杂样品基质中选择性纯化完整的目标蛋白质。很多结构分析方法还涉及仪器分析前的其他复杂制备方法（如酶处理或酶标记）。



Agilent Technologies

技术要求

过去 50 多年以来，已证实液相色谱是一种用于从复杂样品中纯化蛋白质的高度稳定的通用技术，对于分析和制备均适用。通常有两种色谱方法：主要基于分子大小、电荷以及疏水性的物理模式，以及基于目标蛋白抗体或其他树脂固相配体间选择性结合作用的亲和模式。不管是单独或是结合使用这些方法，都可以从各种样品基质中分离几乎任何蛋白质，并且具有理想的产率。除此之外，还开发了一种已经过验证的固定化酶技术，这种技术以填充床的形式进行操作，在含有蛋白质的基质上驱动特定的化学反应。

要让液相色谱达到高通量分析要求是一项艰巨的任务。为了应对这一挑战，必须达到一系列有关规模、通量、定量结合与洗脱、受控流速、空气夹杂以及微孔板规格的严格技术要求。

规模

生物制药研发中的分析样品通常以低丰度存在于复杂基质中，这类样品较为珍贵，可用于数种不同用途。典型的样品体积为数十至数百微升，目标蛋白质的量为飞克级至微克级。典型的蛋白质色谱系统适用于数量级较大的样品，而 HPLC 系统可适用于上述样品范围，但通常不能回收纯化的目标蛋白质。

通量

根据具体应用情况的不同，蛋白质分析的通量要求变化很大。然而，样品量的持续增大使得对新技术方法的考虑成为整个生物制药行业的共同话题。在许多应用中，常常会需要处理成百上千批次的样品。

传统液相色谱的处理量相对较低，因为系统在连续模式下一次只能运行一个样品。即使是新型的 UHPLC 或增强的质量传递介质，两次进样间仍需运行至少几分钟。较为广泛应用的制备介质或酶反应则需要更长的运行时间。为了满足众多应用所需的通量要求，必然需要进行并行处理。

定量结合与洗脱

如果采用色谱法定量一定浓度范围的样品和基质中的目标蛋白质，关键在于分析目标物的结合与洗脱要近乎完整并具有高度重现性。即使是仅涉及定性结构分析的应用，定量结合与洗脱对于防止不同形式蛋白质之间的结果偏差仍是十分重要的。在很多情况下，如果可以同时实现定量和定性结构分析，便可以节省珍贵的样品。

为了定量回收目标蛋白质，必须达到两个不同的技术要求。一个是完全结合，这要求样品与树脂有足够的接触时间，从而 1) 让目标蛋白质与结合表面接触（质量传递）以及 2) 与表面上的选择性结合基团相互作用（结合动力学）。前者常受限于蛋白质大分子的低扩散速率，而后者也可能会进行缓慢，尤其是对于特定的抗体 / 抗原相互作用。

另一个要求是未结合杂质的高效洗涤以及目标蛋白质的完全洗脱。这些步骤需要足够的传质时间，尽管其要求通常不及对定量结合的要求那样严格。将冲洗或洗脱的“游离”分子从树脂中完全分离是至关重要的。该过程在以批量处理或平衡吸附模式（冲洗液或洗脱液的体积与树脂体积平衡）使用树脂时，很难定量完成。

达到平衡通常需要多个步骤，从而导致相对较大的稀释因子。如果在流通色谱模式下使用填充床，可一步完成定量洗涤和洗脱，仅需五个床体积的洗脱液。

流速控制

获得定量结合与洗脱的关键之一在于精确控制通过色谱柱的流速。动态结合容量（上样过程中大量目标物流过树脂床的阈值）由各种介质特性和停留时间决定（床体积除以流速）。如果要可重现地促进酶反应完成，同样需要精确控制停留时间以及相应的流速。

在考虑到蛋白质分析的规模和通量要求时，要实现必要的流速控制是一大难题。例如，对于常用于蛋白质纯化的琼脂糖树脂，需要约 5 分钟的停留时间才能提供良好的动态结合特性。使用 5 μL 树脂填充床，意味着流速仅为 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。即使是新型“高速”树脂，停留时间也需要 0.5 至 1 分钟，从而确保 5 至 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速。很多微管径 HPLC 系统通过十分精确的控制可轻松达到上述流速，但一次只能运行一个样品。要使整个 96 孔板同时达到上述控制流速是一项严峻的挑战。

空气夹杂

色谱床中气泡的捕集是常规方法的问题之一，但随着操作规模的降低，影响显著放大。对于 5 μL 填充床，看上去极小的 1 μL 气泡都可导致性能或回收率的重大损失。关键是系统是否能在常规操作中使夹杂空气最小化，并且当其存在时对其进行可靠的处理。

规格

SBS/ANSI 微孔板规格已成为处理蛋白质分析样品的标准，很多用户在液体处理、自动化以及专用于处理微孔板的检测系统上进行了大量投资。高通量微量色谱系统应完全符合此标准。但是，由于不同应用中要处理的样品数量差异很大，集 96 柱于一个单元的系统并不太理想。

以前的方法

研究人员曾尝试过很多方法用于蛋白质的高通量微量色谱分析，但是每种方法都具有明显的缺陷。其中一种方法是使用多种方法形成一种在移液头远端具有填充树脂床的色谱柱。有多种含有常用蛋白树脂的移液头色谱柱可供选择，床体积在 5 至 10 μL 的范围内。采用空气排送的方法将液体吸入和排出移液头，以及通过树脂床，这将产生高度可变且极难控制的流速并伴有空气夹杂问题。由于只有单一的入口和出口贯穿填充床，洗涤和洗脱以批量模式操作，为达到平衡需要多个步骤并产生较高的稀释因子。移液头色谱柱可有效用于定性萃取，但从未成功应用于定量色谱分析。

另一个常用方法是使用具有真空歧管的填充床柱，该真空歧管可利用气体压力驱动液体通过填充床。该方法常常成功用于小分子的固相萃取，并且常可提供定量结果。但是，由于蛋白质的扩散速率比小分子低得多，定量结合所需

停留时间也长得多，所以很难或不可能将真空调节至足够低以达到需要的控制流速。此外，在使用高蛋白含量样品时，真空歧管系统常遇到泡沫问题。

离心力是用于驱动液体通过小型多填充床的另一种方法。所谓的“离心柱”广泛用于蛋白质分离，并且具有 50 至 1000 μL 范围的床体积，这个体积对许多蛋白质分析应用来说明显过大。较小的床体积会导致夹杂气体和床干燥等问题。停留时间限值可通过离心柱达到，在某些应用中不同柱之间的流速差异使其难以得到定量结果。

高通量微量色谱平台

Agilent Bravo 蛋白质纯化系统具有 AssayMAP¹ 高通量微量色谱平台，专为满足蛋白质分析中定量样品制备的所有技术要求而设计。AssayMAP 系统包括微量色谱柱、专用的相关实验器皿，以及液体处理装置，该装置可与色谱柱相连接并且可以 96 通道微孔板形式提供精确的流量控制。

微柱

AssayMAP 微柱具有 5 μL 填充树脂床。该树脂床介于装在微柱壳体中的两个支撑型无纺过滤隔片之间。任何粒径为约 20 至 100 μm 的树脂均可用作微柱填料，包括所有常见色谱模式中的聚合物、琼脂糖或硅基材料，以及固定化酶载体。在高度受控的条件下，将树脂填充至树脂床并轻轻地压紧，以确保正反向流的稳定性，并对每个微柱进行压降测试，以确保填充适当。

该树脂床包含于壳体中，该壳体的几何学设计使其可从各种常用样品容器（包括 96 孔板和 384 孔板）中精确地吸取小体积液体并注入树脂床。紧邻上树脂床隔片上方的是一个小型圆锥形入口密封圈，可作为小型 Luer 型接口直接连接树脂床与下文所述的液体处理器。入口密封圈上方是容量为 200 μL 的样品杯。样品杯内部设计有小的肋条，可使微柱与标准实验室移液管匹配并防止形成气密封（因此液体不会因气压而突然流过树脂床，否则会导致夹杂气体）。

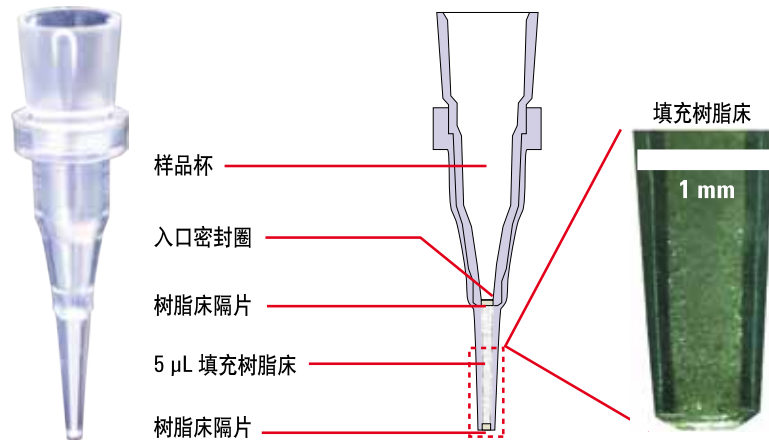


图 1. AssayMAP 微柱

1. AssayMAP 是 BioSystem Development 的美国注册商标。

实验器皿

AssayMAP 微柱提供于特别模制的支架中，该支架拥有 8×12 阵列的 96 个单元，可安装于几乎任何标准 96 孔板上，微柱可精确位于正中并且出口端刚好位于孔入口的下方。微柱松散地固定于支架上，这样液体处理系统便可较为容易地将其取出并且不会干扰支架，无论使用全部或部分微柱。

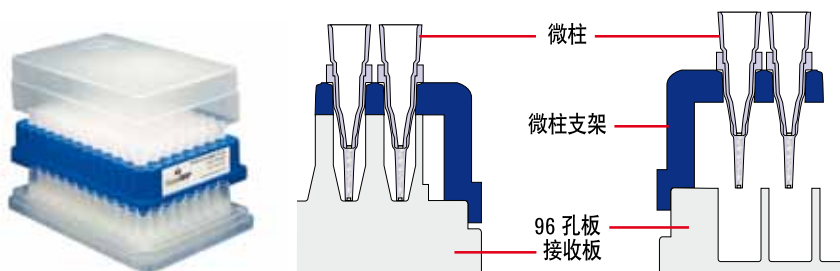


图 2. AssayMAP 实验器皿

与微柱同时提供的还有特别模制的“接收板”，安装于支架下方。微柱悬空于接收板孔中，柱头刚好位于孔底部上方，因此填充床可浸没于孔内的液体中。这样接收板就可以保护微柱，并在运输过程中使微柱保持湿润。在自动化系统的操作过程中，接收板可为支架提供支持以防止其弯曲，从而确保在任何位置都能可靠地取出微柱。

探头注射器和液体处理器

AssayMAP 系统的另一个重要元件是液体处理系统——带有 96AM 移液头的 Agilent Bravo 系统，专为通过微柱的液体提供精确的、主动排送的流速控制而设计。系统的核心是一组注射器，这些注射器都直接与移液探头相连，并包含有特殊设计的柱塞杆。探头尖端被设计为与微柱填充床上方的入口密封圈紧密配合，从而在注射器内部和填充床之间形成直接液体连接。密封锥足够小，以至于即使形成密封仅需一千克左右液体的压力，它也可保持至少 15 bar 的液体压力。

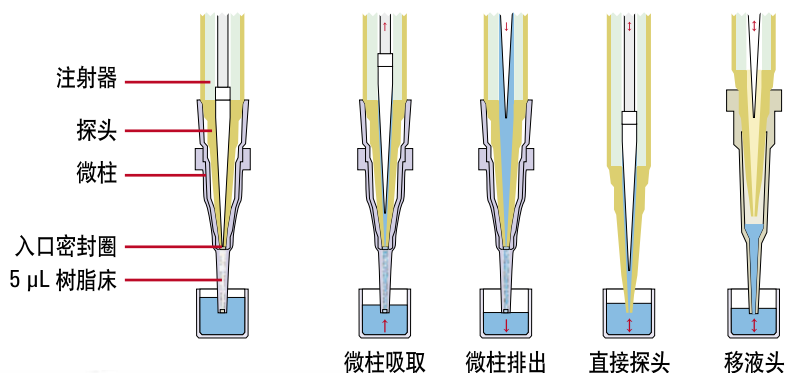


图 3. 用于蛋白质纯化的探头注射器和 Agilent Bravo 系统

注射器柱塞杆也具有与探头内部紧密结合的尖锥形设计。在此设计中，注射器内的死体积超低，可有效排出气泡（气泡可能会导致流量控制不稳定）并实现样品和试剂之间的高效清洗。借助合适的注射器驱动系统，通过微柱的流速可具有较广的范围，从远低于 $1 \mu\text{L}/\text{min}$ 至约 $100 \mu\text{L}/\text{s}$ 。

探头可自行从不同容器中精确吸取和排出液体，因此可通过向上流动或向下流动的方式从填充床中将其泵出或回收。同时还可连接标准移液头，使得同一液体处理系统可进行微柱操作，

也可进行常规液体处理。探头注射器安装在经改进的标准移液头上，因此可平行处理多达 96 个微孔板样品。

操作模式

通过安装于探头注射器上的 AssayMAP 微柱，可使样品、缓冲液和试剂以精确控制的流速通过树脂床（向上吸取或向下排出）。向上吸取具有可通过树脂床依次泵入一系列不同液体的优势，且避免了更换液体时断开微柱连接和洗涤注射器的麻烦，这样可以使方案变得十分高效快速。向下排出常用于将洗脱液回收至微板孔中的步骤，并且也可用于向树脂床施加高压（例如，在处理高粘性或含颗粒的样品时）。样品还可快速循环吸取和排出，从而在整个树脂床上均匀分布结合物，非常适用于固定化或包被步骤。

软件

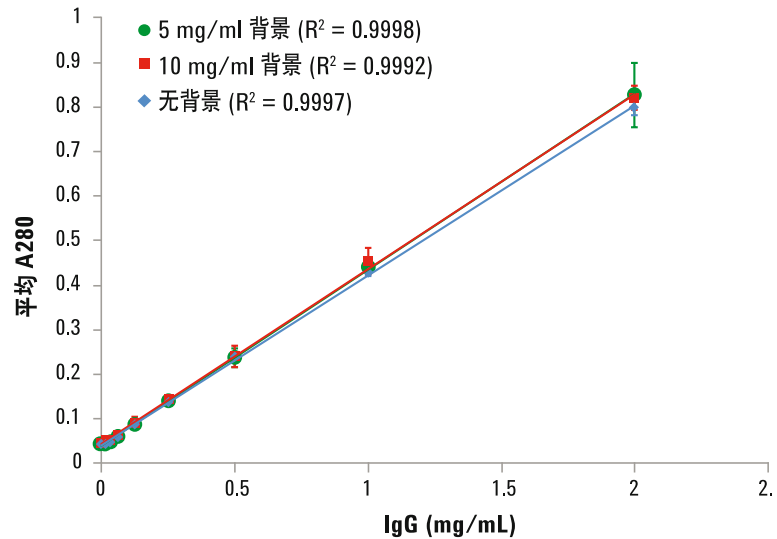
Agilent VWorks 自动化控制软件操作简便，可精确控制液体处理操作，从而快速配置 AssayMAP 相关应用。用户可利用预配置的表格、方案和宏，无需定制便可运行默认应用，同时还可编辑液体处理和流速参数，对特定分析物分离方法进行优化。拖放宏图标即可实现基本的平衡、洗脱、灌注以及洗涤步骤，还可对特定的 96AM 工作进行编辑。在 96AM 吸取和排出工作中可以调节流速，为实际色谱分离提供精度控制。

应用

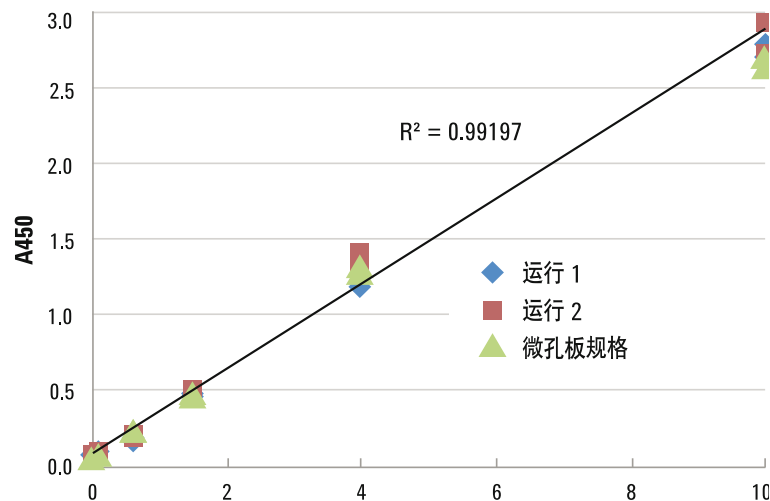
通常，高通量微量色谱的蛋白质分析应用主要涉及纯化、定量和反应。纯化的目的是将样品中的目标蛋白质与所有或大部分杂质分离，分离出的目标物用于进一步操作。定量的目的是

测定样品中目标蛋白质的含量。反应的目的是通过酶或其他反应物对目标蛋白质进行化学修饰。样品制备方案可能涉及这些步骤的全部或部分。以下为应用实例。

图 4. 应用实例



含有人 IgG 的样品在 AssayMAP 蛋白质 A 微柱上纯化，洗脱至微孔板中并使用 A280nm 定量。显示了使用不同样品体积的结果。定量结合容量 >100 µg hIgG



使用商购微孔板 ELISA 试剂盒中的试剂，在 AssayMAP ELISA 微柱上定量含蛋白质 A 的样品，采用标准读数板读取。结果与标准微孔板规格基本相同，但运行时间 <30 分钟

亲和纯化与定量

最基本的应用或许是在微柱中使用树脂固定化的亲和配体选择性结合目标蛋白质。在洗掉未结合的杂质后，纯化的目标蛋白质被洗脱并于微板孔中回收。亲和配体可包括蛋白质配体（如针对目标抗体的蛋白质 A）、抗体和抗原、细胞表面受体或合成化学配体（如在固定化金属亲和色谱中用于针对目标蛋白质的配体，其中目标蛋白质带有组氨酸标签）。使用疏水性吸附或如生物素 / 链霉亲和素结合等方法，可在填充或原位固定配体前将其固定在树脂上。另外，可使用非亲和树脂，包括离子交换树脂、疏水作用树脂、反相树脂以及其他树脂。

在标准读数板上使用 280 nm 下的紫外吸光法或蛋白检测试剂（如考马斯亮蓝），可精确定量微板孔中从填充床微柱回收的目标蛋白质。由于微柱本身可定量结合与洗脱，所以通过这个方法可精确定量原始样品中的目标蛋白质。该方法的灵敏度范围和分析精度通常与蛋白质 HPLC 相似，但因其可同时运行多个样品，所以通量非常高。

除定量外，回收的目标蛋白质可以纯化形式用于其他分析方法。对于具有 5 μL 填充床的微柱，单个样品中回收的量通常可以在 1 至 100 μg 的范围内，足以应对很多分析应用。

免疫分析

AssayMAP 微柱还可用于执行多种不同类型的免疫分析，包括 ELISA。针对这些应用，微柱被填充以具有疏水表面的大颗粒、非多孔微球。表面的化学性质和微柱内的总面积均与很多免疫分析程序中用作固相的标准微板孔相似。然而，鉴于填充床的规格，样品中分子的扩散路径要短得多，更容易与固相表面的结合配体接触 — 相对于微板孔的毫米级大小，微球之间只有微米级间隙。最终，结合反应可以更快完成，无需耗时较长的孵育步骤。标准的夹心 ELISA 可在 30 分钟内完成（从包被到读数），而标准微孔板法则需要 4 至 24 小时，前者使用与基于板的方法相同的试剂、缓冲液和标准品。

在 AssayMAP 系统上进行的免疫分析从包被步骤开始，该步骤通常仅需几分钟；无需对微柱进行预包装和后续存储。封闭后，以足够低的流速加载样品，保证完全结合（通常为约 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ）。为得到最大灵敏度，用标记偶联抗体预孵育样品通常较为有利，但在其他情况下，偶联抗体是在样品之后加载到微柱中。经过洗涤（由于填充床形式的使用，此过程快速高效）后，注射器中充满了酶底物溶液（通过微柱注入），微孔板将收集最终产物，以便在标准读数板上进行读数。因为产物量（以及由此产生的信号）与填充床中底物溶液停留时间成反比，通过 Agilent Bravo 96AM 对流速进行精确控制是该步骤的关键。

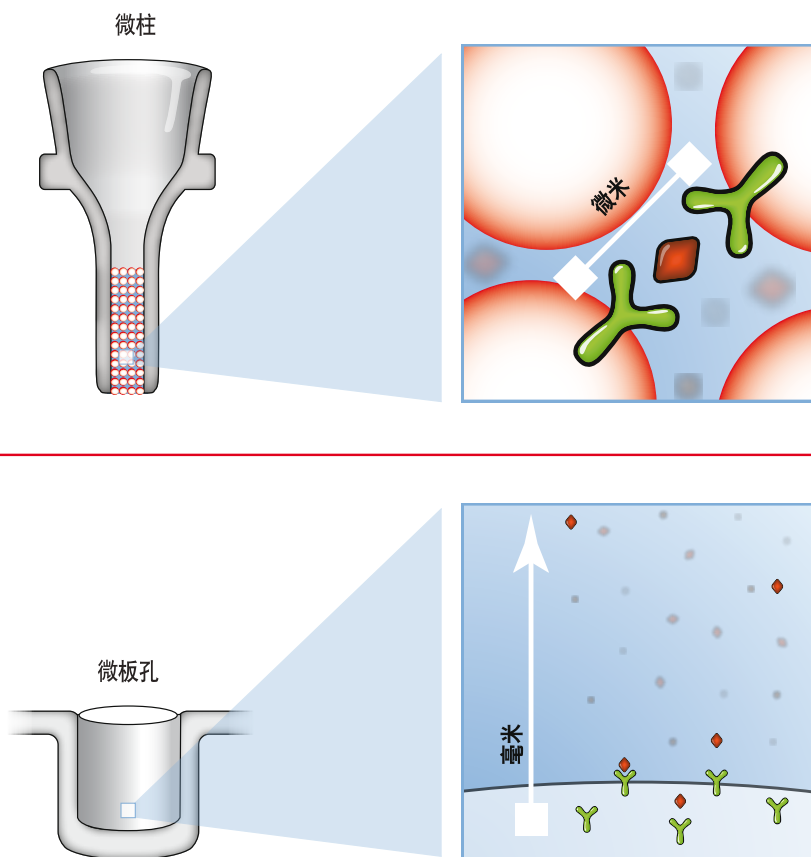


图 5. 在微柱分析和基于板的分析中扩散路径的比较

多糖分析

多糖分析是制备样品后进行的一种较为复杂的蛋白质结构分析。生物制剂蛋白质中发现的糖谱可能非常复杂，并在表达细胞培养条件下通过一种尚不清楚的方式受到控制，但可显著影响药物的安全性、有效性和功效。对多糖分析的需求正在迅速增多，但糖谱分析的样品制备通常是一种长期的、手动的、劳动量大的方法。通常一次只能处理数十种样品，并且从开始到结束，整个过程可能需要 3 天。

高通量微量色谱可用于大幅提高此工作的速度并实现自动化。首先，使用上述亲和纯化方法从复杂样品中纯化目标糖蛋白，然后将其固定于微柱中的树脂上。然后让糖蛋白与酶（例如可以选择性裂解多糖基团的 PNGase F）接触。释放的多糖从微柱中洗脱并收集于孔中，然后与荧光标记反应以用于灵敏的分析。在某些方法中，标记多糖将结合于纯化柱中，冲洗过量的标记物，纯化的标记糖蛋白被洗脱，用于 HPLC、LC/MS 或毛细管电泳分析。

总结

生物制药行业对蛋白质分析的要求与日俱增。色谱法是久经考验的高效通用方法，可用于蛋白质样品的纯化、定量和反应，但是要满足规模、通量、定量结合与洗脱以及其他技术问题仍非易事。AssayMAP 高通量微量色谱方法和蛋白质纯化的 Agilent Bravo 系统相结合是一种多功能的工作流程解决方案，可满足生物制剂发现和开发的日益增长的需求。

作者简介

Scott Fulton 是 BioSystem Development 的创始人兼 CEO，在生命科学与生物制药领域有着超过 30 年的丰富经验。他拥有麻省理工学院物理及应用生物学的理学学士学位，以及麻省理工学院生物医学工程的理学硕士学位。他一直在 Amicon 和 PerSeptive Biosystems 负责超过 15 条分离介质、仪器和工艺系统产品线的开发、市场、技术和销售支持。他曾是 SolmeteX（一个研发先进污水处理系统的新兴公司）的首席技术官。后来他成为 Genzyme Transgenics（现在的 GTC Biotherapeutics）项目管理部的副主管，与各大生物技术和制药公司开展项目，开发生产转基因乳畜原奶中的重组蛋白。在创建 BioSystem Development 之前，他作为独立顾问工作在生物制药研发和生命科学工具领域。

BioSystem Development 成立于 2002 年，致力于创造、生产和推广各类工具和产品，以满足生物制药研发和生命科学研究不断增长的重要分析需求。公司专利的 AssayMAP 平台基于一次性微量色谱柱和自动化操作，是生物工艺开发、生物标记物和常规生命科学的高通量解决方案，缩短了研发时间并提高了效率。有关 AssayMAP 技术的更多信息，请访问 www.AssayMAP.com。



www.agilent.com/lifesciences/automation:cn

本文仅限研究使用，不可用于诊断目的。本文中的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

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

安捷伦客户服务中心免费专线：
800-820-3278
400-820-3278（手机拨打）

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
2011 年 1 月 21 日，中国印刷
5990-7195CHCN



Agilent Technologies