

在 OT-2 上使用 Biotage 双流色谱 PhyTip 柱进行自动化蛋白质纯化



作者:

Boren Lin, PhD,¹ Shadie Nimri,² Sean Arabian,² Kinnari Watson, PhD¹

¹Opentrons Labworks, Inc., ²Biotage LLC.

摘要

本次应用针对使用 Biotage® PhyTip® 柱在 Opentrons OT-2 自动化移液工作站上进行双流层析的自动化进行了应用开发。测试了两种类型的 PhyTip 柱: 用于 His 标记蛋白提取的 Ni-IMAC 柱和用于人源 IgG 纯化的蛋白 A 系列柱, 包括蛋白 A、ProPlus 和 ProPlus LX。结果表明, OT-2 和 PhyTip 柱结合使用 96 孔板进行小规模蛋白样品处理, 可获得优异的产品产量、浓度。

关键发现

- 在使用 PhyTip Ni-IMAC 柱进行纯化时, OT-2 能够在保持活性的同时对 His 标记的 GAPDH 蛋白进行纯化。同时, 在使用蛋白 A、ProPlus 和 ProPlus LX PhyTip 柱进行人源 IgG 纯化时, OT-2 也展现了出色的纯化能力。
- 使用蛋白 A、ProPlus 和 ProPlus LX PhyTip 柱, 可以在 OT-2 上全自动运行多步骤纯化, 例如免疫沉淀。
- 蛋白质分析验证了提取蛋白为目标蛋白, 成品是符合预期的。
- 在实验设置中, 该应用协议可以处理最多 96 个样品, 且仅需占用很少的人工操作时间。

简介

近年来, 由于蛋白质表征分析和功能测定的发展迅速, 行业对蛋白质分析的需求与日俱增。因此, 许多可用于通过亲和层析扩大蛋白质分离通量的技术应运而生, 而亲和层析已成为早期药物发现中的重要工具。然而, 市面上适用于小规模蛋白纯化的设备却很少。

并且由于研究人员缺乏编程和自动化专业知识, 可能会导致在建立这些流程时产生很多不必要的开销, 在优化工作流程时, 会带来额外的成本负担。

PhyTip 柱是基于移液器吸头进行工作的色谱柱, 通过移动相(例如样品溶液)在固定相(即填充在尖端中的树脂)上的双向流动来将目标生物分子与非目标分子分离, 这个过程被称为双流层析。纯化后的样品可以以小体积洗脱, 从而得到高浓度的样品。双流层析是一种温和的纯化过程, 产生具有高生物活性的蛋白质。这些 PhyTip 柱利用了蛋白 A 进行抗体的纯化或富集。蛋白 A 是一种分子量为 49 kDa 的蛋白, 对大多数 IgG 的 Fc 区域具有较高的亲和力。

ProPlus (MabSelect™ SuRe™, Cytiva) 和 ProPlus LX (MabSelect SuRe, Cytiva) 是使用经过改良的蛋白 A 制备吸头。蛋白 A 具有更强的结合目标 IgG 的能力, 通常被用于抗体的纯化和富集。

金属亲和层析 (IMAC) 是另一种常见的方法, 用于从粗样品中纯化或富集目标蛋白。这种方法利用金属离子提取具有基因工程标签的重组蛋白, 它们通常是能够螯合金属离子的肽序列。PhyTip 柱与镍离子 (Ni) -IMAC 亲和树脂结合, 通过 Ni²⁺ 和组氨酸碱基之间的强亲和力, 高效纯化多组氨酸 (His) 标记的蛋白。

OT-2 是一个对生物学家非常友好的自动化平台。PhyTip 柱使用与 OT-2 的单通道和 8 通道移液器兼容的吸头, 从而实现了在 OT-2 上执行全自动蛋白纯化。本次研究对 PhyTip 柱在 OT-2 上的性能表现进行评估, 并展示了该平台可适配多种应用的能力。

通过 PhyTip 柱与 OT-2 平台结合使用，研究人员能够实现自动化运行蛋白质纯化，提高操作的便捷性和一致性。这为各种不同的应用提供了更适用的解决方案，并为高通量的纯化和富集提供了支持。

材料和方法

在 Opentrons OT-2 平台上使用 PhyTip 色谱柱进行蛋白质纯化工作流程概述

该过程的第一部分是“试剂孔板准备”，用于准备 PhyTip 柱架和试剂孔板。其中包括平衡缓冲液孔板、两个用于不同洗涤缓冲液的孔板以及一个洗脱缓冲液孔板。该过程的第二部分是“蛋白质纯化”，通过使用 PhyTip 柱进行双流层析来捕获和富集目标蛋白质。这是通过使样品或缓冲液通过柱体内部的树脂（即上下移液）而实现的。设置环节包括循环次数、流速和缓冲液体积，这些设置根据具体应用进行调整（表1）。

试剂孔板制备和蛋白质纯化方案的 OT-2 平台布局示意图（图 1）

在这项研究中测试的 PhyTip 柱型号包括：

- Pro A 20 μ L PTX-93-20-01
- ProPlus 20 μ L PTX-93-20-07
- ProPlus LX 20 μ L PTX-93-20-26
- Ni-IMAC 20 μ L PTX-93-20-03

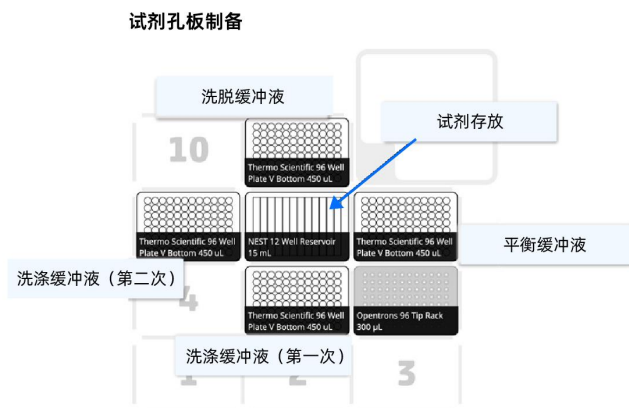


图 1. OT-2 甲板布局示意图

表1: PhyTip 柱在 Opentrons OT-2 上测试的设置和运行时间

NI-IMAC			
过程	循环次数	流量 (μ L/min)	量程 (μ L)
平衡化	4	240	200
目标捕获	8	240	200
第一次清洗	2	240	200
第二次清洗	2	240	200
洗脱	4	240	60

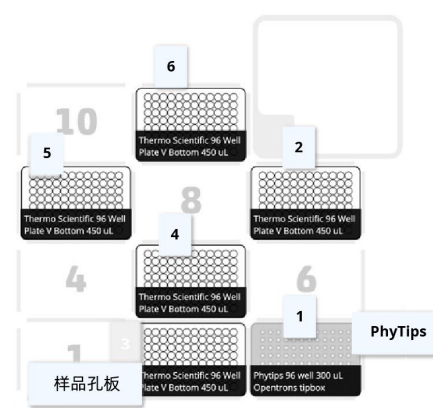
预计运行时间, 8 个样本 (分钟) = 30.4
 预计运行时间, 96 个样本 (小时) = 6.1

蛋白 A 系列			
过程	循环次数	流量 (μ L/min)	量程 (μ L)
平衡化	4	240	200
目标捕获	8	240	200
第一次清洗	2	480	200
第二次清洗	2	480	200
洗脱	4	240	80

预计运行时间, 8 个样本 (分钟) = 27.9
 预计运行时间, 96 个样本 (小时) = 5.6

蛋白质纯化流程

1. 取出 PhyTip 柱
2. 平衡化
3. 捕获目标蛋白质
4. 洗涤 (第一次)
5. 洗涤 (第二次)
6. 洗脱



实验结果

分离 His 标记的 GAPDH，同时保留活性

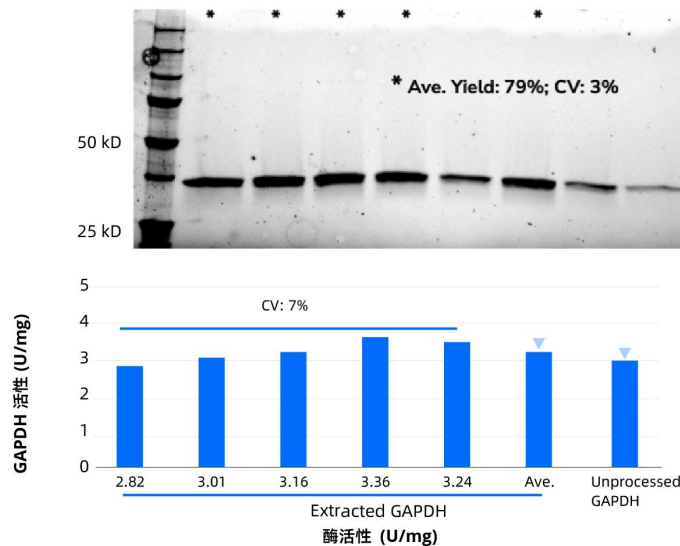
通过 SDS-PAGE 和蛋白定量分析，我们得出了在 PBS 中提取的带有 His 标签的 GAPDH 样品具有理想产量和一致性的结论（平均产量为79%，变异系数为3%）（图2上部）。

OT-2 平台上使用 PhyTip 柱没有破坏酶活性，这是通过 GAPDH 活性测定得出的结果（图2中部）。此外，结果还表明，在两种不同蛋白质的样品中均能够成功地将 His 标记的 GAPDH 与非目标蛋白的BSA分离开来（图2下部）。

从细菌裂解液中分离 His 标记的 GAPDH

生产重组蛋白的常见方法是用质粒转化大肠杆菌

HIS-标记 GAPDH								
Crude (µg)	15.00	15.00	15.00	15.00	Positive Control	15.00	7.50	3.75
Eluted (µg)	11.79	11.91	11.44	12.28		11.95	5.43	2.76
Yield	79%	79%	76%	82%		80%	72%	74%



	NI-IMAC				INPUT
His-标记 GAPDH (10 µg)	+	+	+	-	+
BSA (50 µg)	+	+	+	+	+

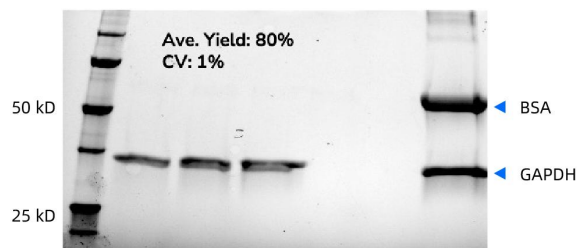


图2：显示了通过 OT-2 上的 PhyTip Ni-IMAC 进行的 His 标记 GAPDH 的提取结果。His 标记的 GAPDH 提取通过 PhyTip Ni-IMAC 展示了一致高产量（上图）。使用 GAPDH 酶活性测定（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）确认提取得到的 GAPDH 具有生物活性（中图）。His 标记的 GAPDH 成功地与 BSA 分离开来（下图）。

为了从大量细菌培养物中提取目标蛋白（即 His 标记的 GAPDH），使用 PhyTip 柱在 OT-2 平台上进行蛋白质提取步骤。首先需要制备表达 His 标记的 GAPDH 的细菌的细胞裂解液，并按照之前描述的方法进行蛋白质纯化，成功地将 GAPDH 从细菌裂解液复杂混合物中分离出来。为了增加目标蛋白与背景非特异性蛋白质之间的分辨率，在洗涤缓冲液中测试了一系列 imidazole 浓度梯度（图3上部）。

蛋白 A IgG 分离

测试与蛋白 A 相关的 PhyTip 柱，包括蛋白 A、ProPlus 和 ProPlus LX，在 OT-2 上处理含有人类 IgG 类型抗体的样品，结果确认了 PhyTip 柱在捕获和富集人类 IgG 方面的能力，并且具有高产量。

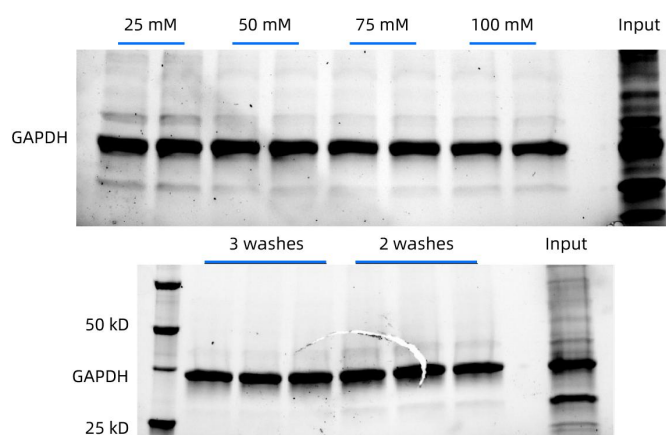


图3：从细菌细胞中纯化目标蛋白。

利用不同浓度的 imidazole 洗涤缓冲液（上部）或 2 个或 3 个洗涤步骤（下部），成功对细菌细胞产生的带有 His 标记的 GAPDH 进行了蛋白质纯化。

在样品中存在 BSA 的情况下，OT-2 的样品处理的质量在不同样品之间保持一致，符合预期（图4上部 and 下部）。

在 CHO 瞬时转染系统环境中的IgG纯化

中国仓鼠卵巢（CHO）细胞是重组抗体生产的首选表达系统。将 IgG 溶解在 CHO 培养基中，并使用 PhyTip 柱成功地从该表达系统中提取 IgG（图5上部）。尽管许多最近的应用已经采用了无血清 CHO 培养基中悬浮细胞的生长，但传统上，动物血清对于调节和支持哺乳动物细胞生长至关重要。

然而，血清在抗体纯化中比较困难，因为它增加了白蛋白和其他动物蛋白污染的风险。当分离 CHO 培养基中带有或不带有胎牛血清的 IgG 时，PhyTip 柱在纯度上表现均一（图5）。

蛋白 A 免疫沉淀

使用抗-GAPDH 抗体进行免疫沉淀测试了所有三种蛋白 A PhyTip 柱。Western印迹分析的结果显示，哺乳动物细胞裂解液中的内源性 GAPDH 可以被抗体识别，并被柱中的树脂捕获（图6）。这再次确认了在 OT-2 上使用 PhyTip 柱进行纯化过程中，蛋白质的功能（即抗体与其靶标的结合活性）在这种情况下没有受到影响。

	PROTEIN A			PRO PLUS			PRO PLUS LX		
Yield	61%	66%	69%	67%	68%	71%	68%	80%	82%
Ave. yield	65%			69%			77%		
CV	6%			3%			10%		



		Eluates			Input			Eluates			Input			Eluates			Input
hIgG (33 µg)	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
BSA (417 µg)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

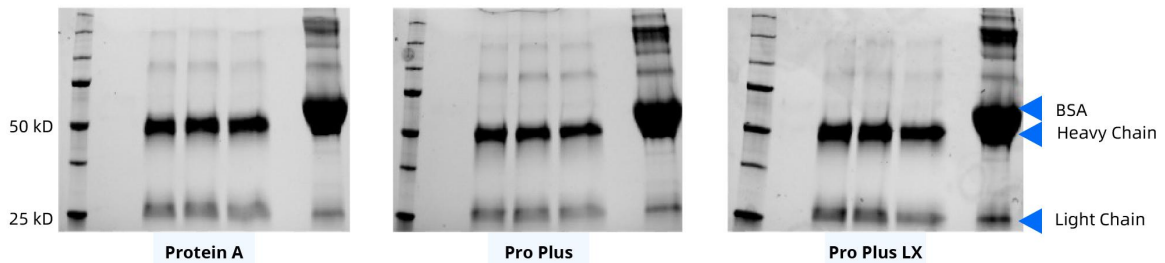


图4. 当在 OT-2 上运行时，PhyTip 柱捕获并富集人源 IgG，且产量高且一致。

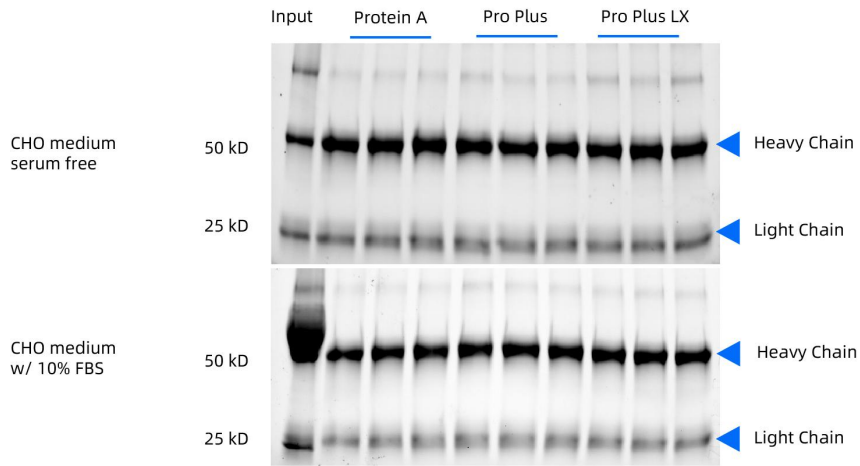


图5. 使用PhyTip柱从中国仓鼠卵巢（CHO）细胞培养物中提取人源IgG。使用 PhyTip Protein A、ProPlus 和 ProPlus LX 从 CHO 培养基制备的人源 IgG（上部）或 CHO 培养基中添加了 10% 胎牛血清（下部）的被提取人源 IgG。

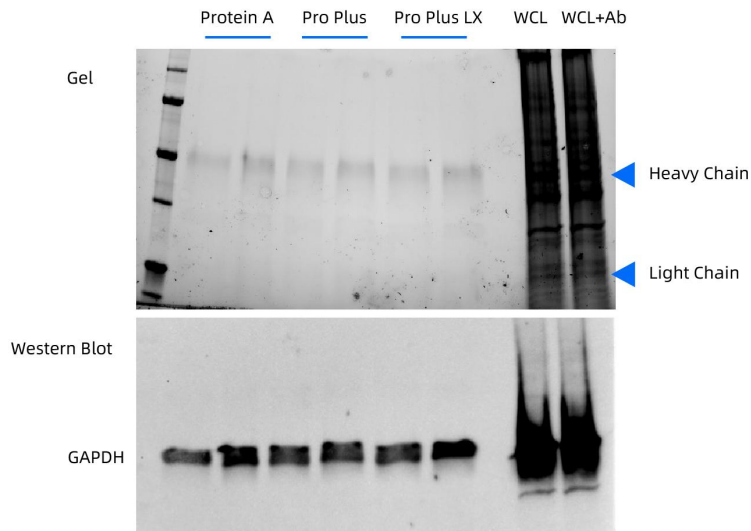


图6. 在 OT-2 上使用 PhyTip 柱进行内源性 GAPDH 的免疫沉淀。使用 GAPDH 抗体通过 PhyTip Protein A、ProPlus 和 ProPlus LX 免疫沉淀了内源性GAPDH

总结

我们的研究表明，OT-2能够与Biotage双流层析技术相结合，实现全自动蛋白质纯化，在96孔板设置下处理中到高通量的样品，并具有良好的重复性。