

# 慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 110 期

Discovery 整合化层析应用案例分享



2018年8月

## 第 110 期 Discovery 整合化层析应用案例分享

很多药企做细胞株筛选，或者抗体糖型的培养工艺调节，摇瓶培养的数量都是非常大的，需要进行一系列的平行实验、对比实验，等到样品收获时，给下游纯化人员所造成的纯化压力也是巨大的。经常听到有人抱怨：领导一直催着完成纯化，需要送检看结果，可是再催，纯化步骤也还得一步一步来，那么多样品，怎么可能在短时间内完成所有纯化？



其实，一些先进的设备生产企业意识到了这一点，而且已经研发出整合化层析技术来应对这一难题。整合化层析，即将多步层析整合为一步，从而缩短纯化时间，提高纯化效率，这种技术是否真能起到作用呢？今天，小编就与各位分享一下该技术的应用案例，跟大家一探究竟。

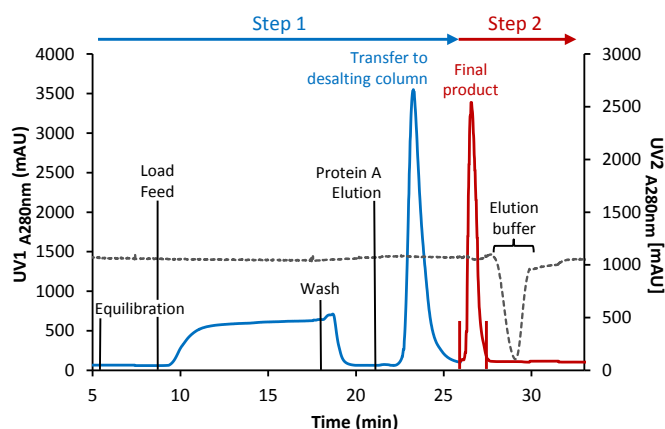
### 1) Protein A – Desalting ...

第一步：Protein A，1 mL 预装柱

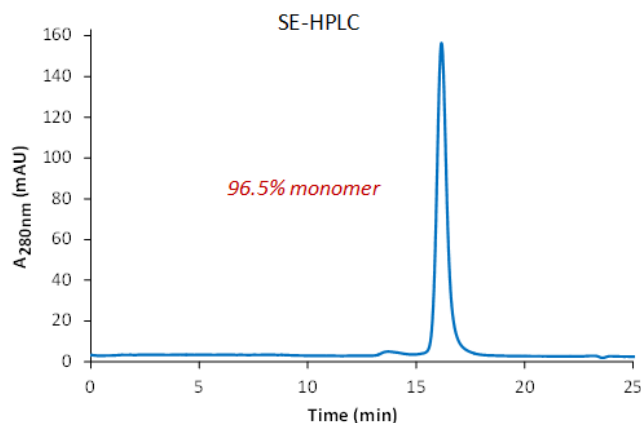
第二步：Desalting（分子筛脱盐换液），10 mL 预装柱

方法信息	
纯化步骤	Protein A - Desalting
第一步 - Protein A	
Buffer A - 平衡液	25 mM PB, 150mM NaCl, pH 7.4
Buffer B - 洗脱液	100mM citrate, pH 3.5
Buffer C - NaOH	0.1 M NaOH
样品上清液	10 mL CHO 单抗上清液，浓度 1.0 mg/mL
第二步 - Desalting	
Buffer D - 平衡液	25 mM PB, pH 7.4

层析过程图谱：



在该过程中，Protein A 的洗脱组分不经过收集，而是在系统内直接上样至脱盐柱，两步层析整合为一步，从而提高了纯化效率。



最终产品经 SE-HPLC 检测，单体纯度为 96.5%，可直接用于其它常规检测。

结果汇总	
产品浓度	3.7 mg/mL
产量	9.92 mg
单体含量	96.5%
聚集体含量	3.2%

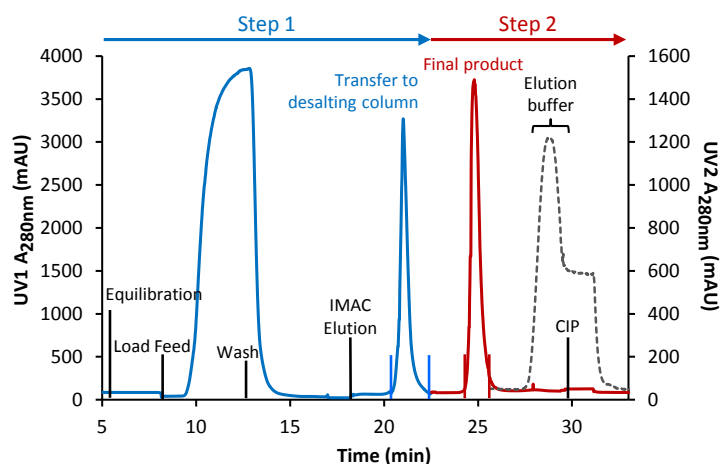
## 2) IMAC – Desalting...

第一步：IMAC，1 mL 预装柱 Chelate (Cu<sup>2+</sup>)

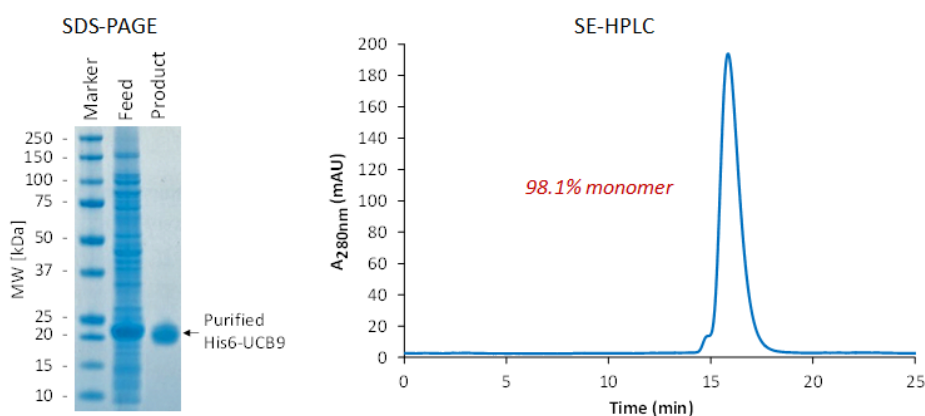
第二步：Desalting（分子筛脱盐换液），10 mL 预装柱

层析过程图谱：

方法信息	
纯化步骤	IMAC - Desalting
第一步 – IMAC	
Buffer A – 平衡液	25 mM PB, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.5
Buffer B – 洗脱液	25 mM PB, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole, pH 7.5
Buffer C – NaOH	0.1 M NaOH
样品上清液	5 mL E. coli BL21(DE3)细胞裂解液, 过量表达 20 kDa His6-UCB9 (浓度 0.5 mg/mL)
第二步 – Desalting	
Buffer D – 平衡液	1x PBS, pH 7.4



在该过程中，IMAC 的洗脱组分同样直接上样至脱盐柱，节省了纯化时间。



最终产品经 SDS-PAGE 及 SE-HPLC 检测，单体纯度为 98.1%，可直接用于其它常规检测。

结果汇总	
产品浓度	1.1 mg/mL
产量	2.3 mg
单体含量	98.1%
聚集体含量	1.9%

### 3) Protein A - CIEX – Desalting...

第一步：Protein A, 1 mL 预装柱

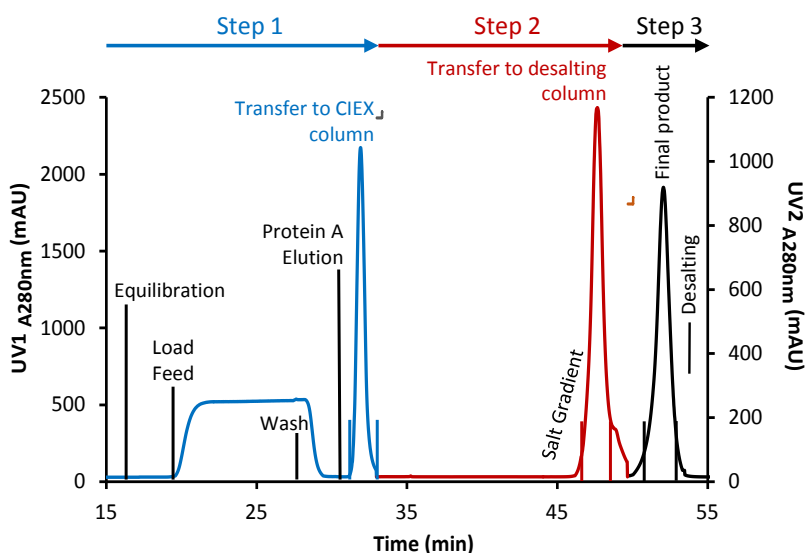
第二步：CIEX, 5 mL 预装柱 (SP)

第三步：Desalting (分子筛脱盐换液), 10 mL 预装柱

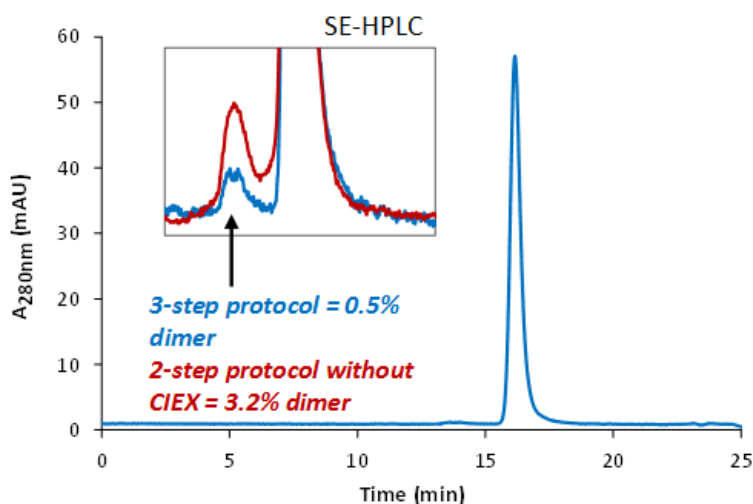
方法信息	
纯化步骤	Protein A - CIEX - Desalting
第一步 – Protein A	
Buffer A – 平衡液	25 mM PB, 150mM NaCl, pH 7.0
Buffer B – 洗脱液	100mM citrate, pH 3.5
Buffer C – NaOH	0.1 M NaOH
样品上清液	10 mL CHO 单抗上清液, 浓度 1.0 mg/mL

第二步 - CIEX	
Buffer D- 平衡液	25 mM PB, pH 6.0
Buffer E - 洗脱液	25 mM PB, 0.5 M NaCl, pH 6.0
Buffer C - NaOH	0.1 M NaOH
第三步 - Desalting	
Buffer F - 平衡液	25 mM PB, pH 7.0

层析过程图谱:



在该过程中，Protein A 的洗脱组分经过在线稀释，直接上样至 CIEX 层析柱，CIEX 进行线性洗脱，去除降解物及聚集体，将目标组分直接上样至脱盐柱。三步层析紧密衔接，前一步层析的洗脱与后一步层析的上样同时进行，使得纯化效率显著提高。



最终产品经 SE-HPLC 检测，纯度高达 99.5%，二聚体含量仅为 0.5%，比 Protein A - Desalting 两步层析所得产品的二聚体含量降低近 6 倍，该产品可直接用于氨基酸序列测定、二硫键测定以及糖型分析等高纯度要求的检测。

结果汇总	
产品浓度	0.91 mg/mL
产量	6.7 mg
单体含量	99.5%
聚集体含量	0.5%

#### 4) 高通量 (HT) 纯化应用

Richard Weldon 等工程师将 Discovery 系统额外扩展出 35 个入口用于上样，即实现整合化层析的高通量纯化应用。通过 Discovery Wizard，可将每个入口的上样体积、流速等信息预先设定，即可实现高通量自动化操作。

Richard Weldon 等工程师采用 Protein A - CIEX - Desalting 向导模块，每次上样 10 mL 单抗上清液 (1.0 mg/mL)，每次产量均  $\geq 6.5$  mg。单个样品的纯化耗时约为 74 min，在 24 h 内纯化出多达 19 个样品！而且该时间包含了层析柱的清洗环节。该系统持续运行 5 天，纯化样品总数量高达 91 个。

	Activity	Number of purified mAbs	System run time
Working day	3-step purifications incl. overnight purifications incl. column washes	19	24 h
Working week (Monday-Friday)		91	112 h



北京慧德易科技有限责任公司

咨询电话：010-59812370/1/2/3

公司官网：www.prep-hplc.com

邮 箱：sales@prep-hplc.com

微信公众号：北京慧德易