

APPLICATION NOTE

细胞系开发过程中 IgG 检测流程的简化

Yen-Wen Chen, PhD | Senior Scientist | Molecular Devices
 Steve Wiltgen, PhD | Product Manager | Molecular Devices
 Carolanne Doherty, PhD | Valitacell

简介

在不同的研究人员中，以抗体为基础的治疗药物的细胞系开发过程可能有很大不同。最终目标是找到可以稳定产生大量单克隆抗体的细胞克隆。

IgG 产物检测在开发和生产单克隆抗体的多个阶段都是非常重要的一步 (图 1)。通常 IgG 定量的方法都需要专门的仪器和技术人员，例如 HPLC 和表面干涉测量，或是要花费大量时间的 ELISA 检测 (酶联免疫吸附实验)。尽管 ELISA 是蛋白定量的成熟方法，但它也是一种冗长的、多个步骤的实验过程 (表 1)。这里，我们向大家介绍使用 Valitacell 公司的 Valita®TITER 实验来检测抗体开发和生产过程中 IgG 的方法。

ValitaTITER 实验使用简单 “add-and-read” (添加和读数) 方式测定 2.5 – 100 mg/L 浓度的 IgG。此实验过程不到 1 小时即可完成且能够整合到以 96 孔板为规格的生物反应工作流程中。此实验可实现高通量和全自动。其过程可在细胞培养基中用少量样品进行，没有复杂的准备步骤。

可用于实验检测的 Molecular Devices 公司多功能微孔读板机有：SpectraMax® iD5 多功能微孔读板机、带荧光偏振检测卡盒的 SpectraMax® i3x 多功能微孔读板机和 SpectraMax® M5 多功能微孔读板机。

优点

- 轻松采集数据并利用 SoftMax Pro 软件的预设模板分析数据
- 快速、均相实验，不超过 1 小时即可获得结果
- 2.5-100 mg/L IgG 浓度范围的精确测定



图 1 从细胞转染到扩大生产的细胞系开发过程

	ValitaTITER	表面干涉测量	ELISA	HPLC
总实验时间 (96 个样品)	45 min	55–65 min	6+ hours	25–45 hours
测定范围 (mg/L)	2.5–100	0.025–2000	0.5–5	> 10
样品体积	5 µL–30 µL	180 µL +	100 µL	1–2 mL
精确度	< 2%	< 5%	< 5–10%	< 2%

表 1 比较 ValitaTITER 实验与其他方法在 IgG 定量检测方面的性能表现

实验原理

ValitaTITER 实验基于对 IgG Fc 片段与蛋白 G 的相互作用采用荧光偏振 (FP) 技术检测。96 孔微滴度板的每个孔中都包被有荧光标记的 IgG 结合多肽, 蛋白 G。当加入样品到孔板中时, 蛋白 G 分子被重悬并发生结合。一旦结合抗体, 蛋白 G 分子的运动速率便会下降, 导致荧光偏振 (FP) 值的增加 (图 2)。

材料

- ValitaTITER 检测试剂盒 (Valitacell cat. #00010)
- IgG 蛋白标准品 (Sigma cat. #I2511)
- CD CHO 培养基 (Thermo Fisher Scientific cat. #10743011)
- 实验过程中的样品: 悬液培养产生 CHO 细胞系的重组 IgG 培养上清液
- 安装有 535-nm FP 发射滤片的 SpectraMax iD5 多功能微孔读板机
- 带有荧光偏振 (FP-FLUO) 检测卡盒的 SpectraMax i3x 多功能微孔读板机
- SpectraMax M5 多功能微孔读板机

方法

IgG 标准品梯度稀释到 CD CHO 细胞培养基中使浓度在 2.5 和 100 mg/L 之间。细胞培养上清中的一系列 IgG 样品按需要稀释到细胞培养基中。加入 60 μ L ValitaMab 重组缓冲液到 ValitaTITER 板的每个孔中, 然后再迅速加入 60 μ L 准备好的细胞样品或蛋白标准品。混匀样品或标准品并在室温下避光孵育 30 分钟。在 SpectraMax iD5 读板机上使用内置的光栅光路激发并用 535-nm 发射滤片检测 FP 信号。使用 SoftMax Pro 软件中的预设模板获取数据并进行分析 (图 3)。同样在 SpectraMax i3x 和 SpectraMax M5 读板机上检测 FP 以验证它们的性能表现 (数据未示)。

用蛋白 A 的 HPLC 数据作对比。根据生产厂家操作说明进行实验。

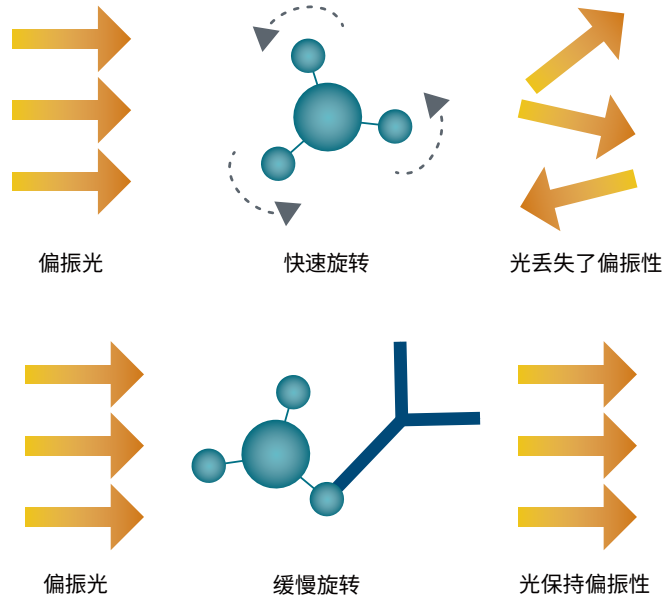


图 2 ValitaTITER 实验原理使用 FP 技术检测。自由的蛋白 G 分子很小且在缓冲液中快速旋转。结果是偏振激发光丢失了偏振性 (上图)。当蛋白 G 分子在样品中结合了抗体, 较大的复合体旋转就会减慢导致 FP 值的增加 (下图)

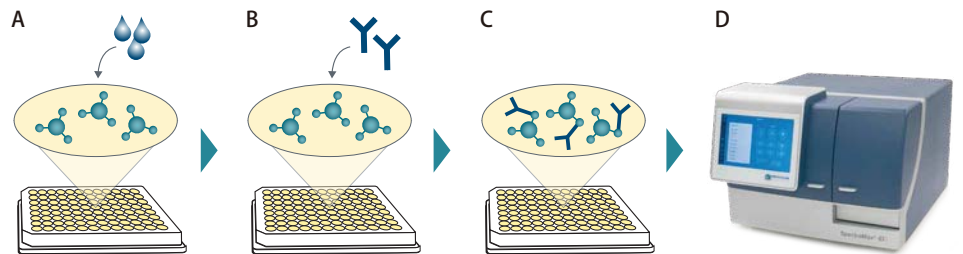


图 3 ValitaTITER 实验流程。(A) ValitaMab 重组缓冲液加入到 ValitaTITER 板的每个孔中。(B) 样品或 IgG 标准品加入到孔中。(C) 孔板孵育 30 分钟为结合的发生。(D) 使用 SoftMax Pro 软件在 SpectraMax iD5 读板机上检测 FP

结果

ValitaTITER 实验利用简单的“add-and-read”（添加和读数）方式获得 IgG 标准曲线，中间无洗涤步骤且只需少量样品（5-30 μL ）。在 SpectraMax iD5 读板机上使用内置的光栅激发光路和 535-nm FP 发射滤片可获得最佳结果。浓度从 3.1 到 100 mg/L 的标准品所检测到的结果在整个浓度范围内均保持了高度线性 ($r^2=0.998$) (图 4)。SpectraMax i3x 和 SpectraMax M5 读板机也获得了相似的数据（数据未展示）。SoftMax Pro 软件中的预设模板可自动计算出 mP 结果并绘制曲线图。

对进料间歇反应器条件培养基样品的 ValitaTITER 实验结果与 HPLC 进行了比较。两种方法呈现出高度的一致性， $r^2 = 0.994$ (图 5)。

总结

IgG 定量必须在细胞系开发过程的多个步骤中进行以保证最终扩大化生产的产品质量，因此一种以尽可能少的时间获得最准确结果的测定方法对成功至关重要。这里我们展示了由 ValitaTITER 实验得到的 IgG 定量数据与 HPLC 的分析结果高度匹配，后者被广泛认为是检测的金标准，然而前者所需的时间还不到 HPLC 的 3%。

ValitaTITER 实验是一种均相的、高通量的方法，可在细胞系开发工作流程中精确快速的检测 IgG 含量。这种实验的 96 孔板检测已在 SpectraMax iD5 读板机和其他具有 FP 功能的 Molecular Devices 公司读板机上被充分验证通过，保证结果的可靠性。而 SoftMax Pro 软件则大大减少检测参数的设置时间并自动拟合标准曲线和计算样品浓度。

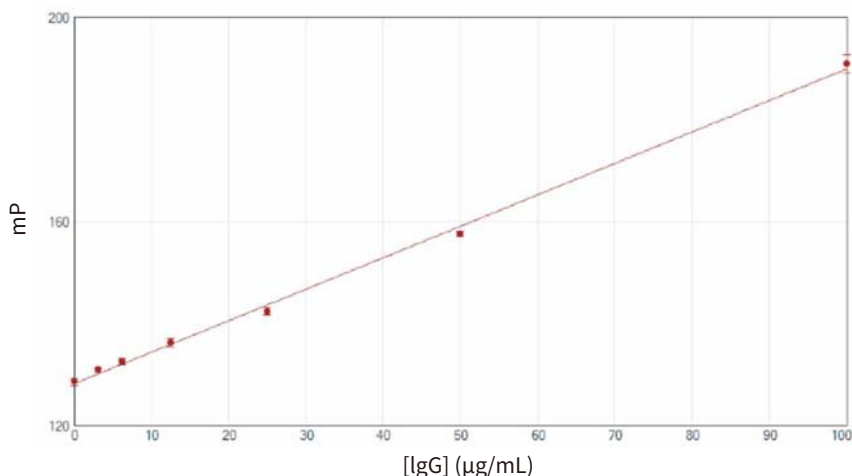


图 4 使用 ValitaTITER 实验在 SpectraMax iD5 读板机上生成 IgG 标准曲线。数据采用 SoftMax Pro 软件中的线性拟合绘制曲线图 ($r^2 = 0.998$)。误差线表示 6 个重复样品的标准偏差

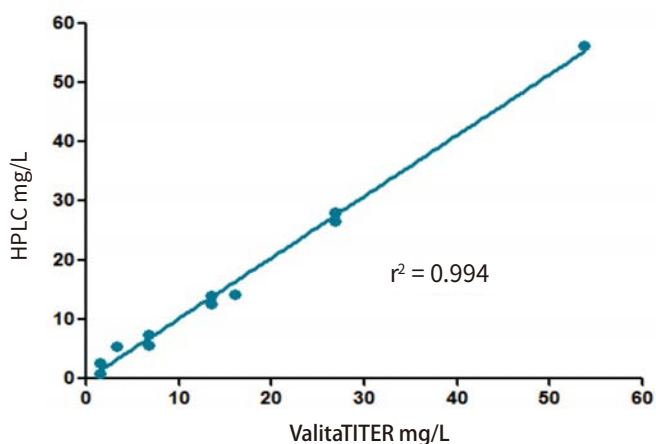


图 5 ValitaTITER 实验的 IgG 定量结果和蛋白 A 的 HPLC 分析结果进行比较。进料间歇生物反应器中一系列条件培养基的 IgG 滴度通过 ValitaTITER 荧光偏振实验进行定量。这些样品同样也通过蛋白 A 的 HPLC 进行分析



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586

上海 电话: 86-21-3372 1088

北京 电话: 86-10-6410 8669

成都 电话: 86-28-6558 8820

台北 电话: 886-2-2656 7585

香港

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com

传真: 86-21-3372 1066

传真: 86-10-6410 8601

传真: 86-28-6558 8831

传真: 886-2-2894 8267

传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335

地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124

地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016

地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼

地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

