

多用途模块可在 ÄKTA™ pure 层析系统上实现自动化多步纯化

Bastian Franke¹、Tuomo Frigård² 和 Shin Isogai¹

¹ 瑞士巴塞尔大学生物中心重点领域结构生物学和生物物理学

² Cytiva, Björkgatan 30, 751 84 Uppsala, Sweden

简介

基础研究中的蛋白质纯化过程（例如，来自小规模表达培养的细胞质和膜蛋白）通常包括单一样品重复进样和简单的单层析柱纯化。复杂的过程，例如多步纯化方案和其他手动步骤，往往变得非常耗时。

为了简化和加速下游蛋白质生产，可使用自动进样器和样品在线稀释的模块化方法实现自动化的两种最常用的纯化策略：1) 离子交换层析 (IEX)/IEX/尺寸排阻层析 (SEC)；2) 固定化金属离子亲和层析 (IMAC)/IEX/SEC。此外，新颖的系统配置允许在用户自定义的命令下操作系统组件（例如，独立操作两个柱位阀），从而设计纯化回路以提高目标蛋白的纯度。

将 ALIAS™ 自动进样器纳入下游纯化工艺

将 ALIAS™ 自动进样器 (ALIAS™-AS) BIO Prep 连接到 ÄKTA™ 的样品环阀，并利用 ÄKTA™ 系统泵注入样品。关键模块标注在如下设备图片的蓝框中显示（图 1）。

SparkLink™ 控制软件可实现将样品从样品瓶中转移到 ÄKTA™ 系统内部回路，大约4分钟便可完成一个容量为7毫升的样品瓶的进样。为了实现利用 ALIAS™-AS 将样品转移到 ÄKTA™ 系统中，UNICORN™ 软件中的方法序列功能用于设置必要的高级操作指令。为了实现大于7毫升体积进样，可以在方法序列中串联多组阶段。

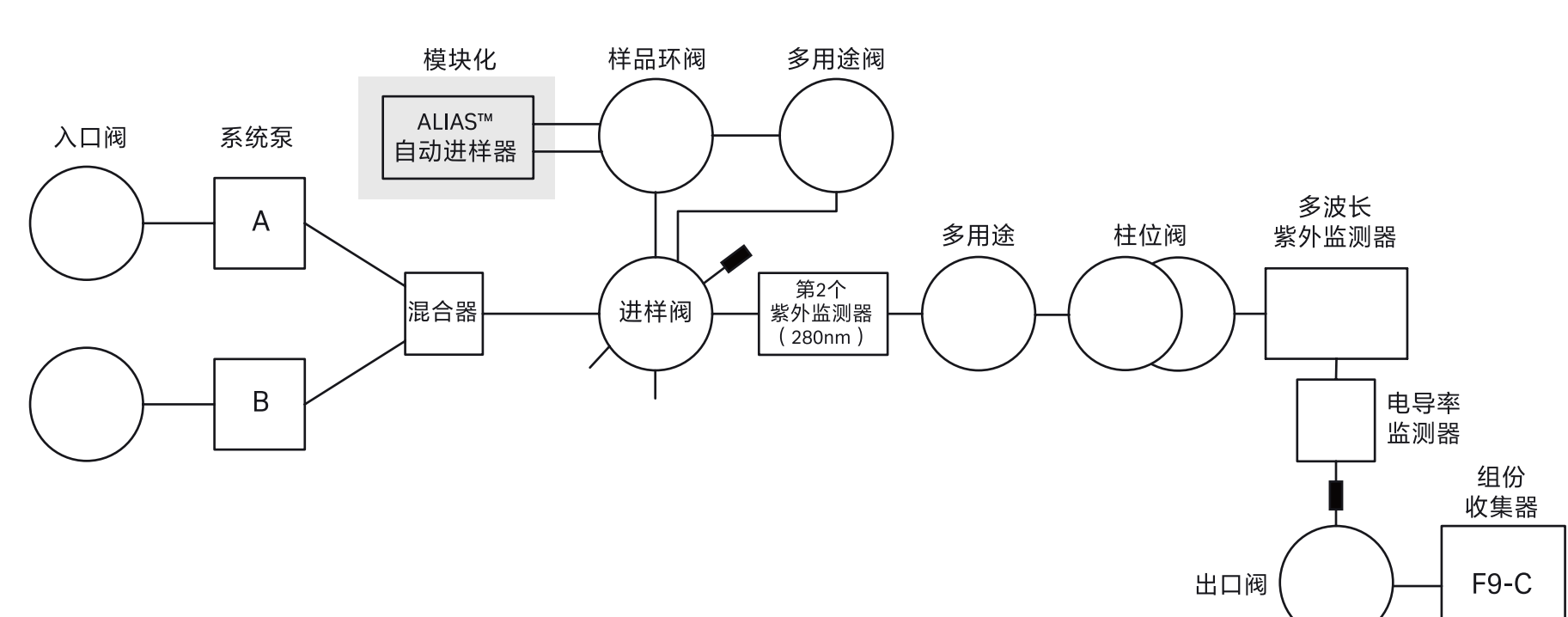
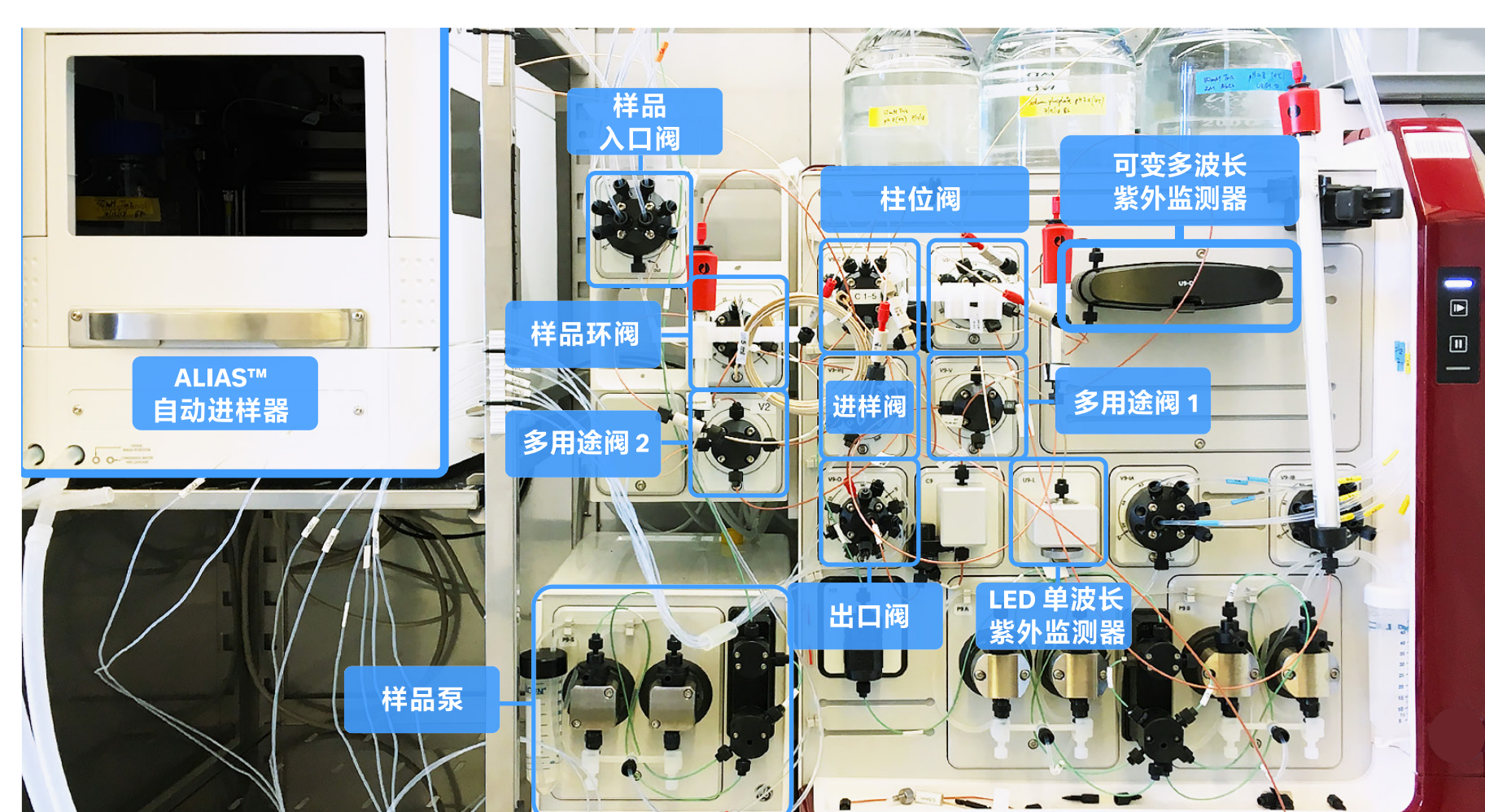


图 1. 使用 ALIAS™ 自动进样器和 ÄKTA™ pure 的自动化多步纯化流程方案。

应用：表达培养物的筛选

自动化的多柱纯化方案使用 ÄKTA™ 和 ALIAS™-AS 能够纯化一系列在昆虫细胞中产生的小规模表达批次，这对于发展和优化核磁共振波谱应用同位素标记策略 (²H、¹³C、¹⁵N) 是必要的。

图 2 显示了纯化后的、未标记的、²H- 和 ¹⁵N- 标记的绿色荧光蛋白 (GFP) 样品的处理和去卷积质谱，显示了未标记和标记的 GFP 的 m/z 值。标有星号的峰值含有额外的 N-末端甲硫氨酸 (+131.2 Da)。

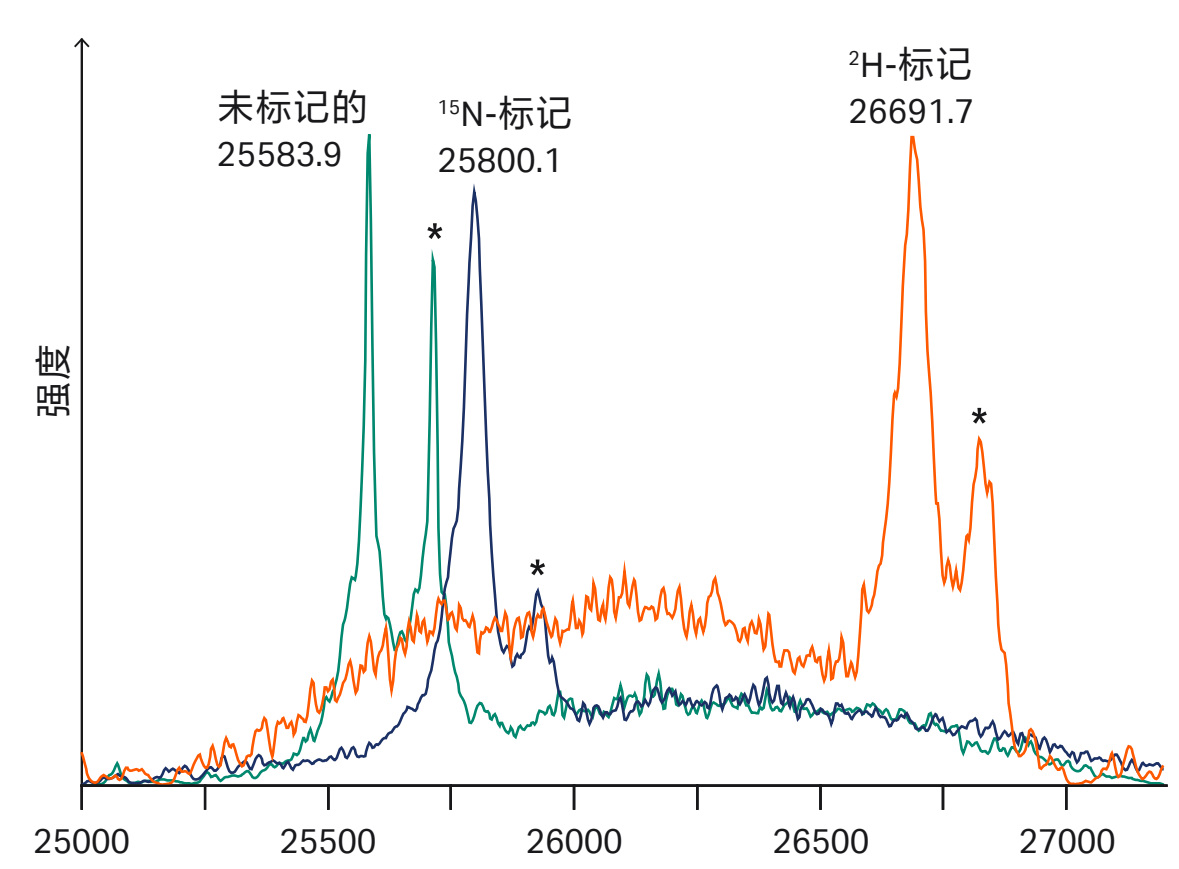


图 2. GFP 样品的质谱图。

三个层析柱的自动纯化设计

在线稀释过程中，IMAC 洗脱液通过出口阀回流至混合三通，与样品泵中的阳离子交换层析 (CIEX) 缓冲液混合，以降低电导率，然后在 CIEX 层析柱上重新捕获（图 3）。在 CIEX 洗脱过程中，通过峰值检测的监视 (Watch) 功能将柱位阀从旁路切换到 SEC 层析柱位置，以实现将火鸡β1-肾上腺素能受体 (tβ1-AR) 进样到 SEC 层析柱上。包括在位清洗 (CIP) 在内的一个纯化周期运行约 4 小时 40 分钟。

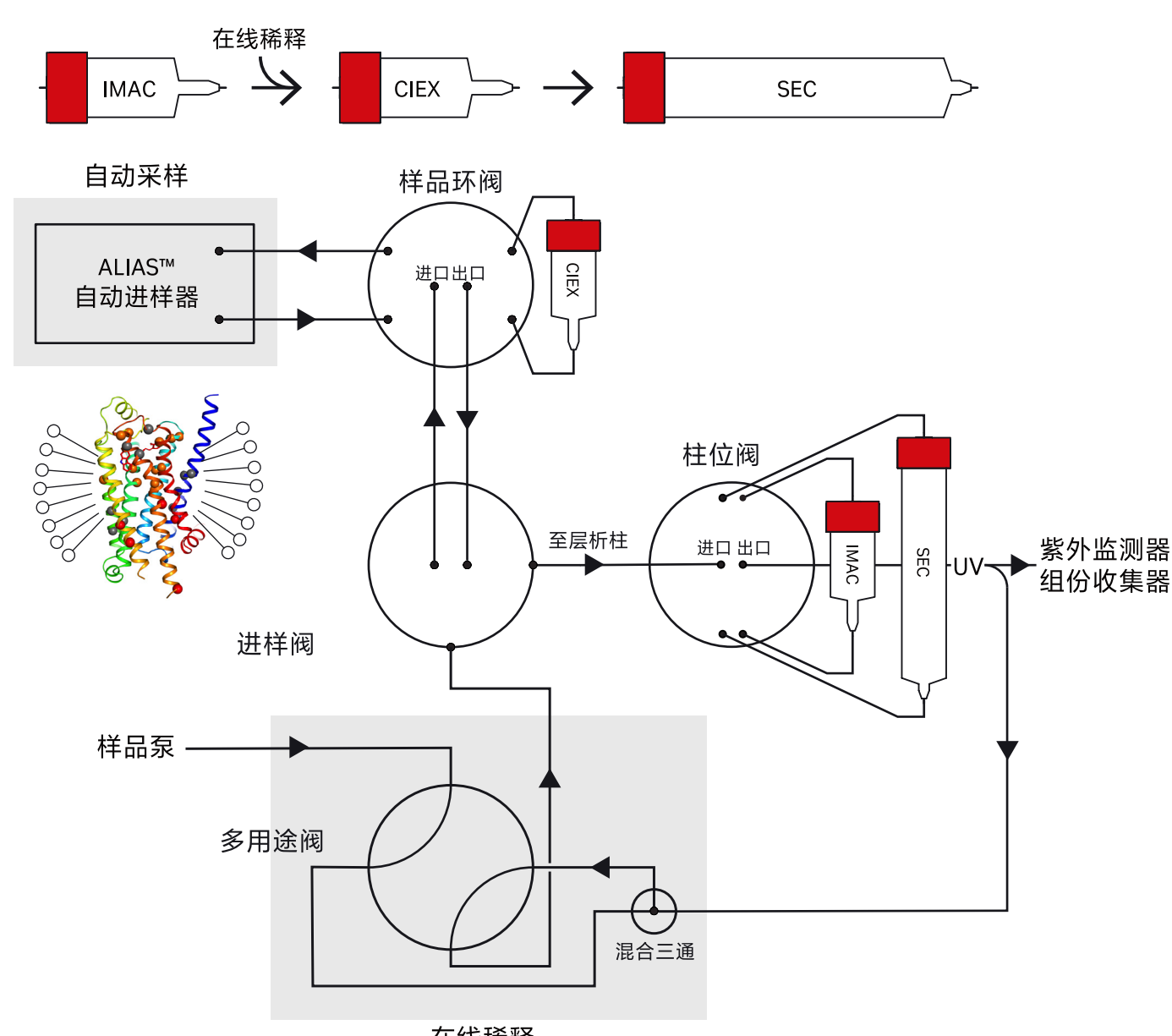


图 3. 用于纯化 tβ1-AR 的自动化 IMAC-CIEX-SEC 纯化方案。

ALIAS™-AS 连接到 ÄKTA™ pure 的样品环阀，并利用系统泵注入样品（图 4）。在阴离子交换层析 (AIEX) 洗脱过程中，通过峰值检测的监视功能触发柱位阀从旁路位置切换到 SEC 位置，以允许将 GFP 转移到 SEC 层析柱上。为了最大限度地降低因填料压力和整体系统压力过高造成的层析柱损坏风险，需要在 SEC 进样过程中降低流速。一个纯化周期（包括在位清洗 CIP）运行约 2 小时。图 5 显示了典型的运行结果。

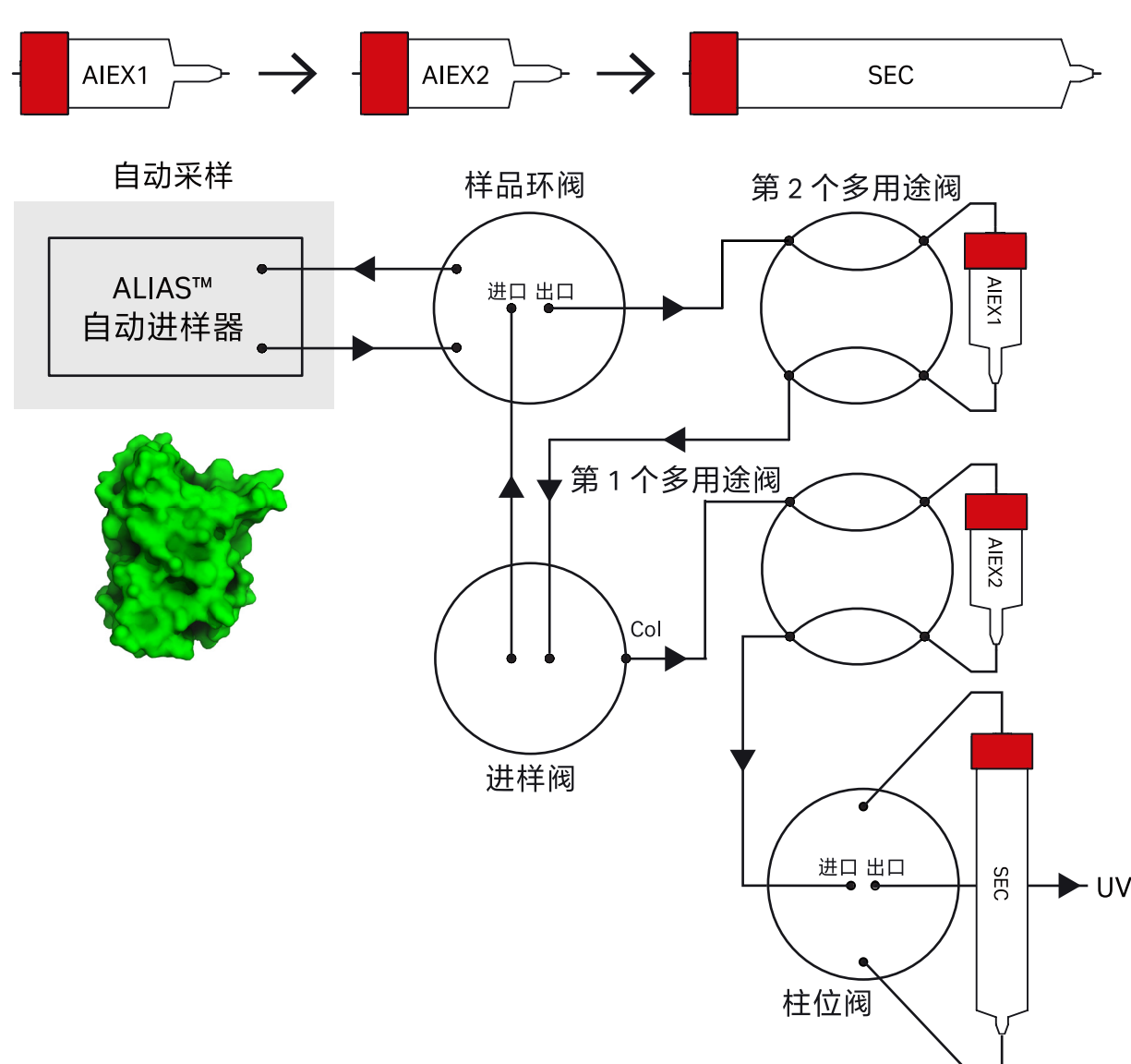


图 4. 用于纯化 GFP 的 AIEX1-AIEX2-SEC 纯化方案。

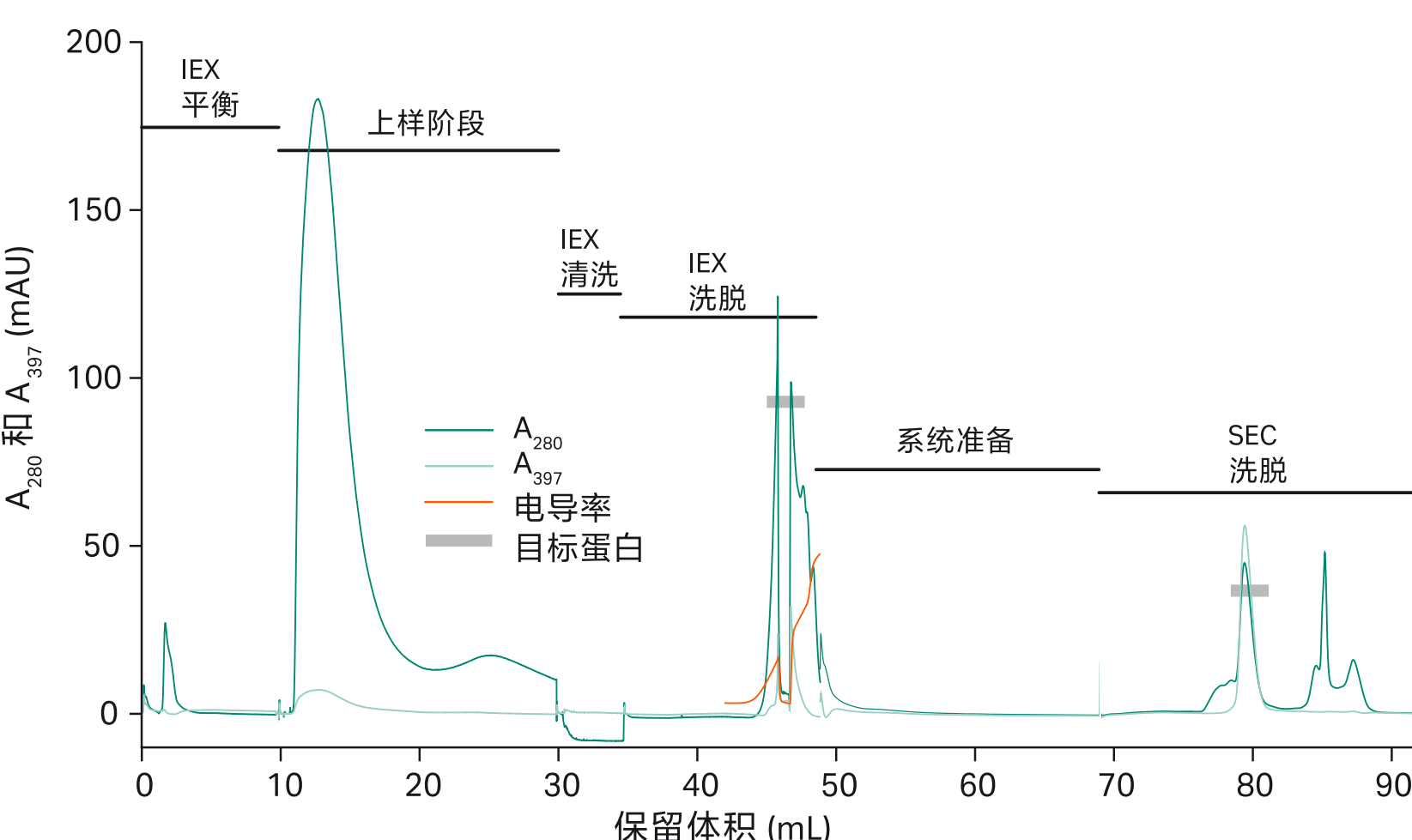


图 5. 一次自动化 GFP 纯化运行的典型层析图。

新颖的系统配置允许两个柱位阀独立运行

定制的系统配置文件不仅可以支持两个柱位阀独立运行，而且允许自开发纯化流路设计（图 6）。在柱位阀的上游放置了一个四通多用途阀来控制流向。为了允许层析柱的正向流操作，两个柱位阀根据多用途阀的阀位切换到正向或反向流路。这样，样品可以在两个层析柱之间来回移动。此外，混合三通或紫外监测器可置于柱位阀之间，用于在线稀释或监测流路中的样品。

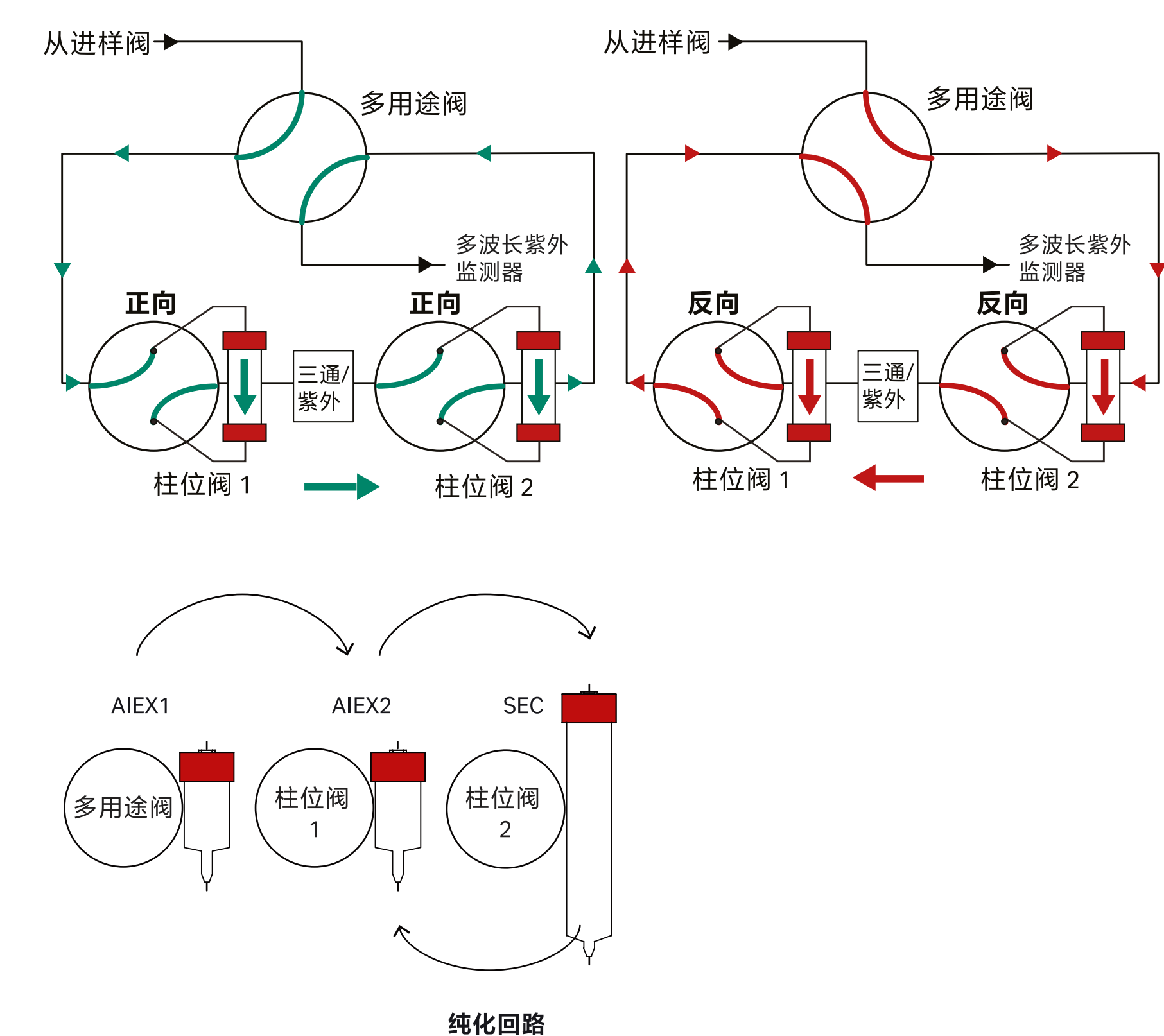


图 6. 纯化方案中使用的层析柱配置。

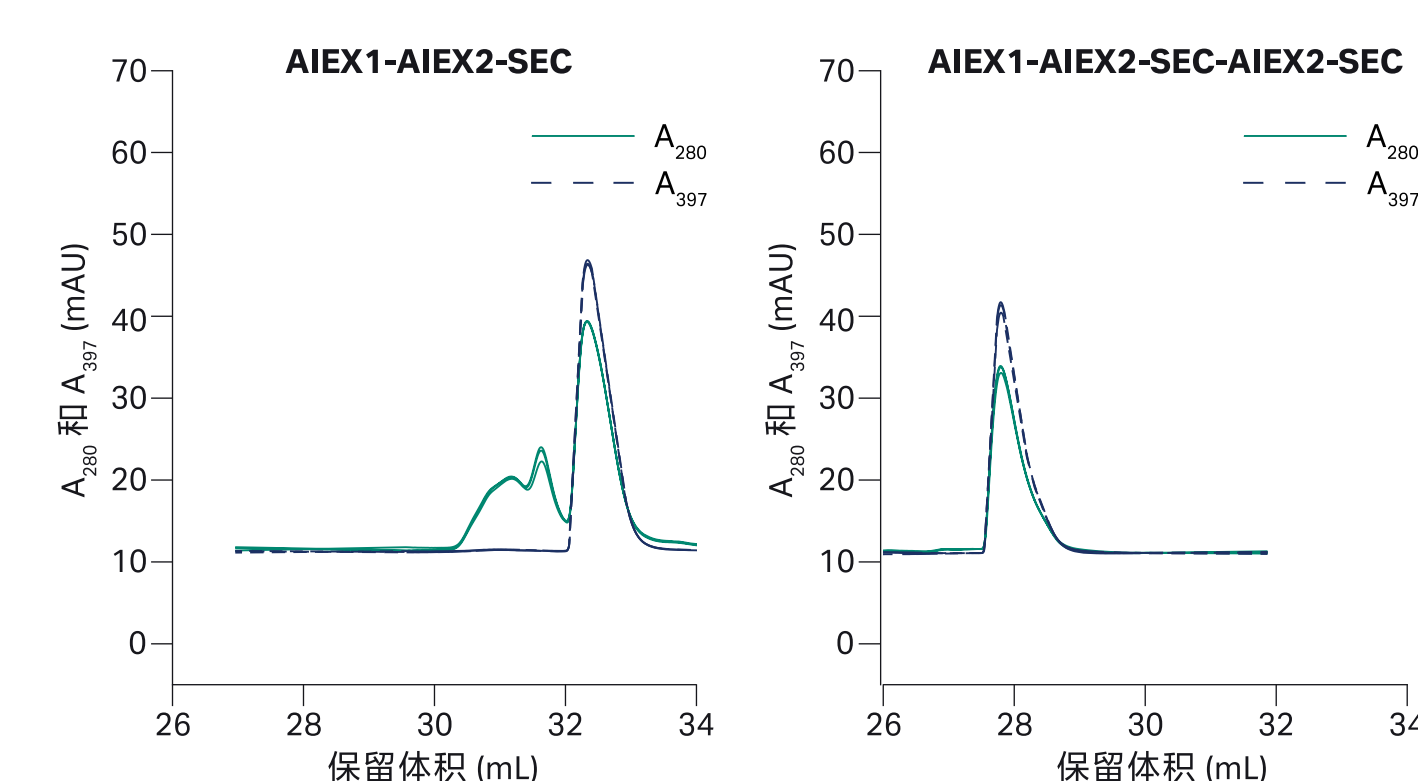


图 7. 运行三次的 A₂₈₀（绿色实线）和 A₃₉₇（蓝色虚线）SEC 层析图谱重叠图。

GFP 最多被回收两次，典型层析图谱如图 7 所示。A₃₉₇ SEC 下波段显示样品在转移过程中损失最小（图 8）。为了进行图谱间重叠比较，单循环层析图谱在 X 轴方向上略有迁移。

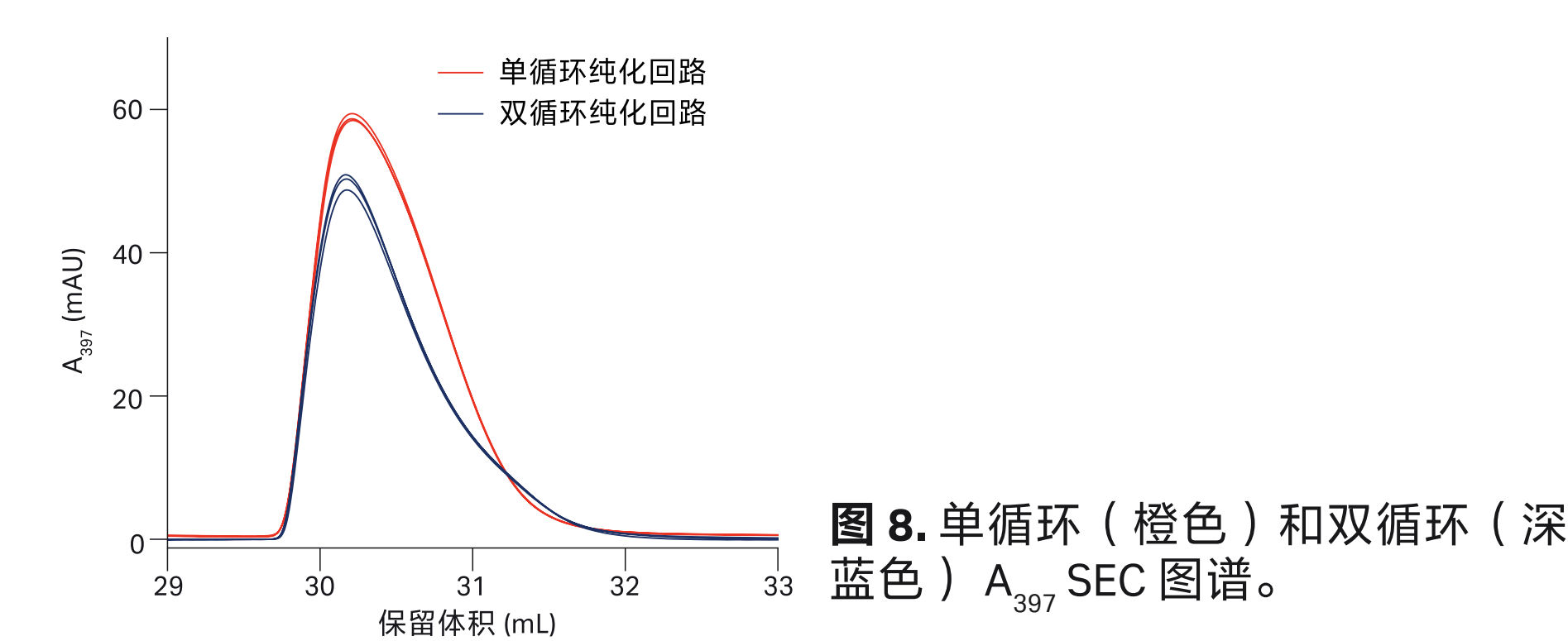


图 8. 单循环（橙色）和双循环（深蓝色）A₃₉₇ SEC 图谱。

总结

- ÄKTA™ pure 平台为复杂蛋白纯化策略的发展提供了坚实的基础。
- 在线稀释 IEX 层析法的应用使自动多步纯化的设计方案成为可能，大幅减少纯化周期时间和人工干预。
- 手动和单次进样操作可被 ALIAS™-AS 取代以实现大量蛋白裂解样品的自动化纯化。ALIAS™-AS 为提高蛋白纯化方法的通量、准确性和再现性方面提供了可靠、强大的功能。