



Быстрое количественное определение белков и антител с применением системы BLItz

Рени Тобиас, прикладной исследователь, ForteBio

ВВЕДЕНИЕ

Традиционные техники определения концентрации белка-мишени, например, ELISA или ВЭЖХ и требуют больших затрат труда и времени, особенно при анализе сложных матриц. Для разработки ботехнологических процессов и применения продуктов использование более быстрой методики анализа белков обеспечит своевременное и осознанное принятие решений. В настоящей заметке по применению описано использование системы BLItz™ как для ускорения технологических процессов, так и для быстрого прямого количественного определения протеинов в необработанных матрицах.

О СИСТЕМЕ BLITZ

BLItz представляет собой доступную по стоимости мелкомасштабную персональную аналитическую систему для количественного определения белков с применением простого и быстрого подхода Dip and Read™. С использованием системы BLItz количественное определение белков и антител может выполняться с высокой специфичностью и чувствительностью за считанные секунды даже при использовании необработанных проб. В этой системе используется та же патентованная технология биослойной интерферометрии (Bio-Layer Interferometry, BLI), которая лежит в основе платформы ForteBio Octet, обеспечивая в реальном времени анализ взаимодействий на поверхности одноразовых оптоволоконных биосенсоров. Показатели аффинности, концентрации и кинетика связывания могут измеряться в капельных пробах на 4 мкл прямо на лабораторном столе.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Простое в освоении программное обеспечение BLItz Pro™ Data Analysis содержит прикладные модули для анализа присутствия, количества, активности и специфичности представляющего интерес белка. На основании специфичности захватываемой молекулы захвата, которая иммобилизуется на биосенсоре, можно выполнять селективные измерения количества интересующего белка даже в сложных матрицах, например, в культуральных средах, супернатанте или клеточном лизате.

Для оценки концентрации белка с помощью системы BLItz в режиме реального времени с применением капли пробы объемом 4 мкл измеряется скорость связывания белка с поверхностью одноразового биосенсора. Концентрация белка-мишени в пробе прямо пропорциональна скорости связывания. С использованием программного модуля Create Standard Curve, исходя из результатов измерений проб с известной концентрацией, можно получить стандартную кривую. Затем с помощью программного модуля Quantitate Sample можно определить концентрацию белка в аналогичных пробах с неизвестным содержанием. Стандартные кривые можно сохранить и использовать для последующих количественных опытов.

БИОСЕНСОРЫ DIP AND READ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

В аналит-специфических биосенсорах Dip and Read используются такие предварительно иммобилизованные молекулы захвата, как антитела к IgG Fc человека, антитела к IgG Fv мыши, протеин A, протеин G, протеин L, антитела к Fab-CH1 человека, антитела к GST, антитела к Ni-NTA и пента-HIS. Эти готовые к использованию биосенсоры применимы для количественного анализа IgG или рекомбинантных белков, которые обладают аффинностью к упомянутым молекулам захвата. Для адаптации анализа к другим белкам-мишеням можно использовать стрептавидиновый биосенсор и загружать его биотинилированными молекулами захвата. Связывание с поверхностью биосенсора является высокоспецифичным, что позволяет осуществлять дифференциацию между белком-мишенью и другими компонентами среды. Измерения можно производить быстро и точно даже для неочищенных проб, что сильно упрощает анализ на всех стадиях исследований, разработки процесса и производства. Быстрое, простое и точное количественное определение белков можно использовать в разработке таких биотехнологических процессов, как скрининг гибридомы, выбор клона, измерение титров антител, мониторинг экспрессии в процессе или по окончании производства или для оптимизации условий роста и систем экспрессии.

Детектирование белка в сложных пробах

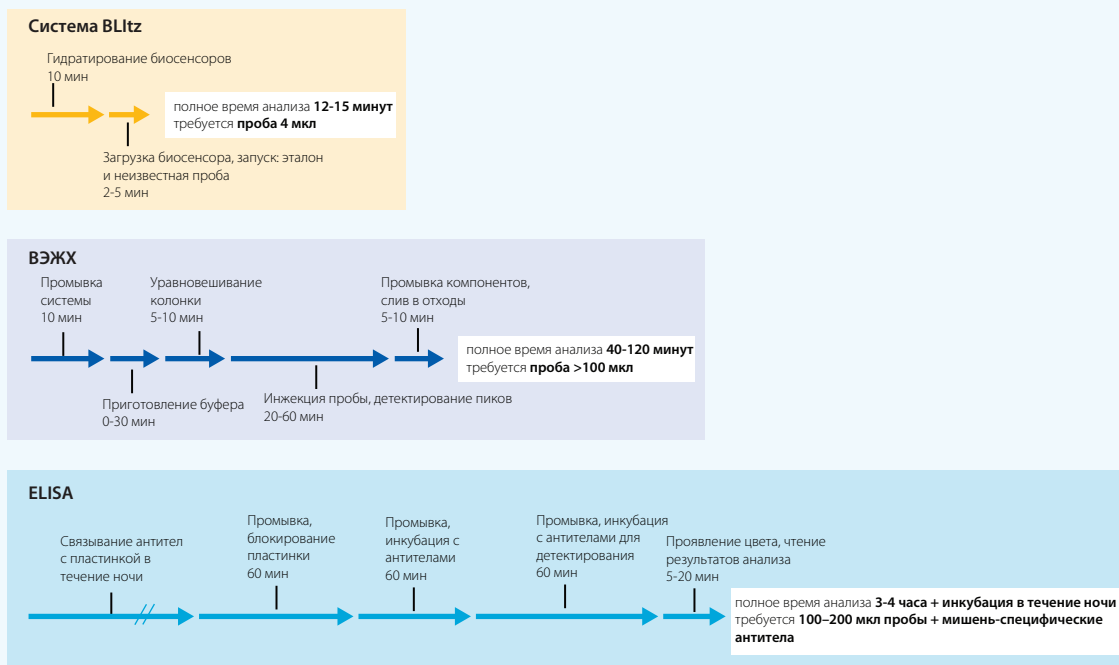


РИСУНОК 1: Сравнение детектирования белков с применением системы BLITZ и других методик.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРОВ АНТИТЕЛ В ПРОБАХ ГИБРИДОМЫ

Моноклональные антитела являются важным инструментом биомедицинских исследований и представляют большую коммерческую ценность в качестве реагентов или биопрепаратов. В то время как технология производства моноклональных антител из линий гибридных клеток за последние годы добилась больших успехов, методы скрининга отдельных клонов гибридомы за этот же период существенно не изменились. Такие методы скрининга клеточных линий, как ELISA, могут быть слишком громоздкими, требовать больших количеств материала, многочисленных стадий промывки и огромных затрат времени (Рисунок 1). Безметочное детектирование с применением системы BLITZ является простым, быстрым и точным решением для характеристики и мониторинга культур гибридомы. Здесь мы представляем, как система BLITZ применялась для ускорения количественного определения в процессе производства моноклональных антител группы тканевых культур у одного из потребителей продукции ForteBio.

Для этого потребителя, лидера в производстве антител, наборов ELISA, красителей и реагентов для медико-биологической отрасли критически важным является эффективное и своевременное производство и высококачественных реагентов. Без эффективного метода определения титров в сложных супернатантах гибридомы количество произведенных в культуре антител остается неизвестным, пока не выполнен сбор и очистка. Благодаря более раннему сбору материала в производственном процессе, группа разработчиков могла бы сэкономить много времени и материалов. Количественное определение с использованием

системы BLITZ и биосенсоров на основе протеина G явилось тем решением, которое обеспечило простую и эффективную оценку титров антител в сложных супернатантах гибридомы непосредственно в процессе производства.

Получение стандартной кривой

Прежде чем проводить количественный анализ проб гибридомы, были получены стандартные кривые соответствующего изотипа. Для получения каждой стандартной кривой в культуральную среду гибридомы вводились в известных концентрациях очищенные моноклональные антитела того же изотипа, что и в пробах с неизвестным содержанием. В калибровочных пробах использовалась матрица Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) с питательными добавками и 1% фетальной бычьей сыворотки. Биосенсоры на основе протеина G (ForteBio, номер по каталогу 18-5082) предварительно гидратировались в той же самой среде. С использованием модуля Create Standard Curve в составе программного обеспечения BLITZ Pro Data Analysis вводились данные о пробах с измерением каждой концентрации в пробе объемом 4 мкл в течение 30 секунд с перемешиванием. С эталонного биосенсора также снимались показания в среде без антител-мишеней для последующего вычитания фонового сигнала, вызванного неспецифическим связыванием компонентов среды и сыворотки с биосенсором. После получения данных программное обеспечение вычисляло скорости связывания и автоматически генерировало стандартную кривую, которая могла аппроксимироваться линейной, линейной от точки к точке или 5-кусочно-линейной зависимостью. Затем стандартные кривые сохранялись для использования в последующих количественных опытах.

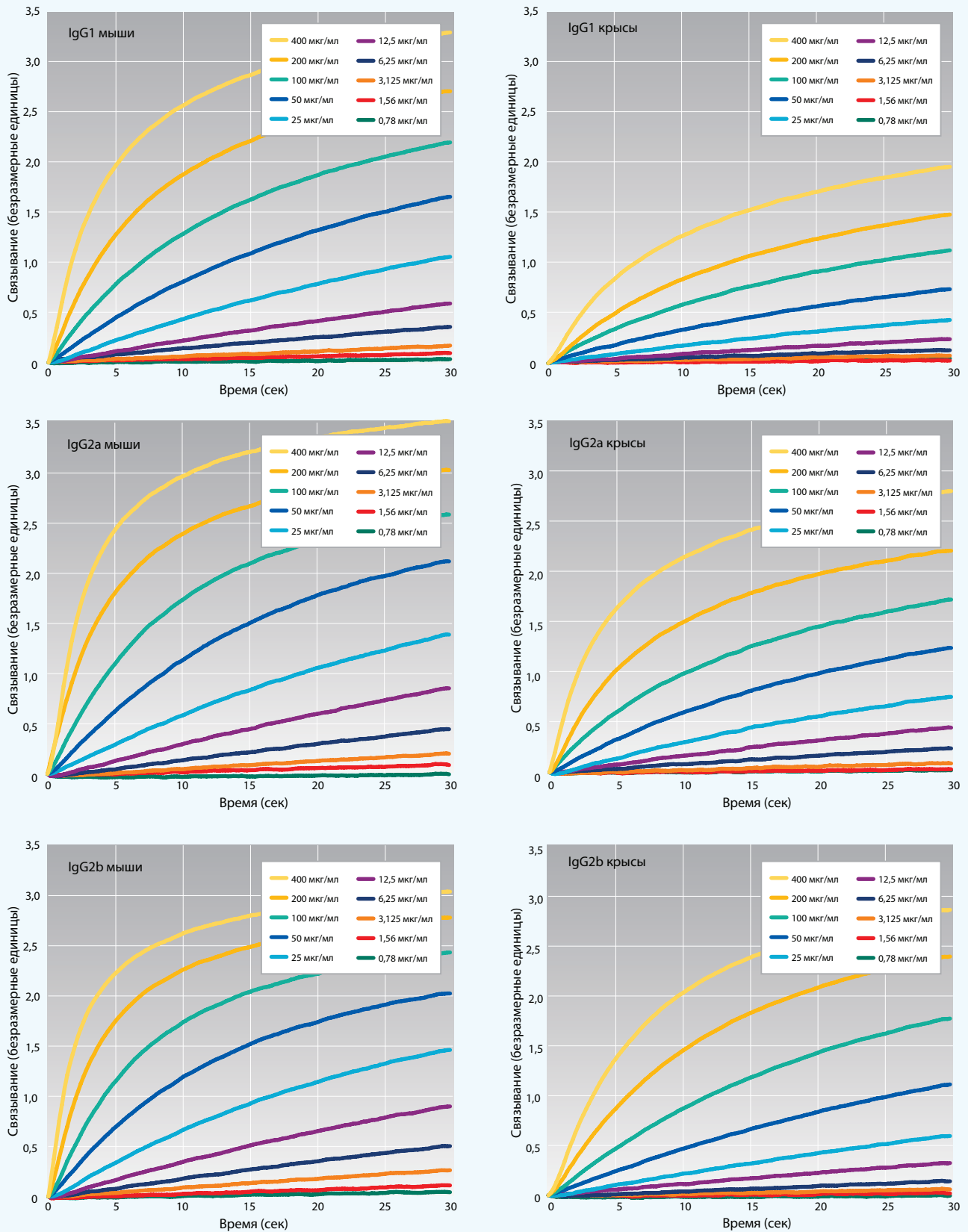


РИСУНОК 2: Зарегистрированные данные из стандартных кривых для трех изотипов мышиных антител и трех изотипов крысиных антител с использованием биосенсоров на основе протеина G. Очищенный IgG добавлялся в культуральную среду гибридомы, содержащую 1% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), до концентрации в 400 мкг/мл с последующим последовательным разбавлением. Вычитание фонового сигнала выполнялось с использованием данных, полученных с биосенсора протеина G в среде без IgG.

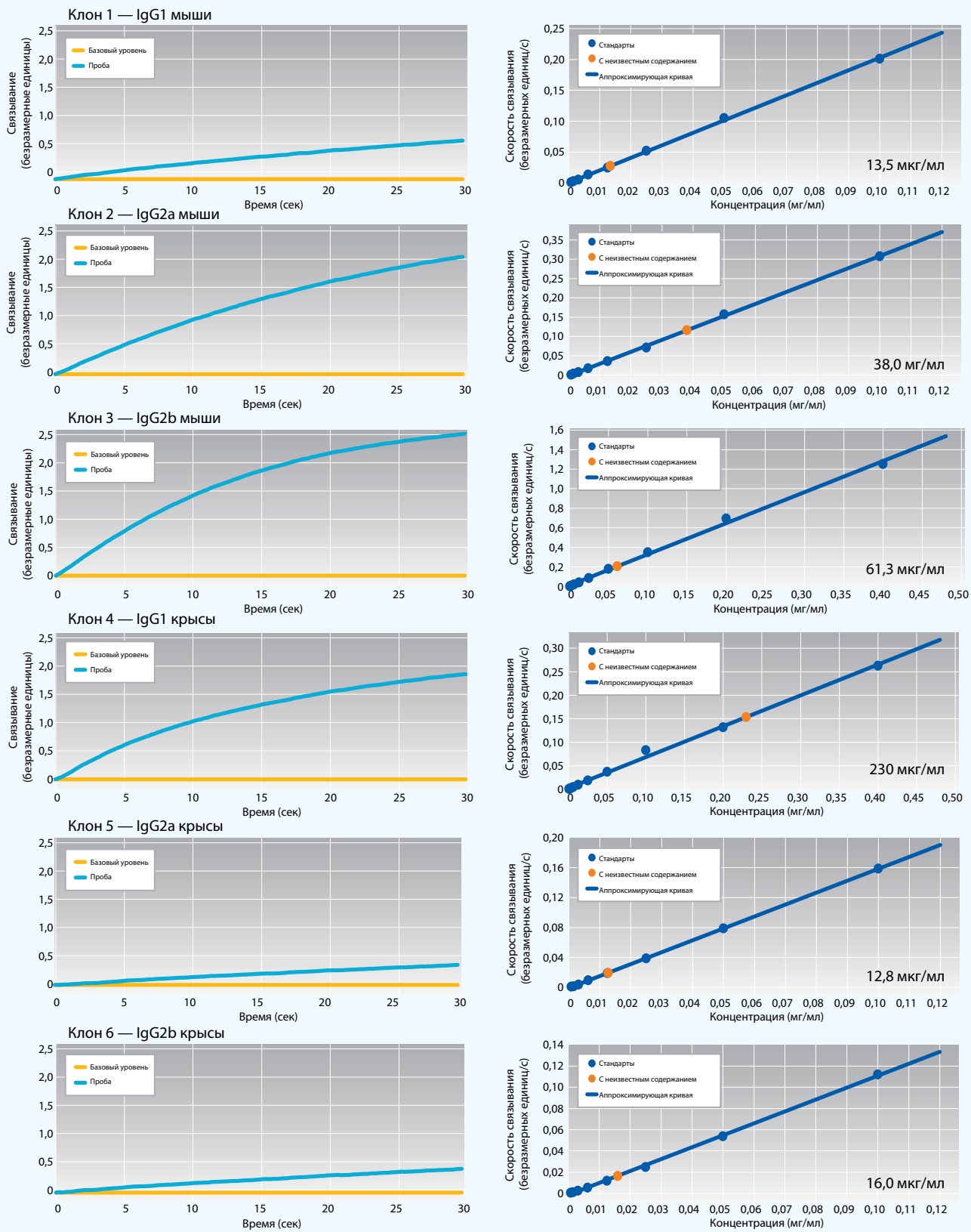


РИСУНОК 3: Количественное определение в шести пробах супернатанта гибридомы. Зарегистрированные данные показаны слева вместе с базовыми данными биосенсора, которые использовались для вычитания фона из сигнала каждой пробы. Соответствующие изотипам стандартные кривые, полученные из зарегистрированных данных на рисунке 2, показаны справа с указанием скоростей связывания и соответствующих вычисленных концентраций.

Рисунок 2 представляет данные реального времени из стандартных кривых для трех изотипов мышинных антител и трех изотипов крысиных антител. Обратите внимание, что даже в присутствии компонентов сложной среды и небольшого количества сыворотки скорость связывания для каждой концентрации можно определить быстро и с высокой чувствительностью, до 1,56 мкг/мл, для некоторых изотипов. Динамический рабочий диапазон системы BLItz достаточно широк и позволяет выполнять измерения антител, начиная с уровня менее 1 мкг/мл и до 4 мг/мл (фактический динамический диапазон зависит от выбора аналита и биосенсора). Для сравнения, метод ELISA характеризуется более узким динамическим диапазоном и часто требует разбавления проб.

Количественное определение в пробах с неизвестным содержанием

Для определения концентрации антител в пробах с неизвестным содержанием был собран супернатант, и в систему BLItz вносились капельные пробы объемом 4 мкл. Информация о пробе вводилась в модуль Quantitate Sample программного обеспечения BLItz Pro Data Analysis. В прибор был загружен предварительно гидратированный биосенсор на основе протеина G. Запись результатов анализа проводилась 30 секунд с включенным перемешиванием, как и для стандартных проб. Также проводились измерения базовой пробы, состоящей только из одной среды. После получения данных результаты по пробам с неизвестным содержанием сравнивались со стандартной кривой с вычислением концентраций.

На рисунке 3 представлены данные, полученные для шести проб гибридомы, вместе со стандартными кривыми, вычисленными по данным рисунка 2. Для каждой пробы для обеспечения наивысшей точности выбиралась стандартная кривая с тем же самым видом/изотипом. Все пробы попадали в диапазон, покрываемый соответствующими стандартными кривыми, что важно для точного количественного определения. Вычисленные концентрации в этих экспериментах находились в диапазоне от 12,8 мкг/мл до 230 мкг/мл. Данные по концентрациям, полученные этим методом, дали возможность предсказать выход продукта в крупномасштабном производстве антител и лучше оценить подходящее время для сбора. Также система BLItz может применяться для оптимизации условий выращивания культуры, скрининга и выбора наиболее продуктивных клонов для производства или создания банка клеток, а также для определения влияния на титр добавок и факторов роста.

СРАВНЕНИЕ ДАННЫХ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЛЯ BLITZ И ВЭЖХ

Получение рекомбинантных антител является ключевым звеном в разработке новых лекарственных препаратов и биотехнологий, а точное определение концентрационных данных важно для оценки производства антител продуцирующими клонированными клетками. Для количественной оценки содержания антител в супернатантах клеточных культур существуют разнообразные методы, в том числе ELISA, ВЭЖХ или спектроскопия. В этом разделе мы представим сравнительные данные по платформам, любезно предоставленные еще одним потребителем продукции ForteBio, которые ясно демонстрируют точность системы BLItz при непосредственном сравнении с ВЭЖХ.

Интересующие рекомбинантные антитела A1 были обратимо трансфицированы в клетки 293F (Invitrogen), которые выращивались в бессывороточной среде в двух колбах на протяжении 8-суточного цикла экспрессии. Для оценки титра осуществлялся ежедневный отбор среды с целью мониторинга выхода. Для количественной оценки 100 мкл супернатанта пропускалось через колонку POROS® на 20 микрон на основе протеина G (0,1 мл, Applied Biosystems) с использованием системы ВЭЖХ Waters® e2695. На 5 и 6 день параллельно ВЭЖХ применялась система BLItz. Биосенсоры на основе протеина A (ForteBio, номер по каталогу 18-5010) или биосенсоры на основе протеина G (ForteBio, номер по каталогу 18-5082) перед применением были предварительно гидратированы в культуральной среде. Очищенный протеин антитела A1 вводился в ту же самую среду в известных концентрациях, и для каждого биосенсора с применением модуля Create Standard Curve из программного обеспечения BLItz Pro Data Analysis была получена стандартная кривая. Капли по 4 мкл супернатанта из колб 1 и 2 на 5 и 6 день анализировались на каждом биосенсоре в течение 30 секунд с использованием модуля Quantitate Sample, как описано выше. В каждом опыте использовался результат базового цикла биосенсора с использованием только среды для вычитания фонового сигнала. Пробы анализировались в парах с одним исходным репликатом и другим с разбавлением культуральной средой в 2 раза, с обратным подсчетом исходной концентрации, усредненной по величине конечной концентрации выхода. Учтите, что в этом опыте точное количество определяемого белка также использовалось для построения стандартной кривой. Измерение концентрации пробы в сравнении со стандартной кривой, полученной с тем же самым белком, давало наиболее точные результаты. При количественной оценке содержания антител, если идентичных антител нет в наличии, рекомендуется использовать один из изотипов из группы анализируемого изотипа. Также важно разбавлять стандарты в том же самом буфере или среде, что и пробы.

Таблица 1 и Рисунок 4 представляют прямое сравнение данных по обратимому трансфицированию между системой BLItz и ВЭЖХ. Вычисленные титры в мкг/мл отображаются для каждой колбы в зависимости от дня. Циклы измерения проб с использованием биосенсоров на основе протеина A сверялись с калибровочной кривой для протеина A, а пробы протеина G соответственно сверялись с кривой для протеина G. В результате оказалось, что титры, вычисленные по данным системы BLItz с применением биосенсоров как на основе протеина A, так и на основе протеина G, оказались чрезвычайно близкими и также соответствовали титрам, полученным из анализа ВЭЖХ. Относительный КВ, вычисленный по результатам трех методов не превышал 12% для каждой из колб во всех точках во времени. Схема, которую содержит Рисунок 4, явным образом иллюстрирует соответствие результатов, полученных с использованием системы BLItz с разными биосенсорами в различных опытах, а также соответствие результатов системы BLItz и ВЭЖХ. Хотя результаты, полученные с использованием обеих платформ, совпадают, система ВЭЖХ требует значительно большего времени на обработку, объема пробы, а также затрат на эксплуатацию и обслуживание. Применение системы BLItz позволяет получать точные результаты по связыванию в реальном времени в течение нескольких секунд с минимальной обработкой, что является быстрой и удобной альтернативой другим методам количественного определения белков.

День	Колба 1						Колба 2					
	Pro A - BLitz		Pro G - BLitz		Pro G - ВЭЖХ		Pro A - BLitz		Pro G - BLitz		Pro G - ВЭЖХ	
5	27,81	27,92	28,44	30,37	33	нет	22,97	23,84	18,69	26,34	25	нет
6	31,46	32,94	31,66	34,76	36	36	27,28	26,04	25,36	28,83	29	нет

ТАБЛИЦА 1: Сводные данные количественного определения, полученные в системе BLitz и методом ВЭЖХ для супернатантов обратимого трансфектирования антител A1. Вычисленные титры в мкг/мл по многократным измерениям перечислены для каждой колбы в соответствии с днями сбора.

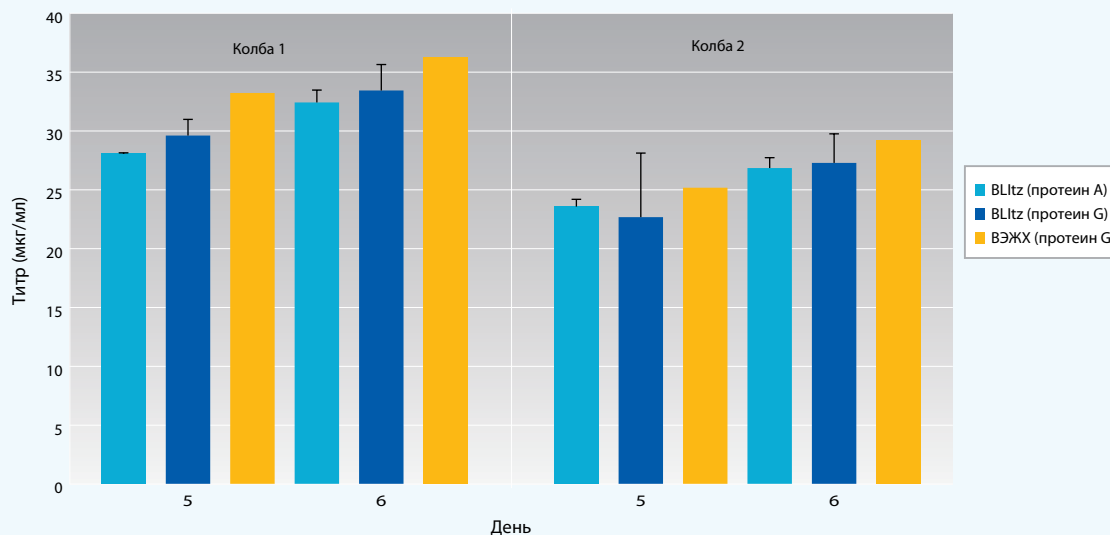


РИСУНОК 4: Сравнение системы BLitz с ВЭЖХ для анализа супернатантов при обратимом трансфектировании антител A1. Титры, вычисленные по данным системы BLitz с использованием биосенсоров на основе протеина A и протеина G, обнаружили большое сходство между собой, а также с результатами ВЭЖХ, что демонстрирует соответствие между платформами.

СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ FAB В ПРИСУТСТВИИ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ

При получении рекомбинантных IgG и фрагментов Fab часто возникающей проблемой является чрезмерная экспрессия легких цепей. В большинстве имеющихся методов детектирования и количественного определения человеческих Fab-фрагментов применяются связывающие агенты, например, протеин L, взаимодействующий с эпитопами, присутствующими на легких цепях антител. С применением этих методов точное определение концентрации Fab может быть затруднено вследствие перекрестного связывания лиганда с загрязняющими свободными легкими цепями (Рисунок 5). Здесь мы описываем метод селективного анализа интактных фрагментов Fab и IgG с применением аффинного лиганда, который связывается с доменом CH1 тяжелой цепи Fab-фрагмента.

Биосенсоры ForteBio на основе антител к Fab-CH1 человека обеспечивают высокоспецифичное связывание в регионе CH1 человеческого Fab, F(ab')₂ и IgG. Биосенсоры на основе антител к Fab-CH1 человека не проявляют свойств перекрестного связывания в отношении легких цепей антител, и при использовании вместе с системой BLitz могут применяться для быстрого и простого количественного определения фрагментов Fab/F(ab')₂ в присутствии загрязняющих свободных легких цепей.

Для демонстрации высокого уровня специфичности биосенсоров на основе антител к Fab-CH1 человека исследовалось влияние свободных легких цепей на анализ человеческих Fab-фрагментов. Подготовка проб осуществлялась в кондиционированной культуральной среде CHO (Aragen Biosciences), содержащей приблизительно 17 мкг/мл фрагмента Fab, полученного из цельного IgG человека (Jackson Immunoresearch) и внесенного с легкими цепями белка Бенс-Джонса (Meridian Life Sciences) в конечных концентрациях 0 мкг/мл, 10 мкг/мл и 50 мкг/мл. Fab-фрагменты также последовательно разбавлялись в той же самой кондиционированной среде клеточной культуры CHO для получения стандартной кривой (данные не представлены). Кондиционированная среда также использовалась для предварительного увлажнения в течение 10 минут биосенсоров на основе антител к Fab-CH1 человека (ForteBio, номер по каталогу 18-5104) и биосенсоров на основе протеина L (ForteBio, номер по каталогу 18-5085). Стандартные кривые и результаты по пробам с неизвестным содержанием получались с применением модулей Create Standard Curve и Quantitate Sample в программном обеспечении BLitz Pro Data Analysis соответственно. Каждая из проб наносилась каплями объемом 4 мкл, регистрация данных выполнялась в течение 30 секунд.

Данные, полученные для проб Fab, содержащих свободные легкие цепи каппа, для обоих биосенсоров представляет Рисунок 6. На кривые связывания Fab-фрагментов, полученные с использованием биосенсоров на основе антител к Fab-CH1

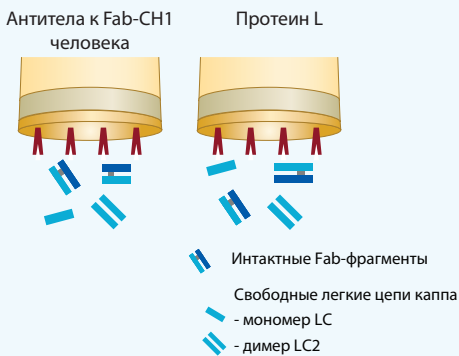


РИСУНОК 5: Селективность биосенсоров на основе антител к Fab-CH1 человека в сравнении с биосенсорами на основе протеина L для интактных Fab-фрагментов.

человека, не влияло присутствие легких цепей, тогда как биосенсоры на основе протеина L с повышением концентрации легких цепей давали рост сигнала. Поскольку концентрация Fab-фрагментов в пробе была постоянной, это увеличение предположительно обусловлено совместным связыванием свободных легких цепей протеина L. Сравнительная схема вычисленных концентраций Fab для двух биосенсоров представлена на рисунке 7. Эти данные явно демонстрируют, что увеличение связывания с биосенсорами протеина L соответствует повышению концентрации легких цепей, тогда как связывание с биосенсорами антител к Fab-CH1 человека остается постоянным. Эта высокая специфичность связывания Fab делает биосенсор антител к Fab-CH1 человека чрезвычайно полезным для анализа Fab-проб до выполнения очистки.

Для применения с системой BLItz выпускается ряд биосенсоров с высоким уровнем специфичности, которые можно использовать

для анализа с сложных матрицах. Например биосенсоры на основе антител к IgG Fc мыши (ForteBio, номер по каталогу 18-5088) и антител IgG Fc человека (ForteBio, номер по каталогу 18-5060) обеспечивают селективное связывание с IgG мыши и человека соответственно. Стрептавидиновые биосенсоры можно загружать нужными биотинилированными молекулами захвата, чтобы получить биосенсоры пользовательского типа для проведения неограниченного ряда анализов.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ АНАЛИЗОВ

- Выполняйте предварительное гидратирование биосенсоров не менее 10 минут в буферной матрице, в точности соответствующей анализируемой пробе. Это минимизирует фоновый сигнал неспецифического связывания с биосенсором.
- При получении стандартных кривых или анализе проб с неизвестным содержанием всегда выполняйте измерение для базовой пробы, соответствующей анализируемым пробам, но не содержащей определяемого белка. Это позволит выполнить вычитание сигнала, генерируемого вследствие неспецифического связывания с биосенсоров.
- Для получения точных результатов стандартная кривая должна генерироваться с использованием того же самого белка, количество которого будет измеряться в пробах.
- Стандарты должны разбавляться в буферной матрице, которая в точности соответствует той, что используется в пробах с неизвестным содержанием.
- Стандартные кривые можно сохранять и использовать для последующих опытов, в которых для измерений применяются биосенсоры из одной и той же производственной партии.
- Для проведения точных количественных измерений концентрации анализируемых проб должны попадать в концентрационный диапазон стандартной кривой.

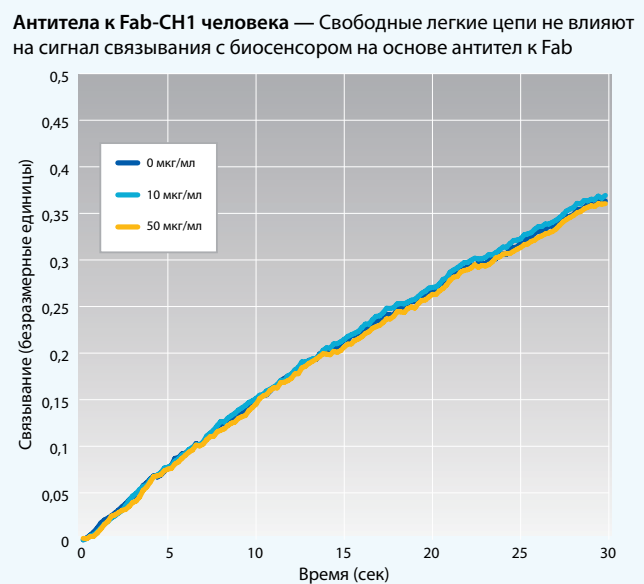
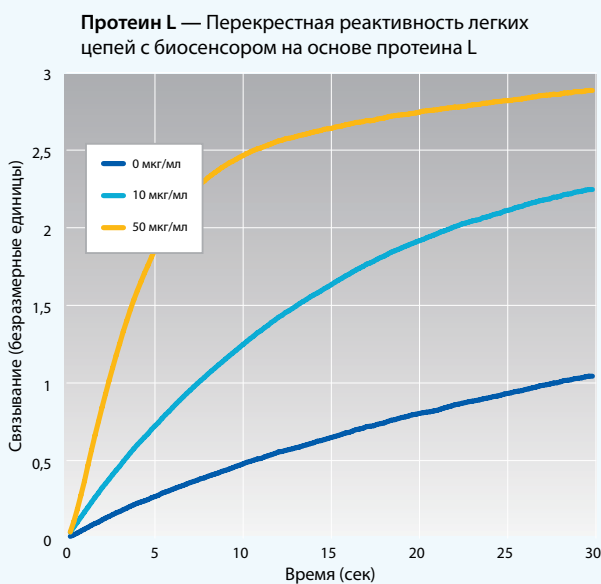
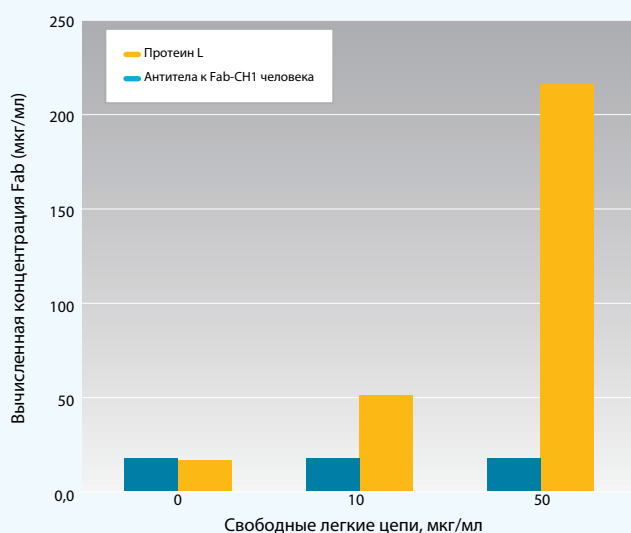


РИСУНОК 6: Влияние свободных легких каппа-цепей на количественное определение Fab-фрагментов человека с использованием биосенсоров на основе протеина L (слева) по сравнению с биосенсорами на основе антител к Fab-CH1 человека (справа). В пробы, содержащие 17 мкг/мл Fab-фрагмента человека вносились различные количества легких цепей каппа человека с последующим анализом с применением биосенсоров обоих типов. Представлены данные в реальном времени. Повышенный сигнал отклика на биосенсорах на основе протеина L означает наличие перекрестной реактивности к свободным легким цепям.



Свободные легкие цепи (мкг/мл)	Антитела к Fab-CH1 человека	Протеин L
0 мкг/мл	16,17	15,52
10 мкг/мл	16,88	50,57
50 мкг/мл	16,02	214,6

ТАБЛИЦА 2: Вычисляемые концентрации Fab

РИСУНОК 7: Повышенные скорости связывания и вычисленные концентрации с применением биосенсоров на основе протеина L пропорциональны повышению концентрации свободных легких цепей в пробах Fab, даже если концентрация Fab остается постоянной. Биосенсоры на основе антител к Fab-CH1 человека демонстрируют высокую специфичность к интактным молекулам Fab.

ВЫВОДЫ

Мы представили методики и данные, демонстрирующие количественное определение белков в системе BLItz в сочетании с широким выбором предварительно иммобилизованных биосенсоров, которые могут применяться для улучшения технологических процессов. Пригодность системы BLItz для количественного определения белков-мишеней непосредственно в сложных матрицах с использованием всего лишь 4 мкл пробы позволяет выполнять быстрые, простые и мощные анализы, что невозможно при использовании других платформ.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Краткое вводное руководство по BLItz. Текущую версию можно загрузить со страницы www.blitzmenow.com/literature.html.
- 2 Руководство по демонстрационному и начальному комплектам BLItz: содержит подробные пошаговые указания по постановке анализов с использованием начального комплекта BLItz.
- 3 Техническое примечание ForteBio 28: "Биотинилирование протеина для иммобилизации на стрептавидиновых биосенсорах" — www.fortebio.com/literature.html.
- 4 Заметка по применению ForteBio 9: "Аффинные лиганды CaptureSelect для определения и характеристики антител" www.fortebio.com/literature.html.

ЗАКАЗ СИСТЕМЫ BLITZ И КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

- Для запроса цен откройте страницу www.blitzmenow.com и щелкните [Get Quote](#).
- Список типов выпускаемых биосенсоров приведена на странице www.blitzmenow/biosensors.html.
- За технической поддержкой обратитесь по адресу fortebio_support@pall.com.

000 «Диаэм»

Москва
ул. Магаданская, 7/3
тел./факс:
(495) 745-0508
sales@dia-m.ru

Новосибирск
пр. Акад.
Лаврентьева, 6/1
тел./факс:
(383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Казань
ул. Парижской
Коммуны, д. 6
тел./факс:
(843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

С.-Петербург
ул. Профессора
Попова, 23
тел./факс:
(812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
пер. Семашко, 114
тел./факс:
(863) 250-0006
rnd@dia-m.ru

Пермь
Представитель
в УФО
тел./факс:
(342) 202-2239
perm@dia-m.ru

Воронеж
Представитель
тел./факс:
(473) 232-4412
voronezh@dia-m.ru

Армения
Представитель
тел.
094-01-01-73
armenia@dia-m.ru

www.dia-m.ru