



Моментальное определение присутствия белка с применением системы BLItz

Дэн Кинг, исследователь, Институт биохимических исследований Novartis; Уайлей Ма, старший научный сотрудник, ForteBio; Данфенг Яо, старший научный сотрудник, ForteBio; Рени Тобиас, прикладной исследователь, ForteBio

ВВЕДЕНИЕ

Часто в процессе экспрессии белка и в процессе мониторинга биотехнологического реактора драгоценное время теряется при простой проверке наличия или отсутствия белка-мишени. При анализе необработанных проб традиционные методики вроде вестерн-блота или ВЭЖХ требуют применения множества реагентов и значительного количества времени. В этом примечании по применению описано использование системы BLItz™ для моментального определения специфического белка в необработанных матрицах, позволяющее в реальном времени получать информацию в ходе разработки биотехнологического процесса и производства.

О СИСТЕМЕ BLITZ

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

БЫСТРАЯ ПРОВЕРКА ПРИСУТСТВИЯ БЕЛКА

Простое в освоении программное обеспечение BLItz Pro™ Data Analysis содержит программные модули для анализа присутствия,

количества, активности и специфичности представляющего интерес белка. Здесь мы продемонстрируем примеры успешного применения программного модуля Quick Yes/No системы BLItz в разнообразных форматах анализа. Быстрое определение наличия или отсутствия белка-мишени и относительная оценка концентрации — это простые, но важные функции, которые могут дать важную информацию на разнообразных стадиях исследований, разработки процессов и производства. Более важной представляется возможность проводить эти измерения в необработанных пробах без необходимости выполнения операций предварительной очистки, что ускоряет технологические процессы, экономя ценное время и ресурсы.

С применением модуля Quick Yes/No и одноразовых биосенсоров Dip and Read могут быть реализованы быстрые, простые и прямые методы мелкомасштабного качественного определения генно-инженерных конструкций, уровня экспрессии и активности белка. Эти методы дополняют или заменяют собой такие технологии, как ELISA, SDS-PAGE и вестерн-блот (Рисунок 1), которые требуют больших затрат труда и времени.

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ

На всех этапах биофармацевтических исследований и разработки требуется быстрый качественный анализ проб. Например, определение оптимальных секретирующих кандидатов из трансфицированных клеток CHO или выбор различных вариантов клеточных клонов гибридомы для получения моноклональных антител может требовать больших ресурсов и трудозатрат. Упрощение оценки различных условий роста, систем экспрессии и методов очистки при разработке биотехнологического процесса может облегчить оптимизацию биотехнологического производства. Кроме того, в процессе самого производства требуется постоянный контроль над уровнем экспрессии в биологических реакторах.

Детектирование белка в сложных пробах



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

Модуль Quick Yes/No системы BLITZ обеспечивает применение специфичного и быстрого метода для сравнения содержания белка в пробах. Относительное количество антител или белка-мишени в пробах можно определить, исходя из количества минут, требуемых для связывания с предварительно иммобилизованным лигандом на биосенсоре, что позволяет легко оценить количество клонов или состояние системы.

В настоящей работе мы применяем биосенсоры на основе антител к GST для определения и ранжирования в реальном времени GST-меченного белка, вносимого в кондиционированную среду для культуры клеток CHO при изменении концентрации. Биосенсор на основе антител к GST (ForteBio, номер по каталогу 18-5096) содержит высокоаффинные антитела к GST, иммобилизованные на поверхности биосенсора, что позволяет осуществлять анализ GST-содержащих аналитов без дополнительных меток даже в сложных пробах. В данном эксперименте GST-меченный убиквитин (EMD Millipore) разбавлялся в культуральной среде CD-CHO-DG44 (Aragen Biosciences) до концентраций в диапазоне от 2,5 мкг/мл до 2000 мкг/мл по три образца каждой пробы. Перед использованием биосенсоры на основе антител к GST подвергались как минимум 10-минутной гидратации в кондиционированной среде. Капля, содержащая 4 мкл каждой пробы анализировалась с использованием модуля Quick Yes/No с включенной мешалкой. Для вычисления уровня связывания по данным реального времени применялось программное обеспечение для анализа данных BLITZ Pro Data Analysis 1.1.

Биосенсор на основе антител к GST высокоспецифичным образом связывается с меткой GST на протеине-мишени для дифференциации белка-мишени и других компонентов среды, что позволяет выполнять измерения в неочищенных пробах. Для минимизации фонового сигнала в сложных растворах биосенсоры перед применением необходимо не менее 10 минут в предварительно гидратировать с использованием матрицы,

как можно более близкой к матрице пробы. Предварительная гидратация с использованием матрицы пробы в процессе анализа минимизирует сигнал от неспецифического связывания с поверхностью биосенсора.

На рисунке 2 показано связывание комплекса GST-убиквитин с биосенсорами на основе антител к GST в двенадцати пробах. Увеличение концентрации протеина-мишени в пробе ведет к повышению скорости связывания. Скорость связывания автоматически вычисляется программным обеспечением BLITZ Pro Data Analysis, что позволяет быстро оценить уровень экспрессии. В таблице 1 приводится относительный уровень экспрессии и коэффициент вариации (КВ) в процентах. Относительная величина КВ для трех образцов является низкой ($\leq 11\%$), что указывает на отличную воспроизводимость данных.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В НЕОБРАБОТАННЫХ ПРОБАХ ДЛЯ СКРИНИНГА ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Возможность предварительного скрининга разных векторов для экспрессии белка в малых масштабах позволяет быстро выявить проблемы до расширения масштабов, сэкономить время и снизить расходы, а также успешно увеличивать масштабы производства для получения большего количества белков. Чтобы определить присутствие или отсутствие экспрессированного белка в клеточной культуре, пробы обычно анализируются с использованием таких методов как ВЭЖХ, многостадийная технология ELISA или вестерн-блот, которые требуют много времени. С применением системы BLITZ, в которой используется безметочная технология BLI, определять белок-мишень можно непосредственно в необработанных и неочищенных пробах, например, в лизате клеток *E. coli*, всего за несколько секунд и с высоким уровнем чувствительности.

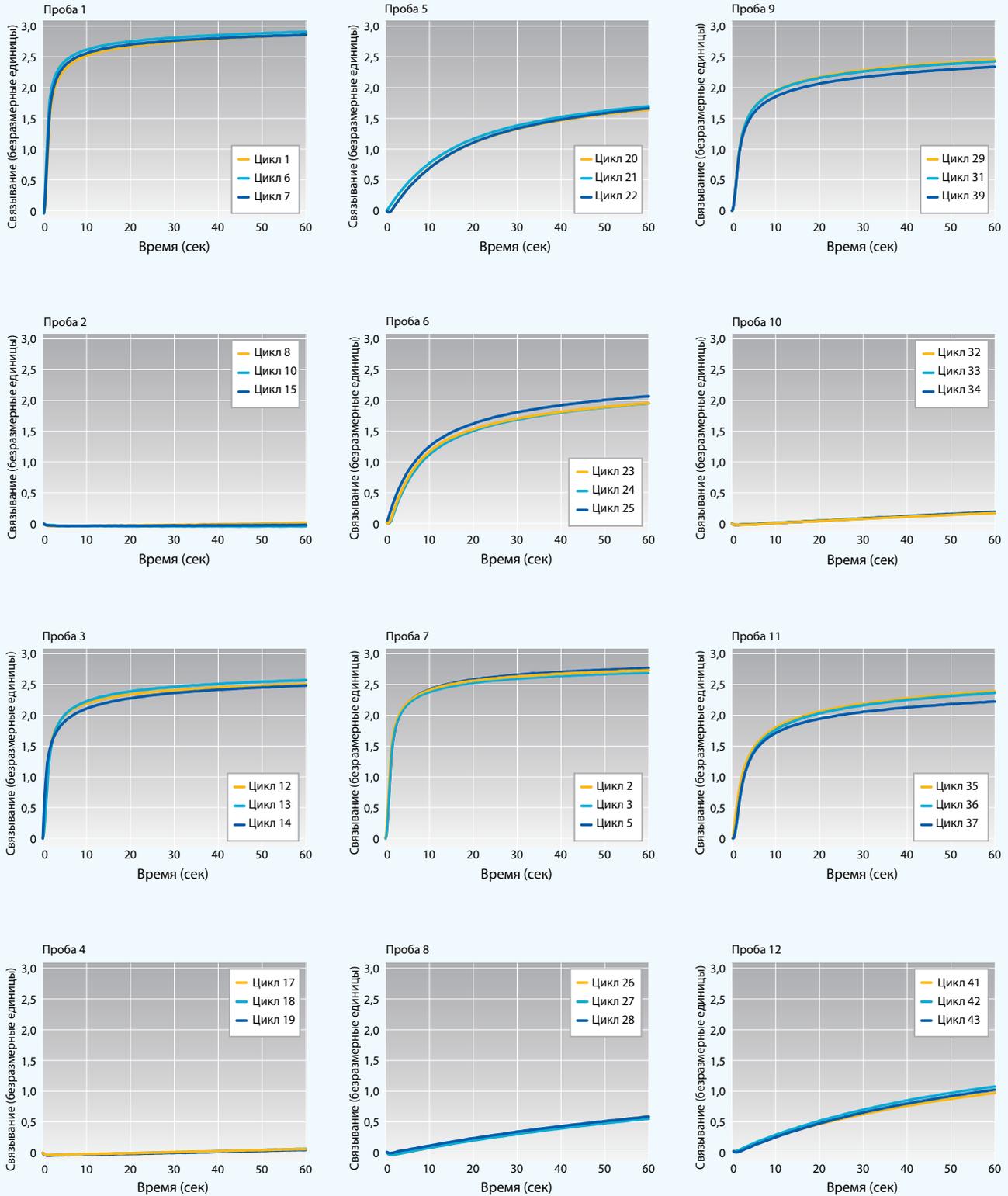


РИСУНОК 2: Кривые связывания в реальном времени для трех проб отражают детектирование относительных уровней GST-меченного убиквитина в двенадцати пробах с применением биосенсоров на основе антител к GST. Объем пробы в каждом анализе составляет 4 мкл.

Высший
уровеньНизший
уровень

Оценка	Скорость связывания	КВ,%
Проба 1	1,991	10,8%
Проба 7	1,646	2,4%
Проба 3	13,73	3,5%
Проба 9	0,864	3,2%
Проба 11	0,614	2,2%
Проба 6	0,230	3,7%
Проба 5	0,112	0,6%
Проба 12	0,031	4,3%
Проба 8	0,015	2,0%
Проба 10	0,004	4,3%
Проба 4	0,002	8,9%
Проба 2	0,000	НП

ТАБЛИЦА 1: Оценка экспрессии с использованием вычисленных скоростей связывания. Относительные коэффициенты вариации (КВ) вычислялись по результатам измерения трех проб, как показано на рисунке 2.

Перед группой очистки белков в компании Novartis, которая изучает гистонные деметилазы (HDM), стояла задача выполнения структурных исследований малого протеинового комплекса HDM. Два белка HDM совместно экспрессировались отдельными векторами в *E. coli*, причем одна из генно-инженерных конструкций содержала метку HIS. Отдельные экспрессированные фрагменты образовывали тесно связанный протеиновый комплекс. Однако визуализация растворимого лизата на геле SDS-PAGE показала малое количество или отсутствие протеинового комплекса в сравнении с нетрансформированным контролем (Рисунок 3). Доступным вариантом определения белка в слабо экспрессирующей генно-инженерной конструкции являлась очистка пропусканием через колонку ВЭЖХ с применением нескольких циклов, что потребовало бы значительных усилий и больших количеств материала. В качестве простого решения для скрининга экспрессии была применена система BLItz и биосенсоры на основе антител к пента-HIS.

Биосенсоры на основе антител к пента-HIS (ForteBio, номер по каталогу 18-5077) содержат с высокоспецифичные антитела пента-HIS производства Qiagen, предварительно иммобилизованные на поверхности биосенсора. Биосенсор обеспечивает специфичное обнаружение и количественное определение HIS-меченных белков в очищенных или частично очищенных пробах, супернатантах клеточных культур или клеточных лизатах. Связывание HIS-меченного белка с биосенсором можно отслеживать в реальном времени.

Клеточные культуры *E. coli*, содержащие генно-инженерные конструкции HDM и нетрансформированный, отрицательный контроль, выращивались и лизировались ресуспендированием в реагенте BugBuster™ (Novagen) с ингибиторами бензоназ и протеаз. После очистки центрифугированием и фильтрации общее содержание белков было нормализовано методом

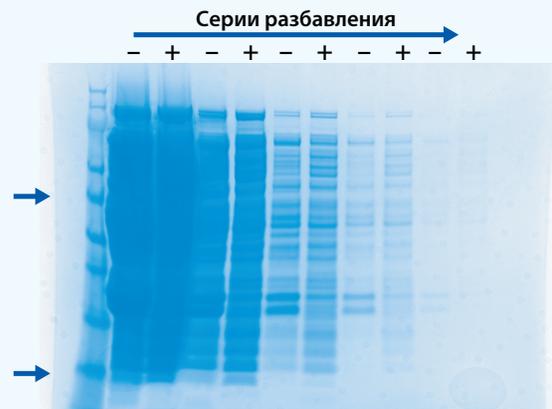


РИСУНОК 3: Анализ на геле SDS-PAGE с окрашиванием куамси фрагментов белка HDM, совместно экспрессированных *E. coli*. Растворимые лизаты из трансформированных культур (+) и отрицательного контроля (-) нормализовывались по содержанию протеина, затем последовательно разбавлялись и загружались на гель. Стрелками показана ожидаемая миграция на два фрагмента комплекса HDM. В трансформированных пробах отсутствовали явно выраженные визуализированные полосы выше уровня фона.

Брэдфорда. Затем лизаты разбавлялись в фосфатно-солевом буфере в соотношении 1:10. В систему BLItz вводились капли каждой пробы объемом 4 мкл, детектирование выполнялось с использованием модуля Quick Yes/No.

Обычно с влиянием матрицы могут быть связаны такие эффекты, как неспецифическое связывание, повышенный дрейф или помехи вследствие связывания белков с биосенсором. При измерении содержания белков в необработанных пробах, например, в комплексной среде или клеточном лизате, для подавления этих эффектов рекомендуется соответствующее разведение этих проб разбавителем для проб ForteBio (номер по каталогу 18-5028). В данном эксперименте пробы разбавлялись в соотношении 1:10, однако в зависимости от природы проб и типа применяемого биосенсора могло потребоваться разбавление с коэффициентом от 50 до 100.

На рисунке 4 представлены данные по связыванию в реальном времени для экспрессора HDM и отрицательного контроля. Положительный отклик в сравнении с отрицательным контролем давала только проба лизата, содержащая протеиновые структурные компоненты HDM, что указывало на присутствие комплекса протеина-мишени в линии совместной экспрессии. Последующий анализ с применением ВЭЖХ показал, что выход протеинового комплекса HDM из этого структурного компонента является достаточным для проведения кристаллографических исследований. В этом примере присутствие комплекса белка-мишени обнаруживалось за пять минут с применением капли пробы без необходимости очистки и с большей чувствительностью, чем у метода SDS-PAGE. Быстрое детектирование экспрессированного белка непосредственно в необработанных пробах демонстрирует, как система BLItz может сэкономить время и ресурсы при оценке генно-инженерных конструкций для увеличения масштабов производства.

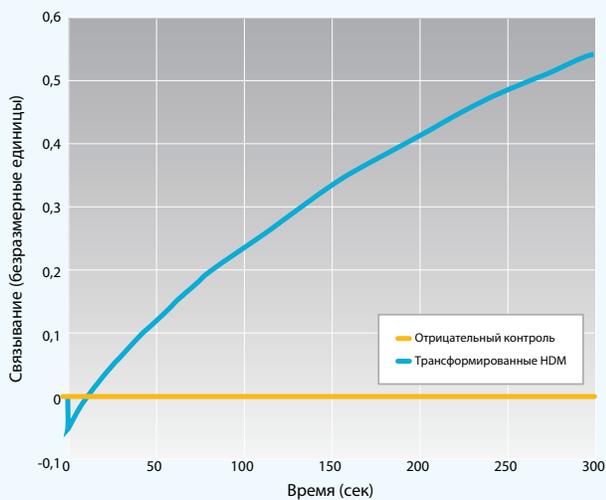


РИСУНОК 4: Данные реального времени для трансформированных и нетрансформированных лизатов отрицательного контроля *E. coli*. Растворимые лизаты нормализовывались по содержанию белка и разбавлялись в соотношении 1:10. После загрузки каплеуловителя в течение 300 секунд производилось измерение связывания в реальном времени с биосенсорами на основе антител к пента-HIS. Из данных вычитался сигнал фона, полученный с использованием пробы отрицательного контроля. Положительный сдвиг в трансформированном лизате указывал на присутствие HIS-меченного протеинового комплекса HDM.

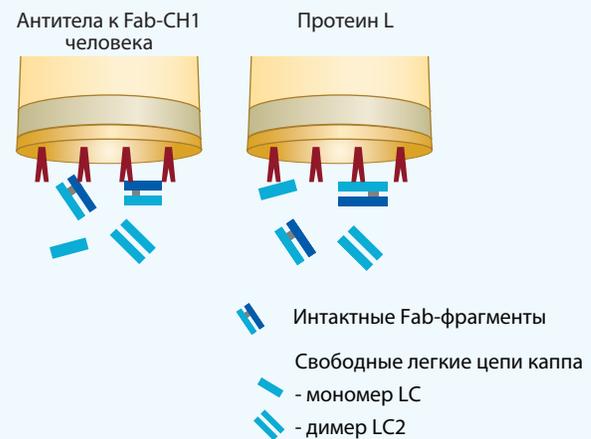


РИСУНОК 5: Селективность биосенсоров на основе антител к Fab-CH1 человека в сравнении с на основе протеина L для интактных Fab-фрагментов.

ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ FAB-ФРАГМЕНТОВ В ПРИСУТСТВИИ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ

Часто при производстве рекомбинантных IgG и Fab-фрагментов проблему может представлять чрезмерная экспрессия легких цепей. Поскольку мишенями для большинства имеющихся Fab-связывающих агентов являются эпитопы, которые находятся на легкой цепи антитела, точное количественное определение становится проблематичным вследствие перекрестного связывания лиганда с загрязняющими легкими цепями (Рисунок 5). Решить эту проблему может применение аффинного лиганда, для которого мишенью является домен CH1 на тяжелой цепи Fab-фрагмента. Недавно компания ForteBio выпустила биосенсор Dip and Read на основе антител к Fab-CH1 человека для высокоспецифичного связывания в регионе CH1 фрагментов Fab, F(ab')₂ и IgG человека. Биосенсоры на основе антител к Fab-CH1 человека не проявляют склонности к перекрестному связыванию легких цепей антител и при использовании вместе с системой BLItz предоставляют быстрый и простой метод дифференциации фрагментов Fab/F(ab')₂ и загрязняющих фрагментов легких цепей.

Для демонстрации высокого уровня специфичности биосенсоров на основе антител к Fab-CH1 человека исследовалось влияние свободных цепей на детектирование Fab-фрагментов человека. Очищенные Fab-фрагменты, полученные из цельного IgG человека (Jackson ImmunoResearch) разбавлялись до 10 мкг/мл в разбавителе для проб (ForteBio, номер по каталогу 18-5028). Также разбавитель для проб применялся для предварительного увлажнения не менее 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).

Очищенные свободные легкие цепи каппа белка Бенс-Джонса человека (Meridian Life Science) вносились в пробы Fab-фрагмента до получения конечной концентрации от 0,5 мкг/мл до 50 мкг/мл. Анализ связывания выполнялся с использованием биосенсоров на основе протеина L и на основе антител к Fab-CH1 человека с применением модуля Quick Yes/No в течение 60 секунд на пробу с включенной мешалкой.

Результаты опытов для сравнения связывания приведены на рисунках 6 и 7. На рисунке 6 показаны данные по связыванию в реальном времени проб человеческого Fab-фрагмента для биосенсоров каждого типа. Обратите внимание, что кривые связывания не менялись для биосенсоров на основе антител к Fab-CH1 человека, если сравнивать с биосенсорами на основе протеина L, для которых сигнал связывания увеличивался. Это позволяет предположить наличие совместного связывания свободных легких цепей с сенсором на основе протеина L. Сравнительный график скорости связывания для двух биосенсоров показан на рисунке 7. Эти данные явно показывают увеличение скорости связывания для биосенсоров на основе протеина L с повышением концентрации свободных легких цепей, тогда как скорость связывания для на основе антител к Fab-CH1 человека остается неизменной. Такая высокая специфичность связывания Fab-фрагментов с биосенсором на основе антител к Fab-CH1 человека делает его чрезвычайно полезным инструментом для детектирования и анализа проб Fab до стадии очистки. Для применения с системой BLItz выпускается ряд биосенсоров с высокой специфичностью, предназначенных для выполнения анализов в сложных матрицах. Например, биосенсоры на основе антител к IgG Fc мыши (ForteBio, номер по каталогу 18-5088) и на основе антител к IgG Fc человека (ForteBio, номер по каталогу 18-5060) обеспечивают селективное связывание с мышинными или человеческими IgG соответственно. Кроме того, для

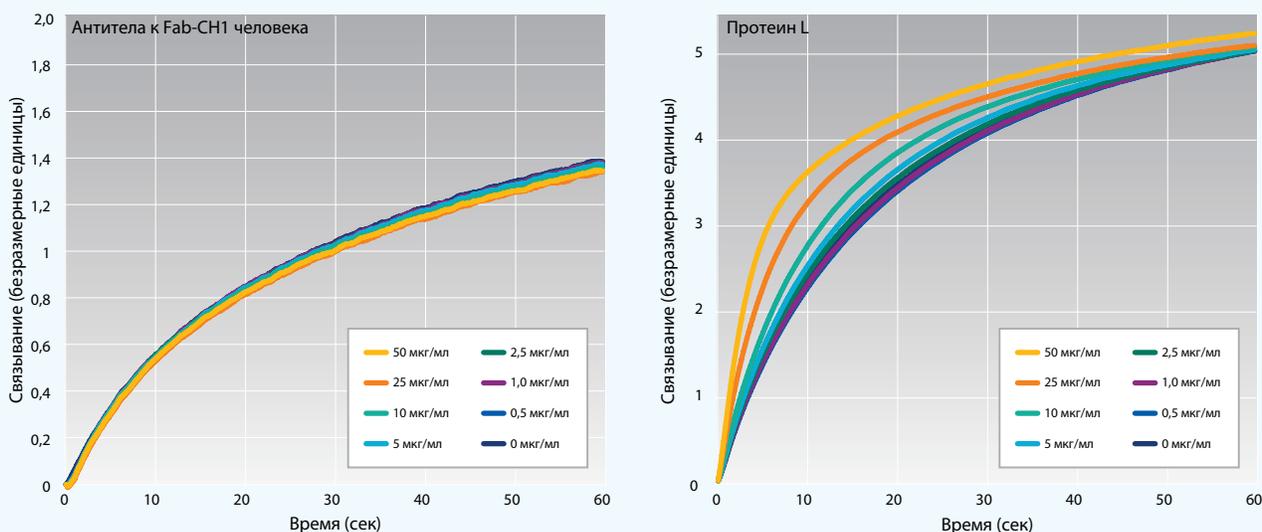


РИСУНОК 6: Влияние свободных легких цепей каппа на детектирование человеческих Fab-фрагментов с использованием биосенсоров на основе антител к Fab-CH1 человека (слева) по сравнению с биосенсорами на основе протеина L (справа). В пробы, содержащие 10 мкг/мл человеческих Fab-фрагментов, вносились различные количества человеческих легких цепей каппа с последующим анализом биосенсорами обоих типов. Показаны данные связывания в реальном времени. Повышенный сигнал отклика на биосенсорах на основе протеина L означает наличие кросс-реактивности к свободным легким цепям и следовательно то, что результаты специфических измерений концентрации Fab недостоверны.

проведения неограниченного круга анализов предусмотрены стрептавидиновые биосенсоры, которые связываются с избранными биотинилированными молекулами.

СТРЕПТАВИДИНОВЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ БИОТИНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

Биотинилирование белков — это распространенная стратегия во многих методах исследования белков, в которой используется чрезвычайно высокая аффинность взаимодействия между биотином и авидином или стрептавидином. Биотин и авидин/стрептавидин стали стандартными реагентами для широкого круга методов детектирования и иммобилизации, используемых в таких приложениях как ELISA, вестерн-блот, иммунопреципитация, аффинная очистка и проточная цитометрия. Для присоединения биотина к белкам существуют разнообразные реагенты со специфичностью к различным функциональным группам. Однако с процедурами биотинилирования могут быть связаны такие проблемы, как потеря белка, инактивация и неопределенность результата реакции присоединения (Рисунок 8).

Модуль Quick Yes/No системы BLITZ в сочетании со стрептавидиновыми биосенсорами (ForteBio, номер по каталогу 18-5019) представляет собой полезный инструмент для быстрой проверки успешности биотинилирования. Подтверждение связывания со стрептавидиновыми биосенсорами может оцениваться в считанные секунды с применением всего лишь 4 мкл реакционной смеси. Для иллюстрации этого метода моноклональные антитела IL-5 человека/мыши (R&D Systems) были биотинилированы с молярным коэффициентом связывания 1:1 (MCR) с применением биотина EZ-Link® NHS-PEG4 (Thermo Scientific). Параллельно, в качестве отрицательного контроля, исследовалась проба без биотина. Затем производилось обессоливание реакционной среды с применением

микрофентрифужных колонок Zeba (Thermo Scientific). После обессоливания концентрации каждой пробы определялись спектрофотометрически и нормализовывались с применением фосфатно-солевого буфера. Стрептавидиновые биосенсоры предварительно, не менее 10 минут увлажнялись разбавителем для проб. Затем пробы биотинилированного IL-5 mAb разбавлялись до 100 мкг/мл разбавителем для проб.

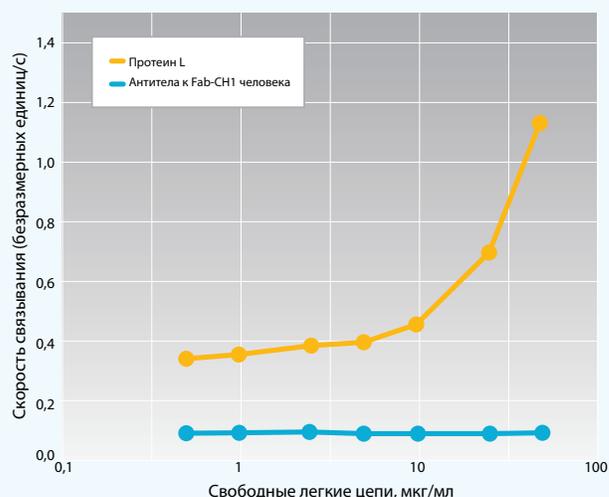


РИСУНОК 7: Влияние свободных легких цепей каппа на детектирование человеческих Fab-фрагментов с использованием биосенсоров на основе антител к Fab-CH1 человека по сравнению с биосенсорами на основе протеина L. В пробы, содержащие 10 мкг/мл человеческих Fab-фрагментов, вносились различные количества человеческих легких цепей каппа с последующим анализом биосенсорами обоих типов. Повышенный сигнал отклика на биосенсорах на основе протеина L означает наличие перекрестной реактивности к свободным легким цепям.

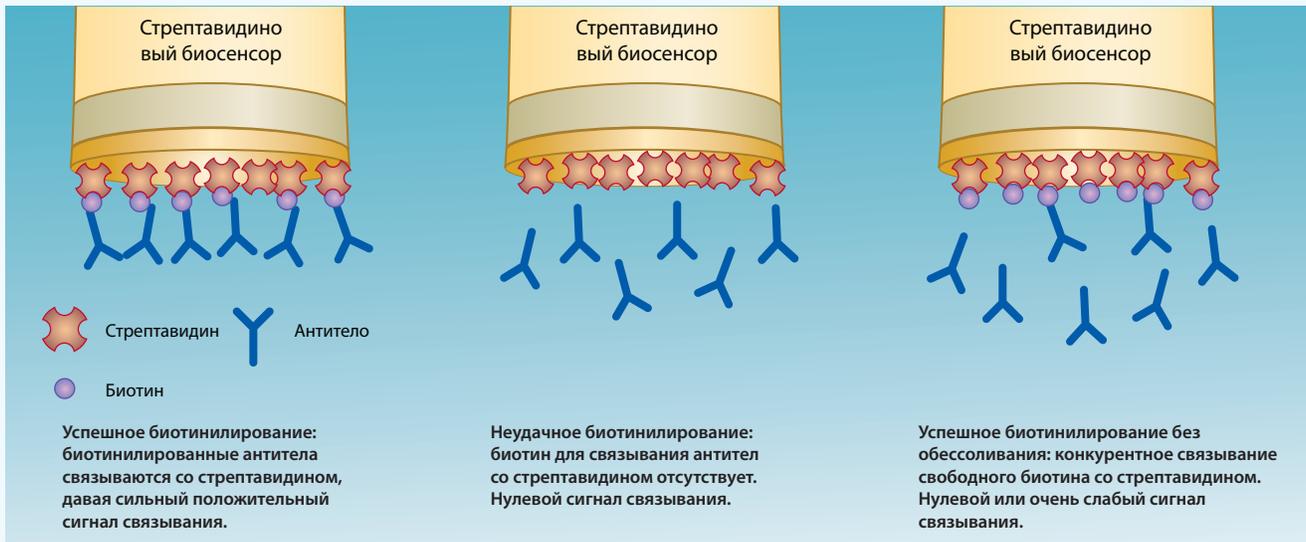


РИСУНОК 8: Применяйте стрептавидиновые биосенсоры и модуль Quick Yes/No для подтверждения успешной реакции биосопряжения. Биотинилирование антител используется для иллюстрации трех возможных сценариев: успешное биотинилирование и обессоливание, неудачное биотинилирование или успешное биотинилирование без обессоливания. Сильный сигнал связывания наблюдается только при успешном биотинилировании с последующим эффективным обессоливанием для устранения несвязанного биотина.

Загрузка стрептавидиновых биосенсоров выполнялась с использованием 4 мкл каждой пробы с перемешиванием в течение 30 секунд.

Рисунок 9 представляет данные реального времени по загрузке стрептавидиновых биосенсоров биотинилированными пробами IL-5 mAb. Пробы без биотина не дали обнаруживаемого сигнала связывания. Напротив, биотинилированные пробы

дали сильный сигнал связывания, продемонстрировав возможность быстрого подтверждения успешности реакции присоединения.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА НА ПРИСУТСТВИЕ БЕЛКА QUICK YES/NO

- Перед проведением анализа необходимо предварительно очистить клеточные лизаты или супернатанты от нерастворимых примесей.
- Разбавляйте необработанные пробы, например, клеточные лизаты должным образом, чтобы уменьшить влияние матрицы. Рекомендации по разбавлению зависят от типа применяемого биосенсора и приведены в технических примечаниях заметках по соответствующему биосенсору (fortebio.com/literature.html).
- Выполняйте предварительное гидратирование биосенсоров не менее 10 минут в буферной матрице, в точности соответствующей анализируемой пробе. Это минимизирует фоновый сигнал неспецифического связывания с поверхностью биосенсора.
- Выполните анализ пробы отрицательного контроля с матрицей, соответствующей анализируемым пробам, но не содержащей определяемого белка. Это позволит выполнить вычитание сигнала, генерируемого вследствие неспецифического связывания с поверхностью биосенсора.

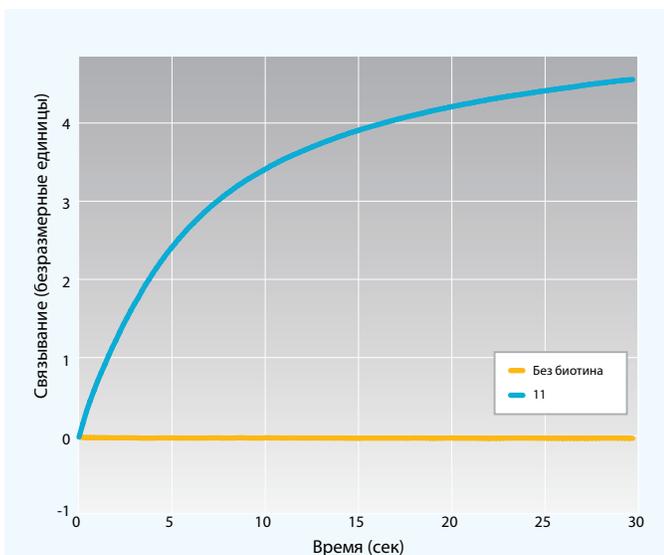


РИСУНОК 9: Влияние биотинилирования на связывание со стрептавидиновыми биосенсорами. Моноклональные антитела IL-5 биотинилировались с использованием молярного коэффициента связывания 1:1. Пробы с нулевым уровнем биотина не давали сигнала, однако привитые пробы давали сильный сигнал связывания.

ВЫВОДЫ

Мы продемонстрировали различные методики, в которых применение модуля Quick Yes/No в системе BLItz в сочетании с широким выбором предварительно иммобилизованных биосенсоров может применяться для улучшения технологических процессов. Пригодность системы BLItz для качественного 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 Техническое примечание 10: "Периодический процесс иммобилизации биотинилированного лиганда на стрептавидиновых биосенсорах" — www.fortebio.com/literature.html.
- 5 Техническое примечание ForteBio 11: "Биотинилирование штаммах антител, содержащих протеин-носитель" — www.fortebio.com/literature.html.

ЗАКАЗ СИСТЕМЫ BLITZ И КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

- Для запроса цен откройте 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.

ООО «Диаэм»

www.dia-m.ru

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