



sartorius

蛋白

抗體

處理時間過長嗎？

讓Sartorius來幫助你！！

擺脫傳統離心過濾方式，讓矽藻微珠加速處理流程

撰文：馮芝昕

近年來在精準醫療的盛行下，個人化醫療及標靶治療的發展可以說是如火如荼的展開。這樣的發展主要是為了準確地了解疾病的發生與進展，並有效地探究疾病因果，結合醫學相關研究及跨領域科技，讓疾病預防與診療能夠更為精確。而其中的大分子藥物市場更是急遽地成長。

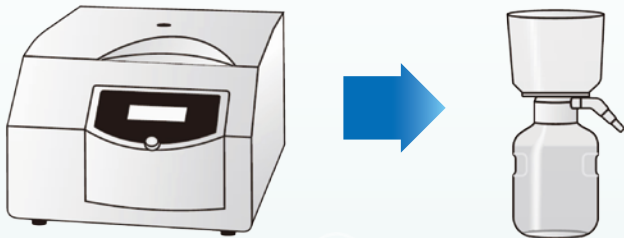
大分子藥物又稱為生物製劑(Biologics)或蛋白質藥(Protein Drug)，是以微生物、植物及動物細胞等製造出產品，可治療體內因缺乏特定蛋白質而衍生出的疾病。第一個生物製劑於1921年研究出來，是利用狗的胰臟分離出胰島素並用以治療先天性糖尿病。1973年由Herbert Boyer和Stanley Cohen研發出DNA重組技術，將人類基因插至細菌基因中，藉由細菌快速繁殖之特性，提供大量重組蛋白之技術。1984年才發展出製造單株抗體的能力。

由於蛋白藥具有專一辨識性，在治療上較不會有急性免疫反應的問題，因此現今單株抗體已做為不同疾病的主要治療方式之一，例如貧血、各類癌症及自體免疫疾病。單株抗體之成本又較一般小分子藥物來的高，因此目前多以增加產量來降低成本。然而增加產量就表示細胞之數量要增加，產物外的干擾物質也隨之增加；而在收集蛋白質時，完全去除蛋白產物之外的干擾物質是十分必要的步驟。

以前在收集細胞產物，需先使用離心將高密度或大尺寸的顆粒去除，再使用0.22 um之濾膜做除菌的動作。但在大量樣品下，如此的處理方式會導致時間拉長(圖一)，並增加時間及金錢成本。為減少樣品處理時間的問題，德國Sartorius推出Sartorius Sartoclear產品，其中含有矽藻微珠 (Diatomaceous Earth, DE)作為助濾器來完善的解決此問題。

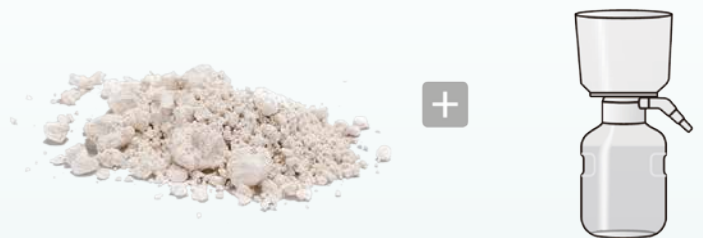
此產品只需將矽藻微珠加入樣品中充分混勻後，直接過濾即可(無需離心)，此法是利用矽藻微珠中的微小孔徑來幫助細胞樣品中的蛋白質通過(如圖一)。矽藻微珠是一種生物化學沉積岩；由矽藻的細胞壁沉積而成；呈現淡黃色或淺灰色，質地軟而輕，可輕易的磨成粉末；密度低、多孔隙、有粗糙感，有極強的吸水性，其孔隙約為Micron大小，矽藻微珠在過濾時可利用本身微小孔徑製造出一條通道幫助蛋白質或抗體通過，而避免細胞或大碎片直接阻塞濾膜之上，間接影響流速。

傳統處理法(Two steps) :

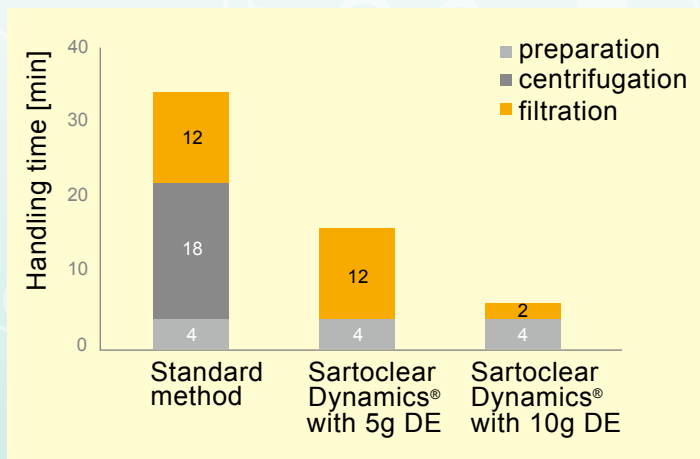


先離心後過濾(約34分鐘)

Sartoclear處理法(One steps) :



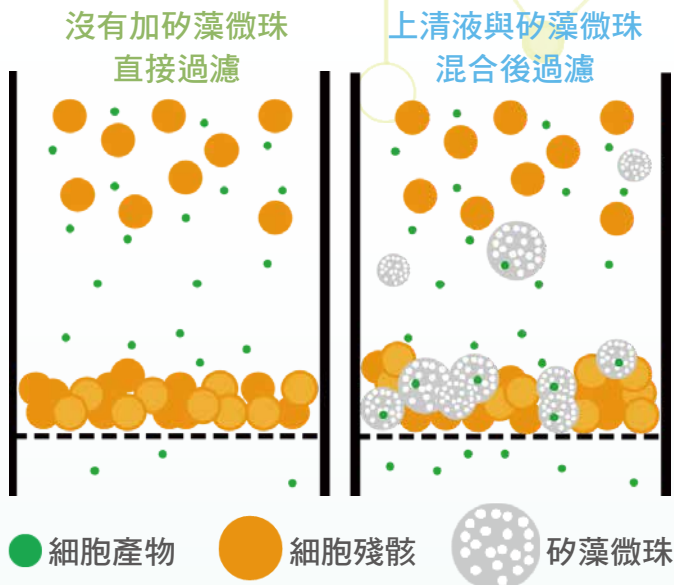
上清液混合矽藻微珠直接過濾(約6分鐘)



圖一、比較傳統處理法及Sartoclear處理法的處理時間。圖左為傳統先離心後過濾之方法，所花費的時間約需34分鐘；圖右是使用Sartoclear處理之方法，只需將上清液與矽藻微珠混勻後直接過濾即可(無需離心)，所花費的時間約6-16分鐘。與傳統處理法相比可節省一半以上的時間。

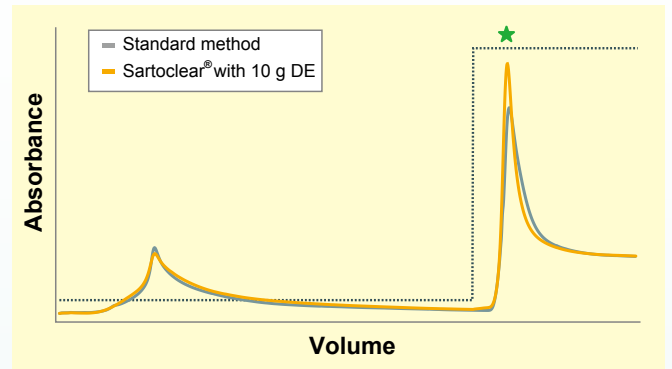
利用矽藻微珠幫助樣品過濾可大大的減少過濾時間(圖二)，亦可以防止濾膜堵塞的問題。而經研究證實矽藻微珠本身惰性極強，不會與蛋白質產生反應，所以蛋白產物總量並不會因此受到改變。

Sartorius亦做過測試，在使用矽藻微珠處理並純化後，使用層析法(Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)來測試蛋白質特性，利用矽藻微珠過濾處理的樣品與過濾離心處理的樣品，其蛋白質特性是相同的，證實蛋白質並不會受到矽藻微珠的影響(圖三)。

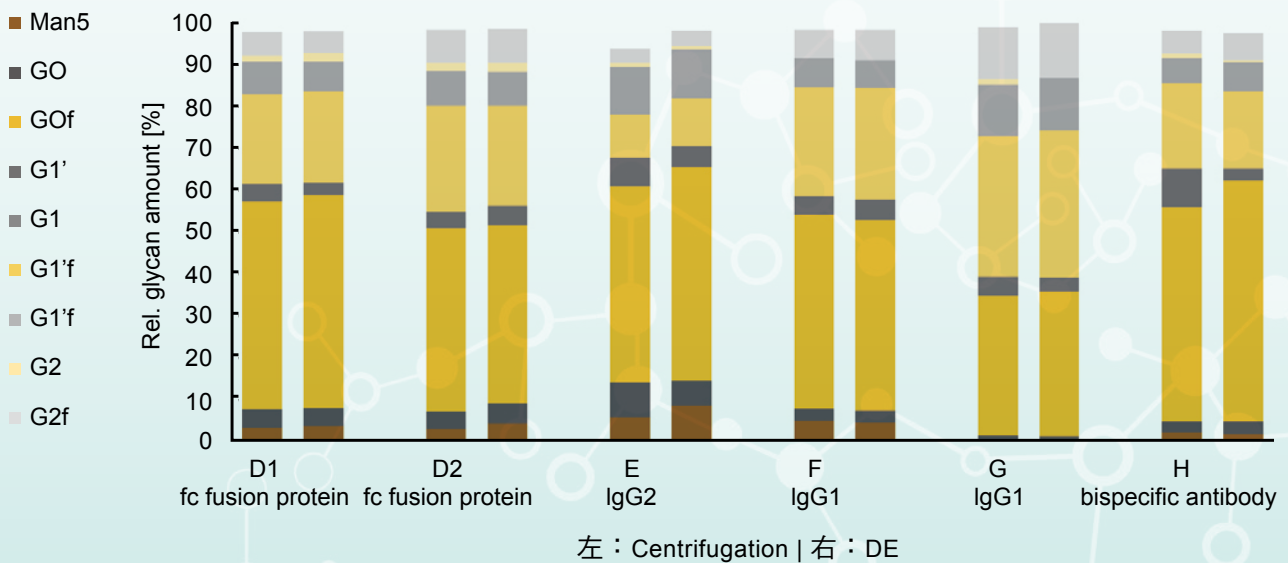


▲ 圖二、將細胞上清液與矽藻微珠混合後過濾之示意圖。矽藻微珠與上清液混合後可防止細胞殘骸在濾膜上形成屏障(如圖左)；又矽藻微珠中有微小之孔徑，可以幫助細胞產物通過細胞殘骸進而通過濾膜。

除了使用IMAC來確定蛋白質不受影響外，還檢測抗體產物上的Glycan Pattern的相對量(圖四)，從數據上來看，只有在少數情況下會觀察到離心過濾與矽藻微珠過濾的差異，因此可由此證明糖基化的組成不受矽藻微珠之影響。



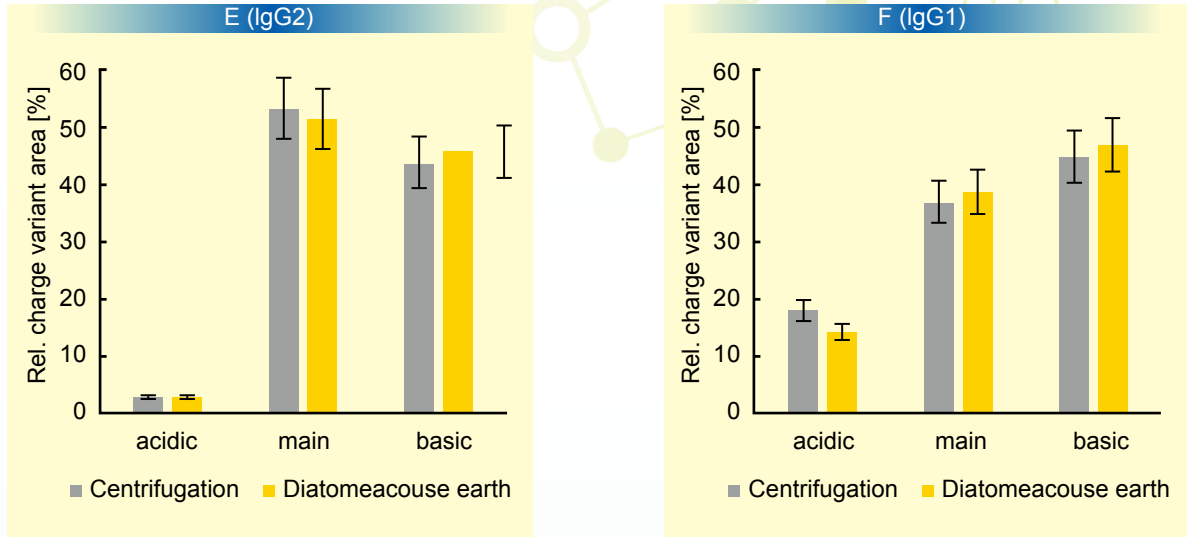
▲ 圖三、利用IMAC來檢測離心過濾處理的樣品及矽藻微珠處理的樣品之蛋白質含量。



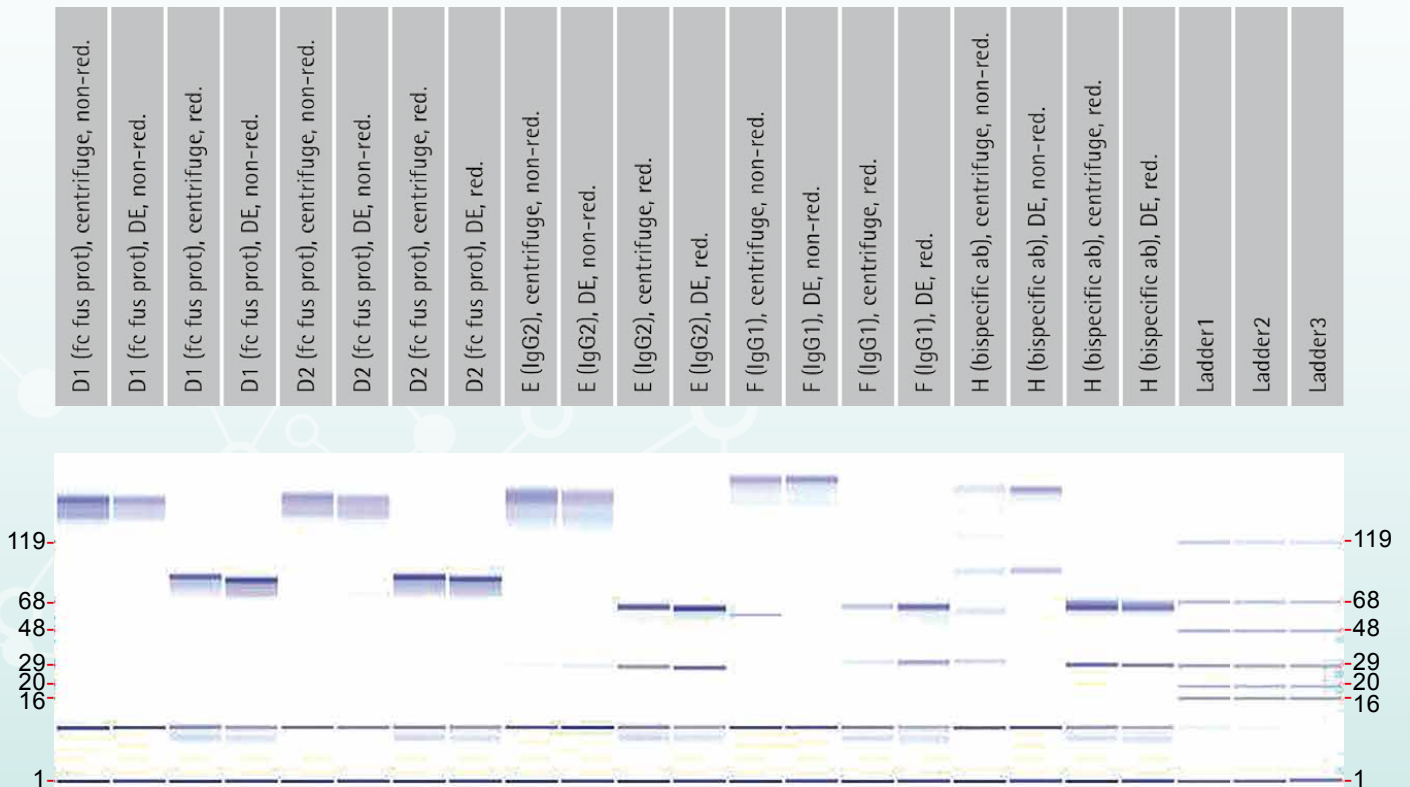
▲ 圖四、測量抗體產物上的Glycan Pattern的相對量，測試類型分別為 Man5, GO, GOf, G1', G1, G1'f, G1f, G2, G2f，結果顯示兩者糖基化反應相似。

另外，對於蛋白質或抗體來說，其帶電荷量對於其特性也是一個關鍵影響蛋白質品質的因素，因此也測量了帶電荷是否有受到影響。從數據上看並未發現不同的處理樣品方式會對帶電荷產生影響(圖五)。

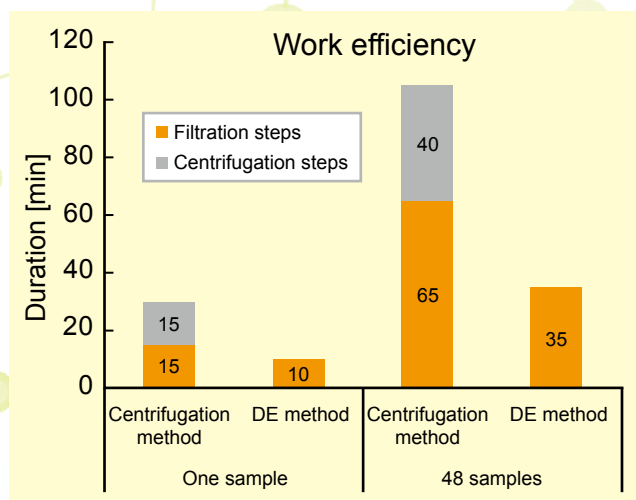
當然，也檢測了抗體的分子量大小，從SDS-PAGE中可以看出抗體的分子量大小是沒有受到影響的(圖六)。



▲ 圖五、測量不同抗體使用不同方式處理是否會影響其帶電荷性質，從數據上看是不會影響到帶電荷性質。



▲ 圖六、檢測不同抗體的分子量大小是否會受到不同處理方式的影響。結果證實分子量大小並不會受到影響。



利用矽藻微珠來增加過濾的效率並不算是新技術，在釀酒廠及飲料工廠為避免大顆粒雜質影響過濾，也會使用矽藻微珠來加強過濾效率，但最近Sartorius將此概念應用於生物製程中。使用矽藻微珠過濾的方式可以大大降低處理樣品的時間，節省許多隱形的時間及金錢成本(圖七)。

由於目前精準醫療的蓬勃發展，抗體藥或蛋白藥的需求也隨之上升，而在這技術飛升的時代，花時間在樣品處理是非常不符合效益的事情。Sartorius幫您節省樣品處理的時間，讓您能更輕鬆獲得蛋白及抗體！

▲ 圖七、利用離心過濾及矽藻微珠過濾分別所花費的時間，從圖表中可看出使用矽藻微珠過濾可節省60%工作時間。

產品資訊：

Volume	Cell density		
	< 5 million cells/mL	5–10 million cells/mL	10–20 million cells/mL
50 – 150 mL	SDLV-0150-02C--E		SDLV-0150-05C--2
150 – 250 mL	SDLV-0250-05C--2		SDLV-0250-10C--2
250 – 500 mL	SDLV-0500-05C--2	SDLV-0500-10C--2	SDLV-0500-20C--E
500 – 1,000 mL	SDLV-1000-10C--2	SDLV-1000-20C--E	SDLV-1000-40C--E

★ 對於細胞密度較高的樣品(大於1毫升中含有1000萬顆細胞)，建議使用Sartorius RF裝置，以便過濾更高體積的溶液，此裝置有更大的過濾面積及矽藻微珠可加速過濾速度。

小體積試用：Sartoclear Dynamics® Lab P15：可處理15毫升之樣品。貨號：SDLP—0015----C

參考資料：

1. John Cashman(2017). Reducing sample preparation time from Sf9 insect cultures by using Sartoclear Dynamics® Lab. (Sartorius Application note)
2. Micael Grauf et al. (2018) Simplified Small-Scale Harvest of CHO Cells for mAb Analytics. GEN vol.38, NO.5.