

© Tatiana Stepeleva-Adobe Stock

Antikörperreinigung mit Glasmonolithen

Vereinfachung von Affinitätstrennungen mit HPLC-Systemen

Franziska Scherz¹, Ulrike Krop², Kate Monks², Michael G. Weller¹

Druckstabile Glasmonolithen ermöglichen eine schnelle und unkomplizierte Reinigung von Antikörpern, z.B. aus Serum oder Zellkulturüberständen. Die sehr gute Regenerierbarkeit lässt eine lange Lebensdauer der Säulen erwarten, was die Kosten pro Probe niedrig hält.

Trennmethode auf Basis biochemischer Interaktionen gelten als effizient und selektiv. Eine besonders häufig angewendete Affinitätstrennung für Antikörper ist die Protein-A-Chromatographie. Protein A ist ein bakterielles Zellwandprotein von *Staphylococcus aureus* mit einer spezifischen Affinität zur F_c-Region von Immunglobulinen der Klasse G (IgG). Die Bindungsaffinität zwischen dem Protein A und dem Antikörper ist stark pH-abhängig. Während die Antikörper in neutraler oder leicht alkalischer Lösung an das Protein A binden und somit an der festen Phase immobilisiert werden, können die Matrixkomponenten die Säule ungehindert passieren. Anschließend lassen sich die Immunglobuline bei niedrigerem pH-Wert gut eluieren. Da IgG der am häufigsten diagnostisch und therapeutisch eingesetzte Antikörpertyp ist, ist

die Protein-A-Methode das heute mit Abstand wichtigste Verfahren der selektiven Antikörperreinigung. Auch im Labormaßstab finden affinitätschromatographische Methoden vielfältige Anwendung.

Als Carrier-Material für die Protein-A-Chromatographie wird häufig ein Gel aus quervernetzter Agarose in Form kleiner, poröser Kügelchen verwendet. Dieses Material ist geeignet für viele biochemische Methoden, da es nur geringe unspezifische Interaktionen mit Proteinen zeigt. Ein Nachteil des Materials liegt jedoch in der geringen Druckstabilität, die eine sichere und schnelle Anwendung schwierig macht. Ein weiteres Problem ist die langsame Diffusion der Proteine in die relativ großen Kügelchen, was zu breiten Peaks und langen Spül- und



Abb. 1: Monolithen aus Borosilikat-Glas.

Regenerationszeiten führt. Da nur geringe Flussraten verwendet werden können, sind die Zykluszeiten vergleichsweise lang und der Durchsatz gering.

Monolithische Materialien

Die meisten monolithischen Materialien wurden auf der Basis von Silica oder Polymeren [1] entwickelt. Beide Wege sind aber in der Produktion relativ schwierig zu kontrollieren. Polymerbasierte Monolithen zeigten zwar vielversprechende Ansätze, konnten sich aber bisher nicht auf breiter Ebene durchsetzen. Um die Schwachstellen der älteren Systeme zu überwinden, wurde eine Affinitätssäule mit immobilisiertem Protein A entwickelt, die auf einem chemisch inerten und sehr stabilen Borosilikat-Glasmonolithen als stationärer Phase basiert. Diese Monolithen werden durch Sintern von Glaspartikeln einheitlicher Größe erhalten und verfügen über eine enge Porenverteilung. Der Vorteil eines Monolithen liegt in der außerordentlichen mechanischen Stabilität. Durch die Verwendung von Borosilikat-Glas wird außerdem eine hohe chemische Beständigkeit des Trägers erreicht. Die spezielle

Porengometrie führt zu deutlich niedrigeren Gegendrücken als die Partikelgröße erwarten lässt. Dies ermöglicht relativ hohe Flussraten und damit sehr kurze Trennzeiten. Das führt wiederum zu scharfen Peaks und einer erhöhten Antikörperkonzentration in der eluierten Fraktion. Dies macht eine anschließende Aufkonzentrierung der gereinigten Antikörper meist überflüssig, was eine weitere Arbeits-, Kosten- und Zeitersparnis ergibt.

Glasmonolithen verfügen ebenso wie die Sepharose-basierten Materialien über eine sehr hydrophile Oberfläche, die unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen minimiert. Zudem können die Monolithen wie alle auf Silikat basierenden Materialien über einen Silan-Linker einfach modifiziert werden und das Zielprotein kovalent an der Oberfläche fixiert werden. Dadurch wird ein unerwünschtes Auslaugen (*Leaching*) des Bindemoleküls (z. B. Protein A) minimiert. Auch ist eine Reinigung der Säulen mit vielen verschiedenen Waschlösungen möglich, um eine Verschleppung (*Carryover*) von Verunreinigungen zu vermeiden.

Schnelle Reinigung von Antikörpern

Für viele Zwecke müssen Antikörper in Reinform vorliegen. Für die Herstellung von Konjugaten mit Fluoreszenzfarbstoffen, Nanopartikeln, Enzymen und anderen *Labels* ist meist eine Vorreinigung der Antikörper unabdingbar. So sind in Serum und Plasma neben IgG auch zahlreiche andere Proteine und Begleitstoffe vorhanden, die abgetrennt werden müssen. Auch kommerziell vertriebene Antikörper enthalten oft Konservierungsstoffe, Stabilisatoren oder störende Puffersub-

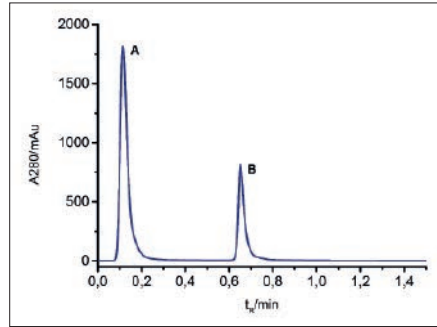


Abb. 2: Isolierung von IgG aus Humanserum. A: Begleitproteine, B: IgG. Das Reinprodukt eluiert schon nach weniger als einer Minute. Puffer 1: 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4; Puffer 2: 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.15 mol/L NaCl, mit H_3PO_4 auf pH 2.2 eingestellt; Flussrate 5 mL/min.

stanzen [2]. Die Glasmonolithen wurden hier für die Protein-A-Affinitätschromatographie eingesetzt. Antikörper aus 100 μL humanem Serum wurden mit der monolithischen Säule bei einer Flussrate von 5 mL/min und einer Gesamtlaufzeit von 1.5 Minuten aufgereinigt. Ein Chromatogramm ist in Abbildung 2 gezeigt. Peak A zeigt die durchlaufenden, ungebundenen Proteine. Die Antikörper werden mit einem sauren Puffer (pH = 2.2) eluiert (Peak B) und anschließend neutralisiert. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zeigt nur sehr geringe Verunreinigungen in der Antikörperfraktion. Die Säule konnte bereits mehr als 200 Mal regeneriert werden, ohne dass Einbußen an Qualität und Quantität erkennbar wurden. Dies spricht für eine außerordentliche Haltbarkeit und Robustheit der Säule. Die monolithischen Säulen lassen sich aufgrund

ihrer Druck- und Flussstabilität leicht in jede HPLC-Anlage integrieren und damit auch sehr einfach mittels Autosampler und Fraktionssammler automatisieren. Auch eine Umkehrung des Flusses ist für bestimmte Säulenschaltungen risikolos möglich, da die Säulen weitgehend symmetrisch aufgebaut sind und keine Fritten enthalten.

Fazit

Die Reinigung von Antikörper-Präparationen ist eine häufige Aufgabe in biochemischen Forschungslaboratorien. Deshalb sind effizientere Methoden zur Antikörperreinigung sehr wünschenswert. Die Anwendung von Glasmonolithen ermöglicht die schnelle, automatisierte Isolierung von Immunglobulinen (IgG) auf günstigen HPLC-Systemen. Aufgrund der hervorragenden Regenerierbarkeit und Haltbarkeit der Affinitätsäulen sind die laufenden Kosten gering.

Zugehörigkeiten

¹Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlin

²Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin

KONTAKT |

Dr. Michael G. Weller
 Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)
 Fachbereich 1.5 Proteinanalytik
 Berlin, Deutschland
 michael.weller@bam.de