

遇见 Lil' Tuna：自动化、高通量的台式缓冲液置换和浓缩系统

简介

在发现和开发候选分子的整个过程中，蛋白研究人员的每一个阶段都离不开缓冲液置换（buffer exchange, BX）和浓缩这两个步骤。从纯化、功能检测到制剂筛选，BX 始终是工作流程里的一环。而传统方法要么会引入变异性、需要大量手工操作和准备，要么一次只能处理一个样品。这样一来，尤其是在需要同时处理大量候选分子和多种条件时，常规样品前处理很容易就成了一大瓶颈。

Lil' Tuna 把基于板的 BX 和浓缩搬上了台式仪器并实现自动化：科研人员不用动手，就能对 1–96 个样品进行过程控制，蛋白回收率优于 96% (图 1)。它采用高通量、并行处理，能在更短的时间里运行更多样品；因此无论是预制剂或制剂筛选、稳定性测试和可开发性研究，还是在分析检测前降低样品前处理的变异性，用它来做都很合适。仪器体积小、软件好上手，单机使用很简便；同时凭借开放的 API 和易于获取的板式耗材，它也能方便地与其他自动化方案集成。



图 1：Lil' Tuna 是一台基于板的台式缓冲液置换系统，既能用于自动化就绪（automation-ready）的工作流程，也能独立（stand-alone）使用。

为了让缓冲液置换过程更快、更省人工、更一致，Lil' Tuna 采用了基于压力的超滤/透析过滤（图 2）^{①-③}。每次运行时，它先用超声传感器测出每个孔里的体积；接着把样品降入一个腔室，一边用空气加压、一边振摇，把滤液从孔底的膜挤出去——这样流速又快又均匀，还能防止物质在膜界面上堆积，也就是膜污染。压力加混合的这套组合，还降低了过程相关聚集的风险。之后，它会再测一次体积、加入新的缓冲液，并根据移除了多少液体自动调整循环时间。由于每一步的截留液量都是已知的，只要调整循环时长，就能实时优化和控制整个过程。如此循环往复，直到样品达到目标置换百分比和体积，最后还可以选做一步浓缩。操作起来很简单：设好目标置换率、最终体积和样品格式，人就能走开——剩下的交给 Lil' Tuna。

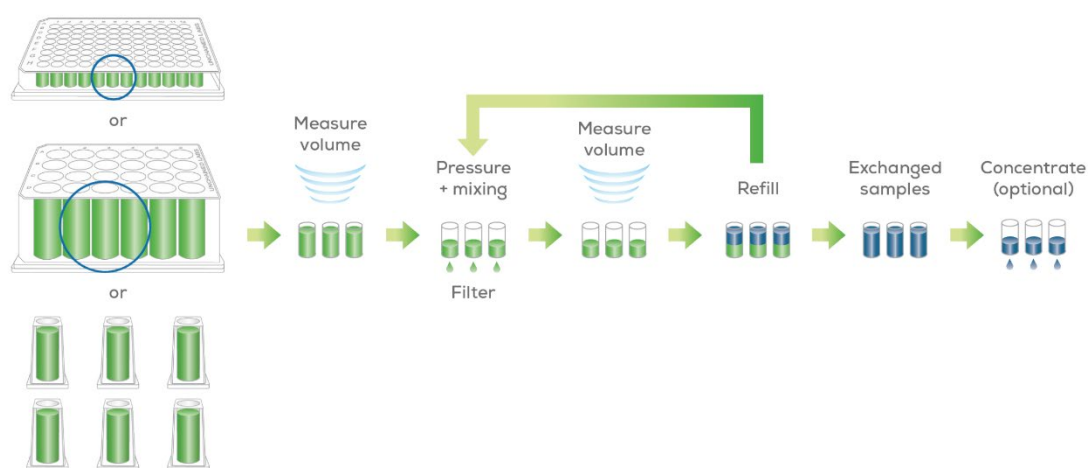


图 2：超声传感器测一次样品体积；接着在轻柔混合下加压，把滤液排走，从而避免死端过滤（dead-end filtration）和膜污染。然后再测一次体积，Lil' Tuna 用您的置换缓冲液把每个孔重新注满。这样循环下去，直到样品达到目标置换百分比和体积。

同一套自动化 UF/DF 流程在各种耗材上都能跑，所以您可以按需求给 Lil' Tuna 调整规模。做大规模筛选时用 Unfilter 96，可在一块 SBS 板里处理 96 个样品，每孔体积 100–450 μL （图 3A）。Unfilter 24 同样是 SBS 板，至多装 24 个样品，每个 0.45–8 mL（图 3B）。规模更小时，就一次运行 1–6 个 Una 管，每个装 0.45–8 mL 样品（图 3C）。

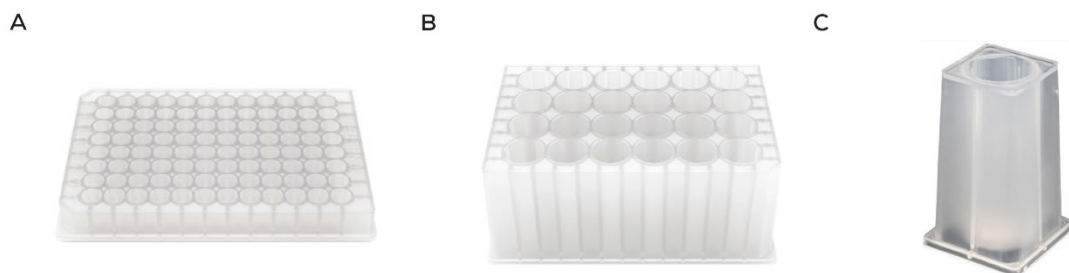


图 3: Lil' Tuna 的耗材可按您的需求选择。Unfilter 96 (A) 至多能处理 96 个 100—450 μ L 的样品; Unfilter 24 (B) 至多处理 24 个 0.45—8 mL 的样品; Una (C) 一次运行 1—6 个样品, 体积范围和 Unfilter 24 一样。

Una 和 Unfilter 的膜有 10、30、100 kDa 三种分子量截留可选, Unfilter 96 还多一种 3 kDa。膜用再生纤维素做成, 蛋白相互作用小, 能把置换收率保持在较高水平。如果您的样品和聚醚砜材料更合得来, Una 还有 30 和 100 kDa MWCO 的聚醚砜膜可选。有了这一系列耗材, 您就能按样品的体积、通量、粒径和化学性质找到合适的搭配, 同时把样品回收率做到 $\geq 96\%$ 。

在这篇应用文章里, 您会看到在 Unfilter 24 和 96 上, Lil' Tuna 能把蛋白和抗体的置换百分比、浓度、体积都做到精确的目标值, 回收率高, 同时还保住了样品质量。

方 法

用含 0.9% NaCl 的水溶液把人源 IgG 复溶到 0.1、1、10 mg/mL 三个浓度; 用磷酸盐缓冲液把牛血清白蛋白复溶到 10mg/mL。再把各实验指定的蛋白和体积, 加进预润湿好的再生纤维素膜耗材——30 kDa MWCO Unfilter 24、10 kDa MWCO Unfilter 96 或 30 kDa MWCO Unfilter 96, 缓冲液置换进 PBS。

缓冲液置换的实验设置, 用的是针对 0.5—50 mg/mL 浓度蛋白的默认参数: 每个循环移除 66% 体积、700 rpm 振摇、目标置换率 96%。置换前后的蛋白浓度和粒径都在 Stunner 上测, 配缓冲液空白 (buffer blank), IgG 的 E1% 取 13.7、BSA 取 6.67。总运行时间和初、终体积都做了测量, 置换百分比由 Lil' Tuna 算出。

粒径结果均在 Stunner 上用动态光散射采集。缓冲液黏度用系统默认值——PBS

取 0.92 cP、0.9% NaCl 取 0.905 cP，两者的折射率都取 25 °C 下的 1.334。
Stunner 采集并报告的是 144° 散射角下的 Z 平均粒径。

回收率百分比由两组数据算出：Lil’ Tuna 测的初、终体积，再加上 Stunner 测的初、终浓度，代入下面的公式：

$$\% recovery = \frac{final\ volume \times final\ concentration}{initial\ volume \times initial\ concentration} \times 100$$

(即：% recovery = (最终体积 × 最终浓度) ÷ (初始体积 × 初始浓度) × 100)

结 果

在如今高通量蛋白生产流程里,手动去除洗脱缓冲液、或者搭建制剂稳定性研究,都是耗费大量精力的一道瓶颈。Lil’ Tuna 用 Unfilter 96 解决了这件事：一次就能在 100–450 μL 的体积里，对多达 96 个样品做置换和浓缩。我们把一份 10 mg/mL 的 BSA 母液，在 Unfilter 96 的所有孔里缓冲液置换进 PBS。结果最终注入体积和置换率都很准,与目标值相差不到 4%,回收率还超过了目标 (表 1)；96 个孔里有 95 个的回收率≥96%。置换前后，BSA 样品的 Z 平均粒径也很相近。

	Initial	Target	Final
Fill Volume (μL)	428 ± 9.7	450	441 ± 15
% exchange	–	96	99.7 ± 0.3
% recovery	–	≥96	100 ± 2
Z-average diameter (nm)	7.1	–	7.2 ± .3

表 1：用 Unfilter 96、10 kDa MWCO 把 BSA 从 PBS 置换进 PBS 时的初始、目标和最终注入体积，以及置换百分比、回收率百分比和 Z 平均粒径。最终值和初始注入体积均为 96 个孔的平均值± 1 个标准差。

运行完第一轮候选分子或制剂筛选后，蛋白样品的数量通常会变少，体积却往往变大。这时 Unfilter 24 板就能让 Lil’ Tuna 跟着您一起，从低体积、高通量切换到中等体积的样品处理。用 Unfilter 24 把 10 mg/mL 的 IgG 从 0.9% NaCl 缓冲液置换进 PBS 之后，最终体积和置换百分比都在目标上 (表 2)。置换前后 Z

平均粒径一致，所有孔的蛋白回收率都高于 96%。只要膜的 MWCO 和样品对上，无论分子大小，Lil' Tuna 处理蛋白和抗体都很拿手。

	Initial	Target	Final
Fill Volume (μL)	7.7 ± 0.03	8	7.2 ± 0.08
% exchange	–	96	96.6 ± 0.3
% recovery	–	≥96	100 ± 1
Z-average diameter (nm)	12.6	–	13.3 ± 0.4

表 2：用 Unfilter 24、30 kDa MWCO 把人源 IgG 从 0.9% NaCl 置换进 PBS 时的初始、目标和最终注入体积，以及置换百分比、回收率百分比和 Z 平均粒径。初始注入体积和最终值均为 24 个孔的平均值± 1 个标准差。

在 Lil' Tuna 上运行一次置换，手动时间大约 15 分钟。运行过程中，超声波传感器监测每孔的液体体积变化，并实时调整运行时长，在加快处理速度的同时保证各项参数精准达标。流速会受初始蛋白浓度等因素影响，而这套高精度控制系统可让 Lil' Tuna 设备处理从早期药物筛选到制剂、浓度跨度很大的各种样品。在一块 30 kDa MWCO 的 Unfilter 96 上，对各 8 个孔的 0.1、1、10 mg/mL hIgG 做缓冲液置换，用时不到 2.2 小时；所有测试浓度都保持在接近起始浓度的水平，置换百分比达到目标，蛋白质量回收率也高达≥96% (图 4)。不管浓度高低，设置完成后即可全自动运行，无需人工值守，科研人员可抽身开展其他更具价值的实验工作。

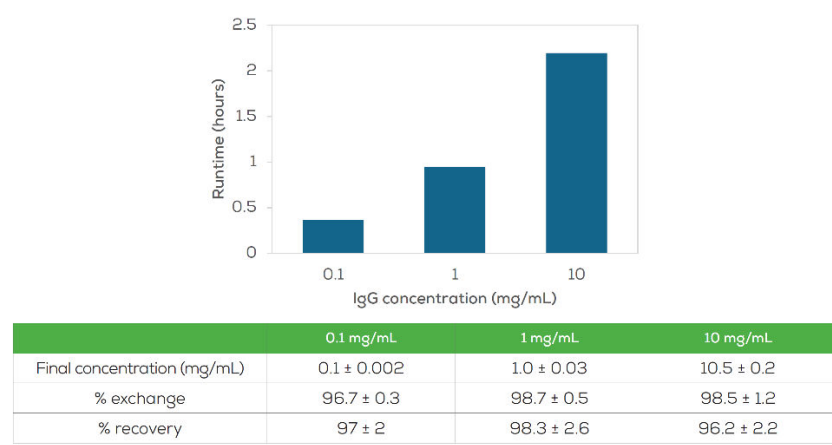


图 4：在 Unfilter 96、30 kDa MWCO 上，把各 8 个孔的 0.1、1、10 mg/mL hIgG 从 0.9% NaCl 置换进 PBS，测得的总运行时间、最终浓度、置换百分比和回收率百分比。数值为 8 个孔的平均值± 1 个标准差。

结 论

Lil' Tuna 把缓冲液置换和浓缩自动化，让科研人员能把更多时间花在产出可用于决策的数据上。灵活的耗材规格一次支持 1–96 个样品，给团队一套台式工作流程——从大规模的板式筛选、中等体积的样品处理，到小批量的珍贵样品，都能兼顾。只需设定目标去除率与置换率，Lil' Tuna 内置的流程控制系统即可全程维持各项参数稳定。借助 Lil' Tuna 的 API，以及液体和板处理机器人都能轻松取用的 SBS 格式板，还能把缓冲液置换和实验室里其他自动化串起来。一次性的孔板有助于降低交叉污染风险；多种 MWCO 和膜材料，则让耗材和分子、体积、应用之间的搭配变得很容易。凭着轻柔的、基于压力的 UF/DF，加上实时体积跟踪和自适应的循环时长，Lil' Tuna 在蛋白和单抗实验里都能给出一致的置换、保住样品质量，并实现 $\geq 96\%$ 的回收率。

参考文献

1. Leveraging high-throughput analytics and automation to rapidly develop high concentration mAb formulations: integrated excipient compatibility and viscosity screening. L Xin, et al. *Antibody Therapeutics*. 2024; 7(4):335–350.
2. Predictive Nature of High-Throughput Assays in ADC Formulation Screening. BJ Mills, et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023; 112(7):1821–1831.
3. Reduction of monoclonal antibody viscosity using interpretable machine learning. EK Makowski, et al. *mAbs*. 2024; 16(1):2303781