

PhyTip[®] ProPlus Affinity Columns... プロテインA、プロテインGカラムを用いた 抗体精製の最適システム

- 高濃度の高機能性タンパク質を、わずか15分で捕捉、精製、濃縮
- 少量のサンプルを再現性のあるハイスルーブット及び自動化されたフォーマットで処理
- 溶出量は10 μ Lと少なく、濃縮率は50倍、タンパク質濃度は10mg / mLまで精製可能
- 他社プロテインAカラムより、少なくとも10%は高いキャパシティを有する
- プロテインGと類似した様々な種や多種のアイソタイプを認識する幅広い選択性を有する
- プロテインGカラムの3~5倍 高回収率

Introduction

PhyNexus PhyTip[®]カラムは、さまざまな種のサンプルからのタンパク質の捕捉、精製、濃縮を劇的に簡素化する革新的な精製ツールです。これらの精製ツールは、最小限のデッドボリュームと最大の捕獲ポテンシャルを持ち、アフィニティーレジン床を保持するメカニズムのデザインが成功の鍵となっています。既存のPhyNexus製品には、プロテインA、またはプロテインGアフィニティーレジンを含むPhyTipカラムがあります。これらは特定の最適条件下で異なるソースからの抗体(IgG)を特異的に結合し、核酸および他の汚染物質を除去します。迅速な洗浄工程の後、精製抗体は一般的に使用される低pH緩衝液を用いて容易に溶出されます。この技術は様々な条件に応じて、非常に高い収量のIgGを可能にし、高度に選択的な精製を提供します。PhyTipカラムは数mgまでのIgGと結合できる非常に高い結合能を有し、200 ng程度のIgGを効率的に回収できます。

ProPlusレジンリガンドはプロテインAとプロテインGの両方の特性を示すプロテインAベースのリガンドです。これはプロテインGはマウスおよびラットのIgGのようなIgGの特定のアイソタイプおよび種について、プロテインAよりも優れた選択性を示します。しかしながら、プロテインGは容量が小さいため、より高い回収率が必要な場合は、望ましくありません。新しいPhyTip ProPlusカラムはプロテインGに対して同様の選択性を示し、プロテインAよりも高い容量を示し、両方の長所を最大限に活用できます。PhyTip ProPlusカラムはハイブリドーマ上清からの抗体スクリーニングや、発現抗体のハイスルーブット抽出や精製に理想的です。

IgGはProPlusに高い親和性と特異性で結合します。この相互作用の強さと選択性が、ProPlusが複雑なタンパク質混合物からIgGを効果的に精製することを可能にします。ProPlusレジンを用いたPhyTipカラムの性能を調べるために、1000+ ProPlusPhyTipカラムを用いた精製IgGの回収率を測定しました。

Materials and Methods

Sample processing

1 mlのサンプルはすべて、以下のプロトコルを用いて、オート MEA 1000 プラットフォーム上で20、40、または80 μ l容量のカラムで処理しました。

1. 捕捉:0.5 ml/minで4 in/outサイクルで1 ml試料をレジジン床に通すことにより、特異的に抗体を捕捉します。
2. 精製:結合したタンパク質/アフィニティーレジンを、0.5 ml/min(Wash Buffer I)で1 mLのPBSで1 in/outサイクル、続いて0.5 ml/min(Wash Buffer II)で1 mLの生理食塩水で1 in/outサイクルで洗浄し、未結合のタンパク質を除去します。
3. 濃縮:pH 2.5溶出緩衝液60 μ l(20 μ lカラム用)、120 μ l(40 μ lカラム用)または240 μ l(80 μ lカラム用)を用いて、0.5 ml/minで4 in/outサイクルで、特異的に抗体を溶出します。

溶出抗体溶液に、15 μ l(20 μ lカラム用)、30 μ l(40 μ lカラム用)または60 μ l(80 μ lカラム用)のpH 9.0中和緩衝液を加えます。

Quantitation procedure

1. 溶出した抗体試料80 μ lを、HP 1050 HPLCシステムを用いて、非多孔性ポリスチレンジビニルベンゼン逆相カラムに注入了。移動相A(0.1% TFA in water)と移動相B(0.075% TFA in ACN)を用い、15%~85% グラジエントを10分間で行いました。検出:UV は 214 nmです。
2. 抗体ピークは約7分で溶出しました。このピーク下の面積を積分し、対応するピーク面積を214 nmで記録しました。
3. 同一の反応条件下で標準抗体をカラムに充填し、回収計算のための追加情報または標準として、使用しました。

Results

Table 1	mIgG ₁			mIgG _{2a}			hIgG		
	ProA	ProG	ProPlus	ProA	ProG	ProPlus	ProA	ProG	ProPlus
%Recovery	2	5.6	18.9	35	27.3	37.1	60.4	35.4	62.9
SD	0.36	0.59	1.09	1.73	0.65	2.21	3.81	1.07	6.99
RSD	17.6	10.6	5.8	5	2.4	6	6	3	11.1

Selectivity Experiment

Figure 1およびTable 1に示すように、PhyTip ProPlusカラムによるIgGの異なるアイソタイプおよび種の回収を、プロテインAおよびプロテインGカラムによる回収と比較しました。プロテインGは、マウスアイソタイプを含むIgGの特定のアイソタイプの選択性に対して、プロテインAよりも優れています。我々は、ProPlusが、ここで使用したmIgG₁、mIgG_{2a}およびhIgGアイソタイプに対して、プロテインGと同様の選択性を示すことを示しました。さらに、機能的抗体の容量および回収率は、プロテインAおよびプロテインGカラムの両方よりも優れています。

Samples

1ml PBS, 0.05% Tween containing 5 μ g of either:

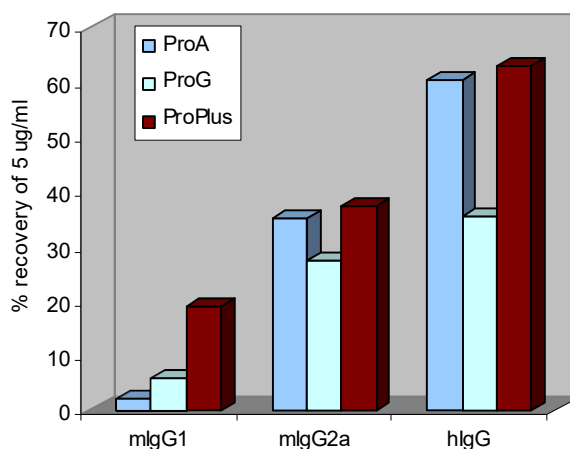
1. mouse IgG₁
2. mouse IgG_{2a}
3. human IgG

20 μ lのカラム(Figure 1およびTable 1について)、ならびに20 μ lまたは80 μ lのカラム(Figure 2およびTable 2について)に添加しました。

Reproducibility

再現性を実証するために、各抗体を各レジジンタイプの3回の実験・精製をしました。RSDは全てで18%未満、平均7.5%でした。

Figure 1. ProPlus, ProA and ProG Selectivity



Capacity as a function of Resin bed Size

レジン床のサイズが大きいほど、抗体結合能が高くなり、その結果、抗体の回収率は向上します。ここで分析されるような希釈試料は、より大きなレジン床サイズから恩恵を受ける可能性があります。しかしながら、より大きな溶出容量も同様に必要とされ、溶出画分は、より小さなレジン床容量のカラムで得られるものよりも大きく、より希釈されます。Figure 2およびTable 2のデータは、20 μ lカラムおよび80 μ lカラムを用いる精製間の回収率の差を示します。

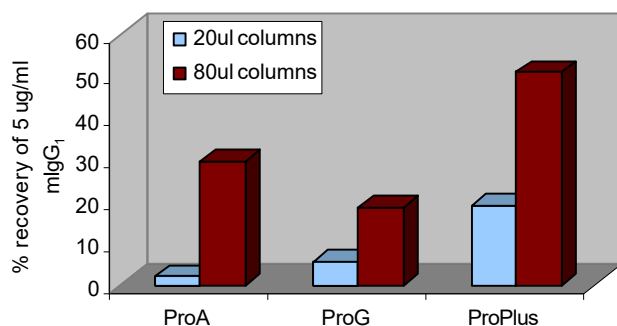
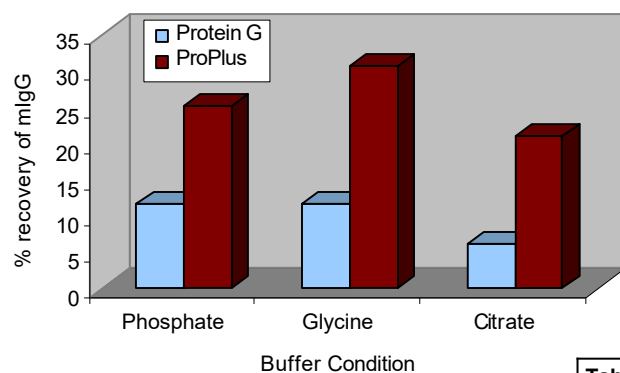
Figure 2. mIgG₁ recovery, 20ul & 80ul columns

Figure 3. ProPlus and Protein G mIgG recovery



Mouse Hybridoma Experiment

Figure 3およびTable 3に示すこの実験は、マウスハイブリドーマサンプルのスクリーニングのためのProPlusカラムのアプリケーションです。ProPlusカラムを用いた回収率は、プロテインGと比較して3~5倍増加しています。これは、これらの新しいカラムの有用性を劇的に実証しています。3つの異なるpH 2.5溶出緩衝液条件、リン酸、グリシンおよびクエン酸緩衝液を調べました。

Samples

- 0.05mg/mL mIgG₁, low bovine IgG media
- 0.05mg/mL mIgG₁, 10% FBS IgG media
- mIgG₁ clone expressor, low bovine IgG media
- mIgG₁ clone expressor, 10% FBS IgG media
- (-) control, low bovine IgG media
- (-) control, 10% FBS IgG media

Conclusions

- ProPlusカラムは、プロテインGと同様、IgGの様々な種およびアイソタイプに対して選択的であり、ハイブリドーマからマウスIgGを精製することができます。
- ProPlusは結合したIgGに対して高い能力を示します。
- PhyTip ProPlusカラムのレジン床容量を調整して、最大量の抗体を回収することができます。

	20ul columns			80ul columns		
	ProA	ProG	ProPlus	ProA	ProG	ProPlus
%recovery	2	5.6	18.9	29.42	18.6	50.1
SD	0.36	0.59	1.09	0.89	0.65	2.21
RSD	18	10.6	5.8	3	2.4	6

Mouse hybridoma samples	Phosphate Buffer			Glycine Buffer			Citrate Buffer		
	ProG	ProPlus	ProPlus Factor Increase	ProG	ProPlus	ProPlus Factor Increase	ProG	ProPlus	ProPlus Factor Increase
	Total μ g			Total μ g			Total μ g		
1	12	53	4	7	55	8	4	13	3
2	12	41	3	7	42	6	3	38	13
3	15	26	2	9	21	2	8	11	1
4	27	69	3	20	55	3	10	22	2
5	2	7		2	4				
6	2	5		2	8				
	Average fold greater recovery: 3			4			5		