

Application Note

PhyNexus
www.phynexus.com

タンパク質および抗体の 迅速な微量スケールの捕捉、浄化、および濃縮のための PhyNexus PhyTip®カラム

Introduction

アミノ酸標識部位をもつ組換えタンパク質の導入により、多くの研究者がタンパク質の構造と機能を研究するために、大量の不要な高分子から目的のタンパク質を特異的に抽出するメカニズムが生まれています。しかしながら質量分析法やタンパク質バイオチップのような、今日の高感度検知技術のいずれかによる解析のための組換えタンパク質および抗体の単離は、面倒で時間のかかるマクロスケールプロセスを伴います。また多くの用途において、これらの同じ分離プロセスは、機能的完全性を保持しないかもしれない最終製造物をもたらす、最終的な結果が損なわれるかもしれません。

PhyNexus, Inc. は微量スケールで精製された完全機能性タンパク質を、十分量製造するという問題を克服する独自の装置を開発しました。リキッドハンドリングプラットフォームとともにこのシステムを使用することで、研究者はさらなる機能研究の準備ができていたタンパク質サンプルを迅速に捕捉、精製、濃縮することができます。PhyNexusのディスプレイザブルPhyTipカラムは、2枚の網目状のシートの間にはアフィニティーレジンの一部を埋め込んだ独自の精製濃縮ツールです。有効な捕捉、洗浄および濃縮のためのいくつかのレジン(例えば、タンパク質A、タンパク質G、グルタチオンおよびIMAC、すなわち、Ni-NTA)が利用可能です。これらのレジンには捕捉、精製、および濃縮に用いられる化学的条件下において、捕捉アフィニティーおよび溶離ポテンシャルが異なります。通常、最高1mlの製造原料のサンプルをPhyTipカラムに導入し、工程の最後に20 µL以下の高度に精製され濃縮されたタンパク質を得て、さらなる解析を行うことができます。このタイプの精製法の主な利点は比較的少量の製造原料から、非常に高濃度の精製製造物が1つの簡単なプロセスで得られる点です。

Materials & Methods

PhyTipカラムの特異的タンパク質を精製・濃縮する能力として、IgGを特異的アフィニティーレジンとして固定化タンパク質Aとともにモデルシステムとして用い、PhyTip® ME 1000 Purification Systemをデリバリーシステムとして用いました。目的のタンパク質を正確に捕捉、精製および濃縮するために、システムはPhyNexus Instrument Standに統合されています。これによりシステムの8つのチャネルすべてが、捕捉、精製、濃縮のプロセスに含まれる3つの別々のステップを正確に実行することが可能になりました。

Procedure. 1000+ PhyTipカラムを用いて一連の実験を行い、最高1 mlの初期のタンパク質混合物を精製しました。それぞれのPhyTipカラムは、2枚の網目状の保持カバーの間に埋め込まれた10 µLのレジンで構成されています。第1段階(捕捉)では、タンパク質液がPhyTip内に引き込まれるにつれて、目的のタンパク質がアフィニティーレジン床を通過し、捕捉されるが、非特異的タンパク質は捕捉されず、溶解したままです。



同じ1 mlの溶液がPhyTipカラムから排出されると、結合していないタンパク質はアフィニティーレジンを通過し、再度捕捉されません。工程(精製)の第二段階は、アフィニティーレジンから非特異的に結合したタンパク質を除去するための洗浄段階です。PBSの洗浄液を使用して、1 mlを最初にPhyTipカラムに導入し、次いで排出しました。最終製造物の最大純度を保証するために、このプロセスを2回繰り返しました。最適な溶出条件を確保するために、第2の洗浄ステップを水のみで行いました。最終段階(濃縮)では、アフィニティーレジンから特異的なタンパク質を溶離しました。標的タンパク質の高濃縮を得るために、この工程はしばしば10 - 20 μL の溶離緩衝液の容量で行われます。溶離緩衝液は特異的な機能的タンパク質をアフィニティーレジンから、迅速かつ定量的に除去して溶液に戻す溶液です。

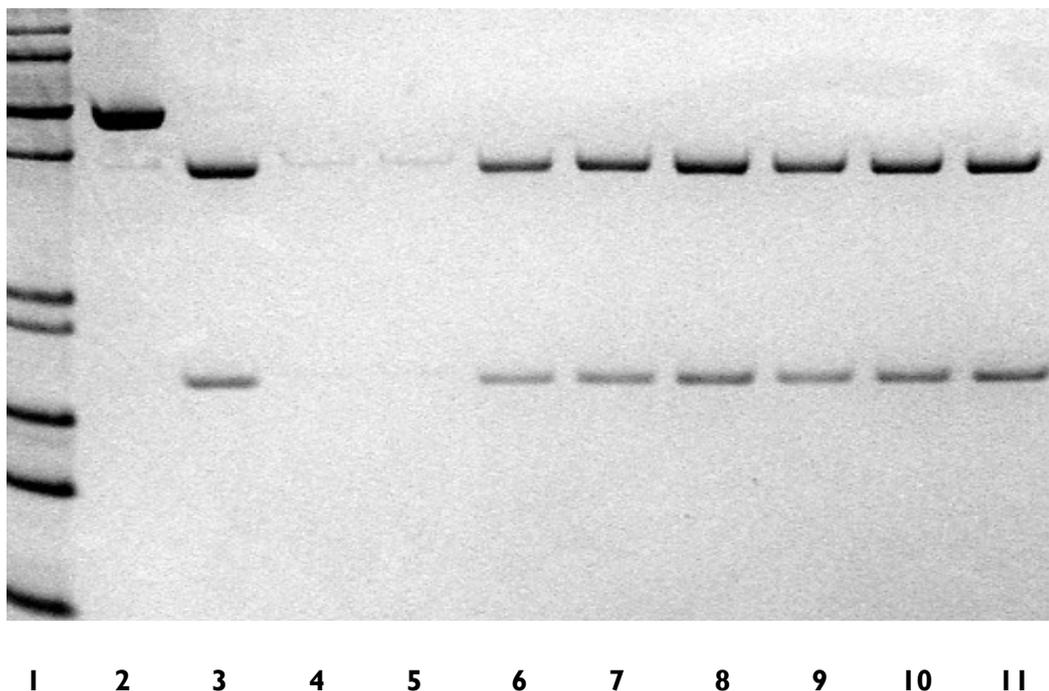
Results: recovery, selectivity and capacity. PhyTipカラムにおけるタンパク質レジンの選択性を実証するために、IgG回収試験を実施しましたが、PBS中の5 mgのBSAの存在下または非存在下では10 mgのIgGを用いました。これらの条件下ではIgGの開始量の65~70%が、PhyTipカラムからルーチンに回収されました。また、lanes 7、8、10、11に示すように、最終精製フラクション中に混入BSAは存在しませんでした。結果としては1000+ μL のPhyTipカラムが、100 μg を超える精製IgGを調製し、最終容量20 μL に溶出されることを示しています。PhyTipプロセスは完全に無傷の抗体調製物をもたらし、さらなる機能分析に適していることが実証されています。一般的にサンプルを捕捉、精製、濃縮するのに必要な総時間は、1回に1から96までの任意の数のサンプルで、開始から終了まで15分を超えません。

	Pipetting Volume	200+ PhyTip Min: Sec
Capture	200 μL x 2	2:12
Purify 1	200 μL x 2	2:12
Purify 2	200 μL x 2	2:12
Enrich	10 μL x 5	2:24
Total Time		9:00

	Pipetting Volume	1000+ PhyTip Min: Sec
Capture	1000 μL x 2	4:20
Purify 1	500 μL x 2	2:10
Purify 2	500 μL x 1	1:10
Enrich	15 μL x 5	2:20
Total Time		10:00



Nu-PAGE 4-12% Bis-Tris gel with MES running buffer



Lane 1: マーカー、**2:** 2 μ g BSA、**3:** 2 μ g IgG2a、**4, 5:** タンパク質Aレジンのみ； **6, 7, 8:** 2 μ l PBSからタンパク質A精製IgG2a、5 mg BSA (2および5サイクル負荷)を含有するPBS； **9, 10, 11:** 2 μ l PBSからタンパク質A精製IgG2a、5 mg BSA (2および5サイクル負荷)を含有するPBS

Summary

PhyNexus PhyTipカラムは汚染性の高い物質のバックグラウンドから、目的のタンパク質を迅速かつ効率的に精製・濃縮する手法です。この技術は非常にシンプルで迅速であるため、多くの用途に容易に組み込むことができ、既存の遅くて効率の悪い方法論に取って代わることができます。例えば、新しい標識不使用検出技術(Biacore、Applied Biosystems、SRU Biosystems and Proterionなど)がますます普及しつつあり、ハイブリドーマまたはファージベースの抗体ライブラリーのハイスループットの速度論的スクリーニングを実施して、一次スクリーニング段階で k_{on} (on-rates)、 k_{off} (off-rates)、 K_d などの機能的速度論的および平衡情報を得るそれらの能力が利用されています。タンパク質の最終濃度がしばしば希釈されすぎる、またははるかに多くの開始サンプルおよび加工時間を必要とする従来の試料調製技術とは異なり、PhyNexusのPhyTipカラムは抗体の標識不使用一次スクリーニング手順(全て1 ml以下の開始サンプルから)に必要な純度および濃縮を迅速に提供します。詳しいデータについてはwww.phynexus.comを参照してください。

PhyTipカラムもELISAに基づく一次スクリーニング法の優れた前駆体です。IgGの濃縮および非特異的相互作用を引き起こす可能性のあるバックグラウンドタンパク質の除去により偽陽性を減少させることによって、不要でコストのかかる下流のプロセッシングを減少させることができます。さらに、PhyTipカラムは二次スクリーニング手順におけるELISAベースのScatchard分析、ならびにFACSベースまたは細胞ベースの二次アッセイフォーマットに対するアフィニティー定数を決定する際に、極めて経済的でシンプルなIgG濃縮および精製コストとして役立ちます。

PhyNexus社のPhyTipカラムは、異なる機器プラットフォーム用の様々なフォーマット、可変容量の様々なチップサイズ、および全体的な柔軟性のための多くの異なる捕捉レジンで利用可能です。

Copyright © 2005, PhyNexus, Inc., All Rights Reserved.

PSL # 10-00-01 August 2005

www.phynexus.com