



Agilent 1260 Infinity マルチ検出器 Bio-SEC ソリューション

データシート

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、単量体および二量体、凝集体や、存在する可能性のある分解生成物の同定および定量に用いられる標準的な分析手法で、規制当局の認可のために必要な一般的なメソッドの一つです。Agilent 1260 Infinity マルチ検出器 Bio-SEC ソリューションは、抗体医薬品やタンパク質の解析にもっとも基本となる情報を導きだしてくれます。

- 最先端の光散乱検出器により、溶液中の分子量およびサイズの正確な測定を可能にすると同時に、凝集体検出の感度を高めます。
- Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC システムの完全にメタルフリーの流路により、分析全体におけるサンプルのシステムへの吸着を防止します。
- 幅広いラインアップを取り揃えた Agilent Bio-SEC カラムにより、優れた分離能を実現します。また、業界最高の低デッドボリューム光散乱検出器により、高い分離効率が維持されます。
- ワークフローにフォーカスした使いやすい Agilent Bio-SEC ソフトウェアにより、ユーザーの経験値にかかわらず、簡単かつ再現性のよい高精度なデータ採取を実現します。



Agilent Technologies

はじめに

概要

Agilent 1260 Infinity マルチ検出器スイートと Agilent 1260 Infinity バイオイナートクオータナリ LC システムは、広い分子量域でのタンパク質サンプルの分子量、サイズ、相対濃度の正確かつ再現性の高い測定に最適な組み合わせです。静的および動的な光散乱検出と UV 検出を組み合わせることで、小型タンパク質に相当する数 kDa から分子量 670 kDa のチロglobリンまでのタンパク質を正確に同定および定量することができます。十分に品質管理されたシングルベンダーソリューションならではの堅牢性により、稼働時間が最大化されるため、コスト削減が実現します。バイオイナート機器によりサンプルの完全性が確保されます。高分離能 SEC カラムが分析時間を短縮し、優れた再現性を約束します。直観的で使いやすい Bio-SEC ソフトウェアでは、全てのオペレータで正確な結果が得られます。検出器モジュールを個別に加熱することで安定性の高いベースラインが得られ、きわめて優れた検出下限が実現します。業界最高の低セルボリューム技術により、分散と偽ピークのブロードニング効果を最小限に抑えます。アジレントの提供する最先端の Bio-SEC ソリューションは、生体分子の分析に最適なシステムです。

LC による生物製剤の完璧な特徴分析

アジレントは幅広いラインアップの Bio-HPLC カラムを提供しています。イオン交換、逆相、ペプチドマッピングカラムのほか、SEC 用カラムも用意しています。幅広いサイズ排除カラム技術により、優れた分離能が得られます。Agilent Bio-SEC ソリューションは、業界最高の低デッドボリュームという特長を備えた UHPLC システムで、最高の分離効率を実現します。最先端の UHPLC 機器の性能を犠牲にすることなく、高度な検出の利点を得られます。業界最高の低デッドボリュームセルにより、光散乱検出器で頻繁に生じるバンドブロードニングを最小限に抑えます。また、精密な温度制御により、安定性と再現性を確保します。独自の低セルボリュームと、流路に対して 90 度のレーザー位置の採用により、シグナルがフローセル内の乱流や攪乱に影響されない設計になっています。極めて安定性の高いベースラインにより、最適なシグナル/ノイズ比が得られます。セルボリュームの角度補正が不要であり、処理を行っていない実際のシグナルがソフトウェアに転送されます。これにより、データの完全性が確保されます。

高度な検出が実現する最高の感度と正確性

カラムキャリブレーションなしで 実際の分子量を正確に測定

一般に、ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) と呼ばれる従来の SEC を用いて測定される分子量は、タンパク質分子量マーカーを用いて作成した校正曲線を参照することで得られます。タンパク質のサイズと分子量の関係はすべてのタンパク質で同じではないので、そうした方法では制約が生じ、表 1 に示すように、不正確な分子量測定につながる場合があります。また、形状やサイズに関する情報が得られないことも、このテクニックの適用範囲を狭めています。

図 1 を見ると、光散乱検出では、高分子量の物質に対する感度が低濃度でもきわめて高いことがわかります。6 つの球状タンパク質のクロマトグラムを重ねて表示したこの図は、組成と分子量分布の違いを示しています。従来の SEC 分析とは異なり、分子量マーカーとは関係なく、絶対分子量値が得られます。

表 1 では、カラムキャリブレーションを用いた従来の SEC で得られた結果 (MW_{Conv}) と文献で報告されている値 (MW_{lit})、および静的光散乱検出により算出された値 (MW_{LS}) を比較しています。光散乱検出器の値は、文献値と良好に一致しています。 MW_{Conv} 値では、大きなずれが見られます。これはおそらく、タンパク質の SEC 分析の際に、サイズ排除のメカニズムだけでなく吸着による影響も働いているためと考えられます。絶対的で正確、かつ再現性の高い分子量測定を可能にするためには、光散乱検出が不可欠です。

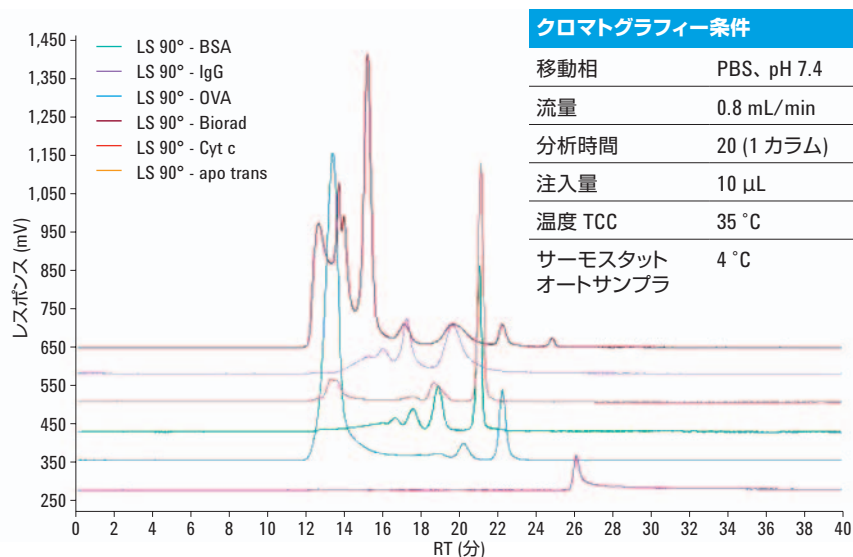


図 1. カラムキャリブレーションを行わない光散乱検出によるタンパク質の実際の分子量の測定。

表 1. 光散乱は、従来のスタンダードを用いた SEC よりもはるかに高い正確度を提供します。

	MW_{lit}	MW_{LS}	MW_{Conv}
チログロブリン	670,000	672,400	794,400
ガンマグロブリン	150,000	151,600	76,200
BSA	66,463	66,000	67,700
オブアルブミン	42,881	42,500	56,100
ベータラクトグロブリン	19,900	21,500	38,000
シトクローム C	11,749	11,900	3,000

高感度の凝集体検出

モノクローナル抗体 (MAb) は、癌との闘いにおける科学的な進歩の成果です。特定の種類の MAb は、免疫系を活性化させて悪性細胞を攻撃したり、細胞分裂の引き金になるシグナルを遮断したり、攻撃された細胞に治療薬を運んだりします。図 2 は、MAb の典型的なクロマトグラムを示しています。280 nm での UV シグナルが表示されています。静的光散乱シグナルは角度 90 度で採取したものです。どちらの検出器でも単量体と二量体が明確に同定されています。UV シグナルを使えば、サンプル組成の測定も可能です。光散乱検出器では、凝集体の存在に対する感度が高くなります。光散乱検出は、生体分子の凝集分析の重要なテクニックとして用いられることが増えていきます。凝集は免疫反応上の問題を引き起

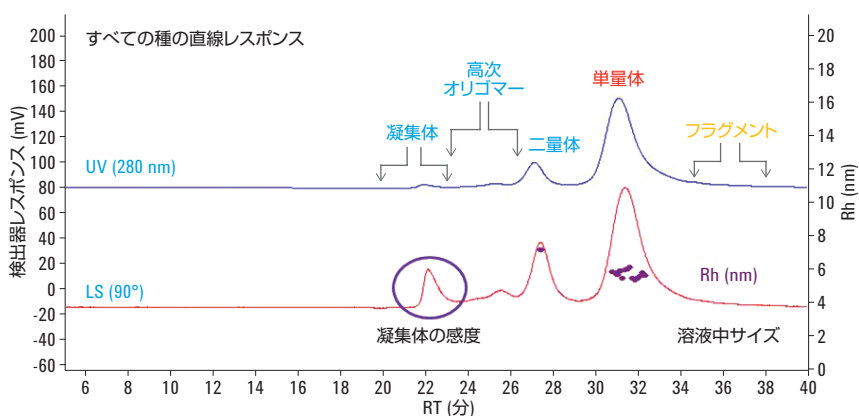


図 2. 光散乱検出と UV 検出を組み合わせた組成、凝集、サイズ、フラグメントの存在のモニタリング。

こし、薬効の低下や、場合によっては患者治療中の被害につながるおそれがあることから、重要な問題となっています。

動的光散乱レスポンスは、流体力学半径 (Rh) の測定に用いられています。

再現性の高い高度な Bio-SEC

高度な検出の再現性を高める 最適化されたソリューション

検出器間のデッドボリュームを最小限に抑えることで、バンドブロードニング効果を回避しています。また、光散乱検出器のフローセルは市販機器のなかでも最小で、わずか 10 μ L です。分離効率が絶対的に保証されています。

表 2 は、シトクローム C からチログロブリンまでの 5 種類のタンパク質の光散乱検出による分子量測定の概要と相対標準偏差 (RSD) を示しています。注入量の異なる複数回の注入により、再現性 (RSD) を測定しました。光散乱検出器のレスポンスは分子量とともに増加するため、すべてのタンパク質について注入範囲を調整しました。このデータを見れば、Agilent Bio-MDS により、正確で再現性の高い結果が得られることがわかります。分析結果は文献で報告されている値と良好に一致しています (表 3)。

表 2. 光散乱検出を用いた 5 種類の球状タンパク質の分子量測定における優れた再現性。

	MW _{lit}	MW _{LS}	測定範囲 (オンカラム μ g)	注入回数	RSD (%)
チログロブリン	670,000	672,400	3 ~ 76	8	2.9
IgG	150,000	151,944	1 ~ 120	16	1.9
オプアルブミン	44,000	47,198	2 ~ 960	17	2
リゾチーム	16,239	16,272	15 ~ 600	11	0.7
シトクローム C	11,749	11,674	180 ~ 750	7	2.5

流体力学半径による 溶液中サイズの測定

静的光散乱の補完的テクニックとなるのが、動的光散乱です。動的光散乱では、生体分子のブラウン運動を調べ、そこから流体力学半径 (Rh) と呼ばれる分子サイズを導出します。動的検出器と静的検出器で、同じ市場最高の低デッドボリュームフローセルを用いることで、分離効率が確実に維持されます。

表 3. Rh の文献値と動的光散乱により測定した値の比較。

	DLS で得られた 流体力学半径 (Rh)	
	Rh _{lit}	Rh _{exp}
チログロブリン	8.58	8.42
ガンマグロブリン	5.29	5.40
BSA	3.48	3.59
オプアルブミン	2.70	2.75
ベータラクトグロブリン	2.64	2.40
シトクローム C	1.66	1.65

ルーチンモードとエキスパートモードを備えた使いやすいソフトウェア

ワークフロー効率

1260 Infinity マルチ検出器 Bio-SEC ソリューションは、最先端のワークフローに対応できるように特別に設計されています。必要なものをすべて提供できるので、あらゆるラボで高度なタンパク質分析を導入したり、分析性能を拡張したりすることが可能です。簡単で直観的な操作が可能なオープンアクセスのクロマトグラフィードータシステム (CDS) により、光散乱検出の多くの利点を誰でも活用することができます。シンプルなユーザーインターフェースから、あらゆる生体分子の高度な情報に自由にアクセスできます。

必要な結果を迅速かつ簡単に提供

分析ウィザードと高度なアルゴリズムにより、あらゆる経験値のユーザーが必要な情報を得られるように支援します。専門的な知識がなくても、正確性や再現性を犠牲にすることなく、迅速かつ簡単に分析を実行することができます。

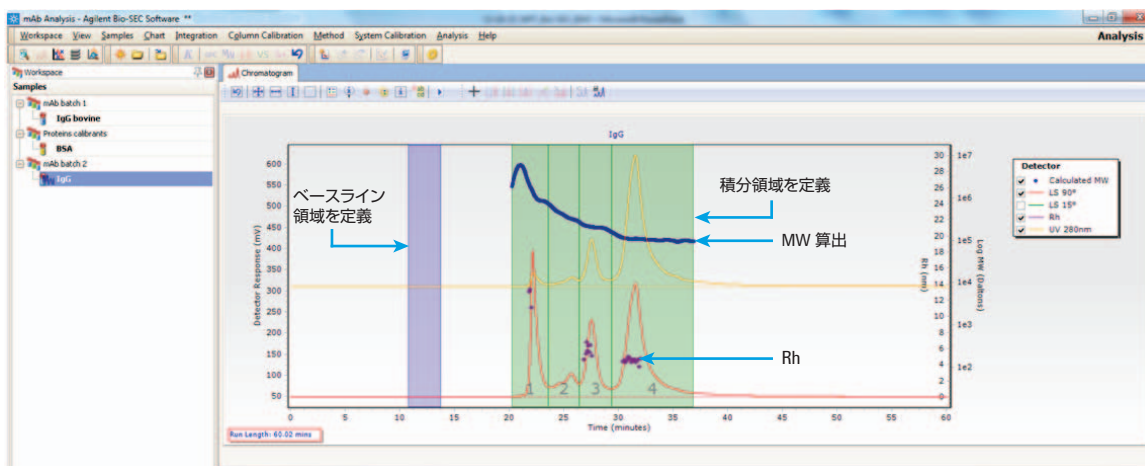


図 3. 2回のクリックだけで、ベースラインと積分領域を定義できます。直観的な Agilent Bio-SEC ソフトウェアを使えば、正確かつ再現性の高い結果を得ることが可能です。

サンプルの完全性の維持

液体流路が完全にバイオイナート化されているため、分析中にサンプルが金属表面と接触することはありません。大きい生体分子は、金属表面との非特異的な相互作用や分析対象成分との識別、システムからの金属イオン流出などの影響を受けやすく、それが再現性の低下やピークテーリング、分離能の低下につながります。また、SEC では一般的に高塩濃度

溶媒が用いられますが、それが腐食の進行、堅牢性の低下、装置ダウンタイムの増大につながることもあります。こうした問題には特別のメンテナンスや面倒な不活性化作業が求められます。完全なバイオイナート流路を備えたアジレントのシステムなら、このような手順が不要になり、バイオ分析のサンプルスループットと効率が向上します。

フルベンダーソリューション

信頼できる単一のメーカーから分析に必要なあらゆるものを提供することで、最大の稼働時間が保証されます。いずれの製品も、生体分子の特徴づけを念頭に、徹底的にテストおよび確認されています。分析機器、カラム、検出器、専用の Bio-SEC ソフトウェアなど、生体分子の特徴づけに必要なコンポーネントをすべて提供できるのは、アジレントだけです。システムサポートとルーチンメンテナンスもいつでもご利用いただけます。図 4 に典型的なサンプルの分析結果を示しています。

表 4 には、光散乱検出を用いて算出したチログロブリンの単量体 (ピーク 4) および凝集体の絶対分子量をまとめています。

凝集体が存在すると、効能や安全性に大きな影響が出る可能性があります。この例が示しているように、光散乱検出は凝集体モニタリングに役立つツールです。この表を見ると、ピーク 1 の分子量が四量体の 10 倍であることがわかります。この結果は、ピーク 1 が確実に凝集体であることを裏付けています。UV 検出器のシグナルから算出される面積 % は、オリゴマーと凝集体の相対濃度を表しています。

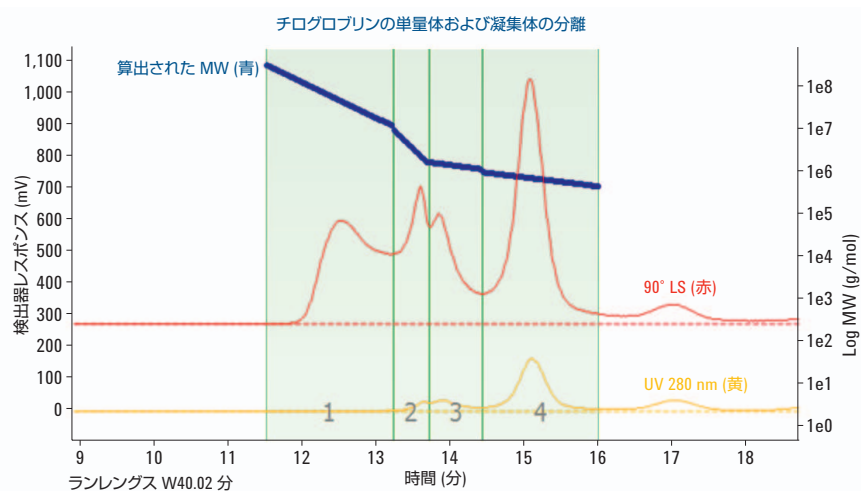


図 4. UV および光散乱検出を用いて算出したチログロブリンの分子量データ。

表 4. 算出されたチログロブリンの分子量および組成率。

チログロブリン					
	Mw _{fit}	ピーク 1 凝集体	ピーク 2 四量体	ピーク 3 二量体	ピーク 4 単量体
MW LS	670,000 Da	26,999,000 Da	2,766,000 Da	1,342,000 Da	672,000 Da
ピーク面積 % UV 280 nm		1.15 %	7.00 %	15.03 %	76.46 %

仕様と製品情報

仕様

タイプ	仕様
セル容量	10 μ L
散乱体積	0.01 μ L
測定範囲 (Rh)	1 ~ 1,000
レーザー波長	658 nm
測定角度	90°
最小サンプルローディング量	40 μ g*
温度範囲	30 ~ 60 °C
温度安定性	\pm 0.2 °C
コリレーター	512 チャンネル、マルチ tau
データ取り込み時間	0.1 ~ 3,600 秒
pH 範囲	2 ~ 10

*機器条件	
サンプル	150 kDa モノクローナル抗体
カラム	Agilent Bio SEC-3、300Å、 7.8 \times 300 mm、3 μ m (p/n 5190-2511)
移動相	PBS、pH 7.4
流量	0.75 mL/min

製品情報

部品番号	説明
G7805AA	Agilent 1260 Infinity Bio-SEC マルチ検出器システム。 静的および動的な光散乱検出器、 Agilent Bio-SEC ソフトウェア およびコンピューターを搭載

www.agilent.com/chem/jp

本資料記載の情報は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2014

Published in Japan, April 1, 2014

5991-4040JAJP



Agilent Technologies