

生体分子の特性解析ワークフロー

AGILENT Bio-Monolith Protein A、 Protein G アフィニティカラム



本書は、生体分子の特性分析に必要な最適な LC システムとその構成に関する、アジレントのアプリケーションケミストからの推奨事項を記載しています。また、入門用の一般的なメソッドと、このメソッドを特定の分離目標に合わせて最適化する方法についても説明しています。

Agilent 1260 Infinity バイオフィナート LC システム

Agilent Bio-Monolith Protein カラムは、すべての HPLC/UHPLC システムと互換性があります

HCl の屈折率は、他の溶媒と比べて低いです。低濃度のサンプルを使用している、ベースラインノイズや不自然なピークの問題がある場合は、HCl を溶媒として使用できます。



Bio-Monolith Protein A のカラムには白いバンドが、Bio-Monolith Protein G のカラムには黄色のバンドが、それぞれカラムの周囲に付いています。

移動相

結合緩衝液: 50 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4。
溶出緩衝液: 以下の表を参照してください。

サンプル注入量

1 ~ 5 mg/mL の mAb を含むサンプルの場合、1 ~ 5 μ L を注入。サンプルは H₂O または移動相 A で溶解できます。カラムには 1 回の注入で、最大 50 μ L または最大 400 ~ 500 mg の mAb を注入できます。

流量

高速の場合 1.0 ~ 3.0 mL/min。
1.0 mL/min の場合、ピークがシャープになり、S/N 比が改善します。

カラム温度

通常、分離に最適な温度は 25 °C です。
設定可能なカラム温度は、4 ~ 40 °C です。

検出

UV, 280 nm

互換性のある溶出緩衝液

カラム	溶出緩衝液	濃度	pH
Bio-Monolith Protein A	クエン酸	0.1 M	2.5 ~ 3.0
	グリシン	0.1 M	2.5 ~ 3.0
	酢酸	5 ~ 20 %	
	HCl	12 mM ~ 0.1 M	
Bio-Monolith Protein G	クエン酸	0.1 M	2.0 ~ 2.5
	グリシン	0.1 M	2.0 ~ 2.5
	酢酸	5 ~ 20 %	
	HCl	12 mM ~ 0.1 M	



Agilent Technologies

高速分離プロトコル

カラムの動作速度は、最大で 3 mL/min です。溶出緩衝液 (移動相 B) を pH 2.5 ~ 3.0 に調整すれば、Bio-Monolith Protein A でもグラジエント表を使用できます。

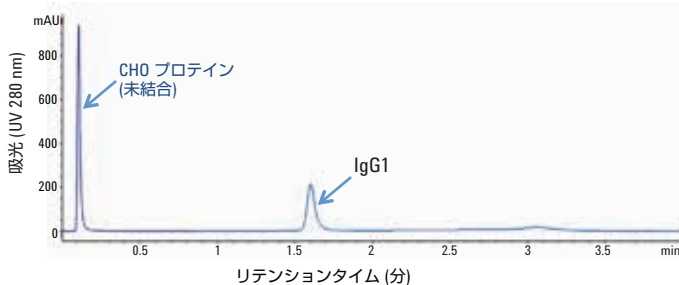
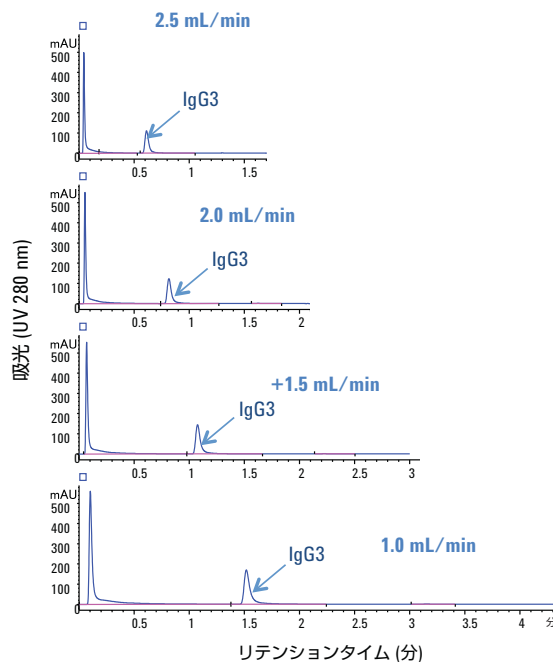
カラム: Bio-Monolith Protein G
 サンプル: IgG3 (2 mg/mL)
 注入量: 5 μ L
 移動相 A: 50 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4
 移動相 B: 0.1 M クエン酸、pH 2.0
 温度: 25 $^{\circ}$ C
 HPLC: Agilent 1260 バイオイナートクォータナリ LC
 検出: UV、280 nm

カラム: Bio-Monolith Protein A
 サンプル: CHO セルホストのセルブロテインと IgG1
 (2 mg/mL IgG1 でスパイクした 7 mg/mL の CHO セル)
 注入量: 5 μ L
 移動相 A: 50 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4
 移動相 B: 0.1 M クエン酸、pH 2.8
 流量: 1.0 mL/min (以下のグラジエント表を参照してください)

1.0 mL/min			1.5 mL/min			2.0 mL/min			2.5 mL/min		
時間 (分)	% A	% B	時間 (分)	% A	% B	時間 (分)	% A	% B	時間 (分)	% A	% B
0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0
0.4	100	0	0.3	100	0	0.2	100	0	0.1	100	0
0.5	0	100	0.4	0	100	0.3	0	100	0.2	0	100
2.0	0	100	1.7	0	100	1.2	0	100	0.8	0	100
2.1	100	0	1.8	100	0	1.3	100	0	0.9	100	0
4.2	100	0	3.2	100	0	2.2	100	0	1.7	100	0

抗体	抗体	Protein A	Protein G	抗体フラグメント	Protein A	Protein G
人体	人体 IgG1	++++	++++	人体 Fab	+	+
	人体 IgG2	++++	++++	人体 F(ab') ₂	+	+
	人体 IgG3	-	++++	人体 scFv	+	-
	人体 IgG4	++++	++++	人体 Fc	++	++
	人体 IgA	++	-	人体 K	-	-
	人体 IgD	++	-	人体 λ	-	-
	人体 IgE	++	-			
	人体 IgM	++	-			
マウス	マウス IgG1	+	++	各抗体の Protein A と Protein G の相対親和性。		
	マウス IgG2a	++++	++++	++++ = 強い親和性		
	マウス IgG2b	+++	+++	++++ = 中程度の親和性		
	マウス IgG3	++	+++	++++ = 弱い親和性		
	マウス IgM	+/-	-	+= 非常に弱い親和性		
				- = 親和性なし		

カラム選択のガイドライン。Protein A および Protein G と抗体 [1, 2] の結合親和性



参考文献

- Richman, D. D.; Cleveland, P. H.; Oxman, M. N.; Johnson, K. M. The binding of 1.Staphylococci protein A by the sera of different animal species.J. Immunol.**1982**, 128, 2300-2305.
- Frank, M. B. Antibody Binding to Protein A and Protein G beads; 5.In Molecular Biology Protocols; Frank, M. B., Ed.; Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA, **1997**.

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等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. 2015
 Printed in Japan, August 1, 2015
 5991-6105.JAJP



Agilent Technologies