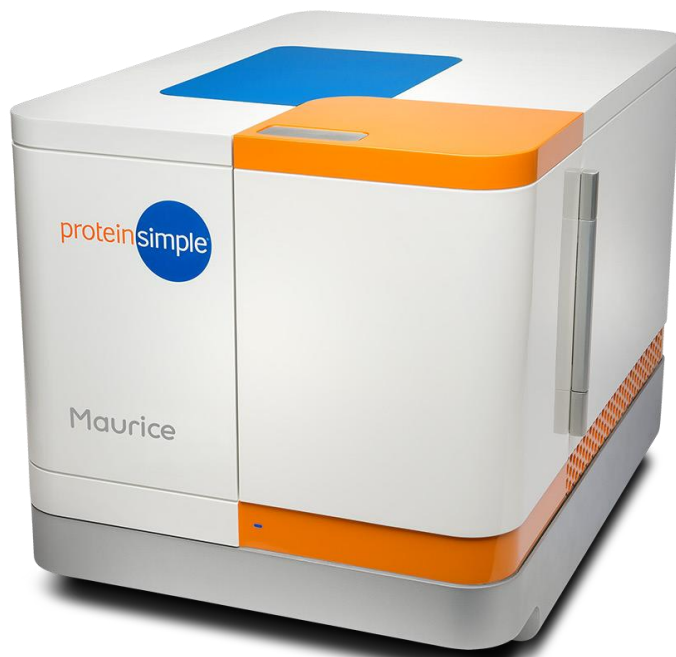


# Maurice システム cIEF (キャピラリー等電点電気泳動) メソッド開発ガイド



## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

### イントロダクション

Maurice cIEF Method Development Kit は、メソッド開発に必要な全ての消耗品をワンセットにしたキットで、多種多様なタンパク質に対応できるように、全てのサンプル前処理試薬、広い範囲の Ampholyte（両性電解質）、pI マーカー、および添加剤が含まれています。また Maurice の測定準備ができていないかを確認するための System Suitability Kit（システム適合性キット）も含まれています。このメソッド開発ガイドはあらゆるステップで役立ちます。複数の分子に利用できる Maurice の汎用性が高いメソッドにより、メソッド開発はかつてないほど容易になりました。

### cIEF Method Development Kit の内容 (P/N PS-MDK01-C)

#### pI マーカー

-20 °C 保存。

製品番号	説明	数量/容量*
046-028	Maurice cIEF pI Marker - 3.38	1 × 210 µL
046-029	Maurice cIEF pI Marker - 4.05	1 × 210 µL
046-030	Maurice cIEF pI Marker - 5.85	1 × 210 µL
046-031	Maurice cIEF pI Marker - 6.14	1 × 210 µL
046-032	Maurice cIEF pI Marker - 7.05	1 × 210 µL
046-033	Maurice cIEF pI Marker - 8.40	1 × 210 µL
046-034	Maurice cIEF pI Marker - 9.99	1 × 210 µL
046-035	Maurice cIEF pI Marker - 10.17	1 × 210 µL

\*精製水で調整後。

### 試薬

2–8 °C 保存

製品番号	試薬名	説明	数量/容量
102506	iCE Electrolyte Kit	Anolyte solution（陽極液）：0.1%のメチルセルロース中に 0.08 M の H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 含有。 Catholyte solution（陰極液）：0.1%のメチルセルロース中に 0.1 M の NaOH 含有。	各 2 × 10 mL
101876	1% MC	1%の Methyl Cellulose（メチルセルロース）	1 × 10 mL
102505	0.5% MC	0.5%の Methyl Cellulose（メチルセルロース）	2 × 10 mL
046-025	Maurice cIEF Fluorescence Calibration Standard	cIEF キャリブレーション用蛍光スタンダード	1 × 5.5 mL
042-691	500 mM arginine	500 mM のアルギニン。陰極スペーサーとして使用。	1 × 500 µL
046-574	SimpleSol Protein Solubilizer	cIEF 用 SimpleSol タンパク質可溶化剤のストック溶液。	1 × 24 mL
単独非販売品	Urea	凍結乾燥状態の尿素	5 バイアル
046-044	Maurice cIEF System Suitability Kit	このキットには凍結乾燥状態の System Suitability ペプチドパネル 8 本、System Suitability Test Mix 1 本を含む。	各 1 mL

### AMPHOLYTES（両性電解質）

2–8 °C 保存。

pH の範囲	説明	数量/容量
3–10	Pharmalyte pH 3–10 (Pharmalyte PN 17-0456-01)	1 × 200 µL
5–8	Pharmalyte pH 5–8 (Pharmalyte PN 17-0453-01)	1 × 100 µL
8–10.5	Pharmalyte pH 8–10.5 (Pharmalyte PN 17-0455-01)	1 × 200 µL
2.5–5	Pharmalyte pH 2.5–5 (Pharmalyte PN 17-0451-01)	1 × 100 µL
2–9	Servalyte 2–9 (seed grade) (Servalyte PN 42935)	1 × 50 µL

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

### 別途要購入品

- cIEF Cartridges, PN PS-MC02-C
- Maurice sample vials with integrated inserts, 0.2 mL, PN 046-083、もしくは 96-well plates, PN 046-021
- Maurice glass reagent vials, 2 mL, PN 046-017
- Maurice clear screw caps for sample and reagent vials, PN 046-138
- Maurice cIEF blue pressure caps, PN 046-573
- 精製水
- ピペットおよびピペットチップ
- 卓上遠心機およびチューブ
- 氷とアイスバケット（保冷用）
- ボルテックス
- プレート、もしくはバイアルアダプター (12 mm, 2 mL vials) 対応遠心機

**注:** 測定中 96-well plate (96 穴プレート) にシールをす  
る必要がある場合、4titude Pierceable Film (PN 4ti-0566,  
4titude)を推奨します。吸光度、ネイティブ蛍光検出モ  
ードの両方で使用可能です。現在 X-Pierce adhesive film  
(PN XP-100, Excel Scientific)を使用している場合、吸光度検  
出モードのみでの使用を推奨します。

### バッファー交換

- Amicon Ultracel 50K membrane centrifugal filter  
(Millipore, PN 4311)

**注:** タンパク質に適した分子量カットオフフィルターを  
選択してください。

- 1M Tris-HCl buffer pH 7.0 (Life Technologies, PN AM9851)

### サンプルの変性

- Urea, electrophoresis grade (Sigma-Aldrich, PN U6504)
- SimpleSol Protein Solubilizer (PN 046-574, 046-575)

**注:** タンパク質の沈殿を防ぐために 8 M の尿素が必要な  
場合、尿素を別途購入する必要があります。

### 良い結果へのガイドライン

- 凍結乾燥状態の尿素は乾燥された状態で保存する必要  
があり、乾燥剤入りのホイル袋に入っています。開封  
後は必ず再封してください。
- 尿素は毎回新たに調製する必要があります。尿素溶解  
後は、その日のうちに使用し、再利用はしないでくだ  
さい。
- 凍結乾燥のペプチドを溶解後は、等分して -20°C で保  
存してください。溶解後のペプチドは 4°C で 1 か月、-  
20°C で 6 か月保存できます。
- Maurice pI マーカーはサンプル溶液で 100 倍希釈して  
使用します。
- 測定を始める前に、このメソッド開発ガイド全体を必  
ずお読みください。

### メソッド開発の概要

正しく設定し cIEF メソッドを最適化すると以下の結果  
をもたらします:

- ネイティブ蛍光と吸光度検出モードの両方で安定した  
シグナル
- 再現性の高いピークプロファイル
- 対象アプリケーションでの良好なピーク分離度

Maurice cIEF のメソッド開発は、幅広い pH 範囲でアッセ  
イを開始し、通常は数パラメーターを最適化するだけで  
十分です。この幅広い pH 勾配のアッセイでも通常十分  
なパフォーマンスをもたらす、さらに最適化する必要は  
ありません。複雑なピークプロファイル、吸光度と蛍光  
検出モード間でシグナルの乖離、可溶化が困難な難しい  
分子などの場合は、図 1 のストラテジーに従ってメソッ  
ドを最適化します。最初のステップで、一般的な pH 3-  
10 で化合物をスクリーニングし、分離電流や、蛍光あ  
るいは吸光度検出でのピークの高さ、ピークプロファイ  
ルの再現性を評価します。再現性のあるプロファイルが  
得られたら、必要に応じて、広い範囲の両性電解質の濃  
度を上げるか、狭い範囲の両性電解質を加えて、分離度  
を改善します。

Maurice cIEF メソッド開発ガイド

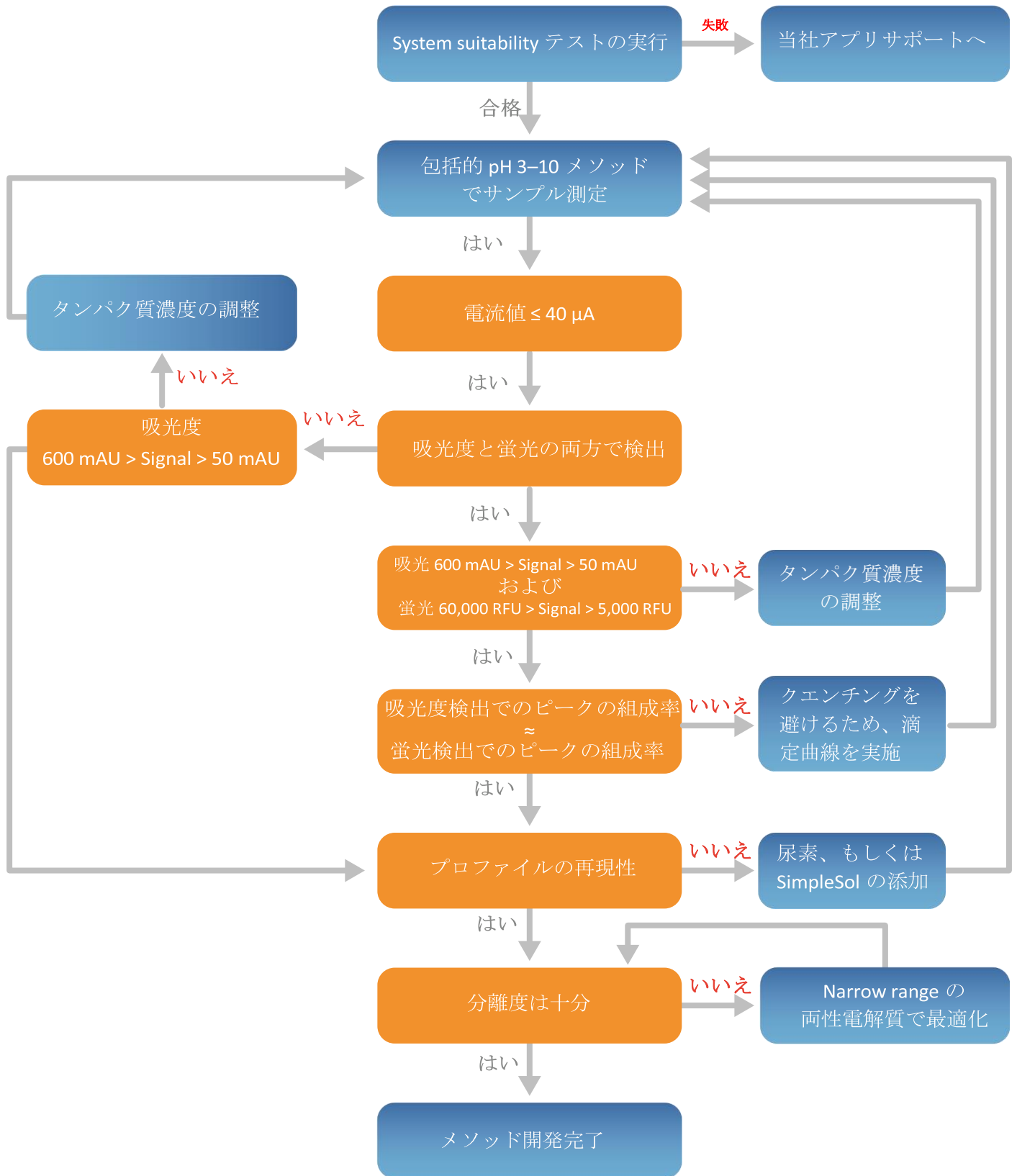


図 1. メソッド開発ワークフロー

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

### ステップ 1: Maurice の性能チェック

Maurice cIEF Method Development Kit には、メソッド開発を開始する前に、Maurice が正しく機能しているか確認するためのシステム適合性 (System Suitability) テストサンプルが含まれています。

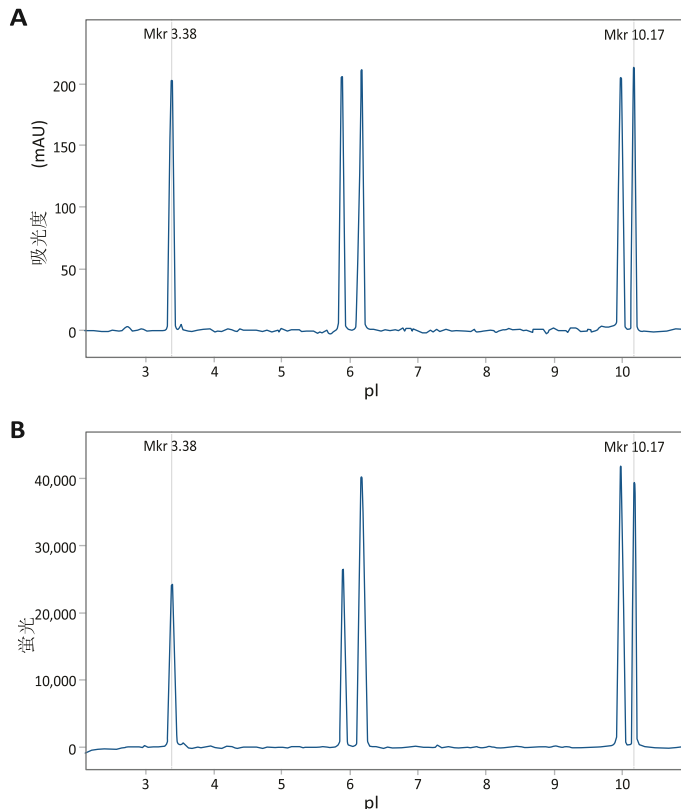


図 2. System Suitability テストにおける UV 吸光度測定結果 (A) と蛍光測定結果 (B).

#### System Suitability ペプチドパネルの準備

1. シールストリップ部分を残して、ホイルパッケージの上部をハサミで切り取ります。
2. ホイルパッケージ中の連結チューブを取り出し、凍結乾燥状態の System Suitability ペプチドパネルの入った透明なチューブを連結チューブから切り外します。残りのチューブは元のパッケージに戻し、しっかりとシールをして 2–8 °C で保存します。
3. ピペットチップでチューブ上のホイルに穴を開けます。
4. 40  $\mu$ L の精製水をチューブに加えます。溶液をピペティングで穏やかに溶解し、混合します。

5. 溶解したばかりのペプチドパネルチューブに、160  $\mu$ L の System Suitability Test Mix を加えます。溶液をピペティングで穏やかに混合します。この溶液を遠心チューブ (1.5 mL など) に移します。
6. チューブを 3 回、それぞれ 5 秒間ボルテックスします。
7. チューブを 10,000 $\times$ g で 3 分間遠心し、微粒子を沈殿させます。
8. ピペットで溶液上部から 160  $\mu$ L の溶液をゆっくり吸引し、96 穴プレートもしくは、サンプルバイアルに移します。気泡が入らないよう、溶液を分注する際は、ピペットの先端をプレートのウェルまたはインサートの底まで入れます。

**注:** サンプルバイアルもしくはプレートのウェルの底に気泡がないか必ず確認し、取り除きます。

9. バイアルを使用する場合、透明なスクリーキャップでサンプルバイアルを閉じます。
10. 適切な遠心アダプターをセットし、サンプルプレートもしくはサンプルバイアルを 1000 $\times$ g で 5 分間遠心します。

#### MAURICE のセットアップと測定開始

1. バッチ (各インジェクションをグループ化したもの) で使用する試薬を準備し、Maurice にセットします。準備の詳細は 15 枚目「付録 A: 試薬の準備」を参照してください。
2. Maurice に金属製の 96 穴プレート用インサート、もしくは金属製のバイアル用インサートをセットし、サンプルプレートもしくはバイアルをインサートにセットします。
3. 15 枚目「付録 B: cIEF カートリッジの準備」の手順に従ってカートリッジを準備し、Maurice に取り付けます。
4. Compass for iCE を起動します。
5. Batch スクリーンをクリックします。
6. File メニューより **New Batch** をクリックします。サイズ (分子量) とチャージ (等電点) の両方のアッセイが実行可能な Maurice の場合、Maurice cIEF を選択します。

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

- Layout ペインでサンプルの場所をハイライト表示し、**Add** をクリックしてサンプルを追加します。
- デフォルトの **System Suitability method** を使用し、下記のパラメーターを使用します。

メソッドのパラメーター	設定
プリフォーカス	時間: 1.0 分 電圧: 1500 V
フォーカス	時間: 4.5 分 電圧: 3000 V
検出	吸光度: 0.005 秒 蛍光: 3, 5, 10, 20 秒
サンプルロード時間	55 秒
スタンダード	pl 3.38: 300 ピクセル pl 10.17: 1800 ピクセル

- 各サンプルを 2 回連続で反復インジェクションします。Injections ペインでインジェクションをハイライトし、**Replicate** をクリックして、2 回目のインジェクションを追加します。
- バッチを保存します。
- Start** をクリックします。

### 予想される結果

- 結果を確認します。システムが正しく機能している場合、以下の結果が得られます:
  - 図 2A と 2B で示されるような 3.38、5.85、6.14、9.99、および 10.17 の 5 つの pI マーカーのピーク。
  - 5.85 と 6.14 の pI マーカーの推定 pI は、COA (Certificate of Analysis) で指定された範囲内に収まる。
  - ピークの高さ (Peak heights) が >100 mAU を超え (露光時間 0.005 秒の吸光度検出モード)、<60,000 RFU 未満 (露光時間 10 秒の蛍光検出モード)。
  - 6.14 の pI マーカーの分離度 (Resolution) が 2.1 以上で、10.17 の pI マーカーは 1.7 以上 (露光時間 10 秒の蛍光モード)。

**注:** 各ペプチドの一次アミノ酸配列が異なるため、蛍光発光に影響を及ぼし、System suitability ペプチドの相対的なピークの高さは吸光度と蛍光測定の間で変化します。

- System Suitability test の結果が想定外の場合、cIEF カートリッジを交換し、再度テストを行うことをお勧めします。新しいカートリッジでも改善が見られない場合は、新しい System Suitability テストサンプルを準備して再度お試しください。System Suitability テストが再び想定外の場合、[info.japan@proteinsimple.com](mailto:info.japan@proteinsimple.com) でアプリサポートへお問い合わせください。

## Step 2: メソッド開発

分子を個別に、もしくはまとめてスクリーニングすることもできます。複数の化合物をスクリーニングする場合は、最初に大容量の cIEF マスターミックスを準備することをお勧めします。この準備を行うと、等分したマスターミックスを、1.0 mg/mL のサンプルタンパク質溶液に 4 : 1 の体積比で分注することで、簡単にサンプル溶液を調製することができます。次のセクションでは、1 つまたは複数のサンプルを準備するために必要な手順を示します。

サンプル成分、特に塩により、cIEF メソッドの分離度と堅牢性を損なうことがあります。サンプル溶液の塩濃度が 15 mM を超えると、pH 勾配が圧縮され、高い分離電流を発生し、カートリッジに損傷を与えることがあります。タンパク質濃度が高い場合、タンパク質をサンプル溶液の中で最終使用濃度 (0.2 mg/mL) に希釈することで、Maurice cIEF 分析を成功させるのに十分、イオン強度を下げるすることができます。高塩濃度の低濃度タンパク質サンプルの場合、以下のいずれかのアプローチに従ってメソッドを最適化することができます:

- バッファー交換し塩濃度を下げる、もしくは塩を除去する、または
- サンプルを希釈し、より高感度の蛍光検出モードで検出する。

### サンプル溶液の準備

最初のスクリーニングでは、サンプルの最終タンパク質濃度は ~0.2 mg/mL で、塩濃度は 15 mM 未満である必要があります。例えば、150 mM の NaCl を含む 2 mg/mL サンプルの場合、2 倍希釈後にマスターミックスで 5 倍希釈すると、最終的な混合液には 0.2 mg/mL のタンパク質と 15 mM の NaCl が含まれます。

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

cIEF マスターミックス	単一サンプル		マスターミックス ((単一サンプル×X) + 20%)			
サンプル数	1	2	3	4	5	6
精製水	74 µL	178 µL	266 µL	355 µL	444 µL	459 µL
1% Methyl Cellulose (MC)	70 µL	168 µL	252 µL	336 µL	420 µL	504 µL
Pharmalyte 3–10	8 µL	19.2 µL	29 µL	38 µL	48 µL	58 µL
500 mM Arginine	4 µL	9.6 µL	14.4 µL	19.2 µL	24 µL	29 µL
pI Marker 9.99	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	12 µL	14.4 µL
pI Marker 4.05	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	12 µL	14.4 µL
<b>合計量</b>	<b>160 µL</b>	<b>384 µL</b>	<b>576 µL</b>	<b>768 µL</b>	<b>960 µL</b>	<b>1152 µL</b>

表 1. cIEF マスターミックス溶液

サンプルのタンパク質濃度が低い、あるいは塩濃度が高い場合、推奨する塩濃度に達しないことがあります。塩濃度が高い場合やタンパク質濃度が低い場合、メソッドの感度を犠牲にすることなくタンパク質サンプルをさらに希釈できる、蛍光検出モードを使用することを強くお勧めします。さらに希釈しても望ましい結果が得られない場合、サンプルを脱塩することをお勧めします。サンプルの脱塩と濃縮の手順については、「付録 C：サンプルの脱塩と濃縮」を参照してください。

- 各サンプルを精製水で 1 mg/mL に希釈します。サンプルが 1 mg/mL 未満の場合、サンプルを濃縮することをお勧めします。手順については「付録 C：サンプルの脱塩と濃縮」を参照してください。
- 表 1 のスクリーニングするサンプル数の試薬量に従って cIEF マスターミックスを準備します。スクリーニングするサンプルの数=X としています。
- 各サンプル用に 160 µL の cIEF マスターミックス溶液をマイクロ遠心チューブに分注します。
- 1.0 mg/mL のサンプル 40 µL を、160 µL の cIEF マスターミックス溶液の入ったチューブに加えます。
- 各サンプルをボルテックスで完全に混合します。
- 13,000×g で 5 分間遠心して気泡を除去し、気泡によるスパイクを最小限に抑えます。
- ピペットで溶液上部から 160 µL の溶液をゆっくり吸い、96 穴プレートのウェルもしくはインサート付きバイアルにピペットで移します。溶液を分注する際は、

気泡が入らないように、ピペットのチップをバイアルインサートもしくはウェルの底まで完全に入れます。

- 適切な遠心アダプターを使用して、サンプルプレートまたはサンプルバイアルを 1000×g で 5 分間遠心します。

### MAURICE 本体のセットアップと測定開始

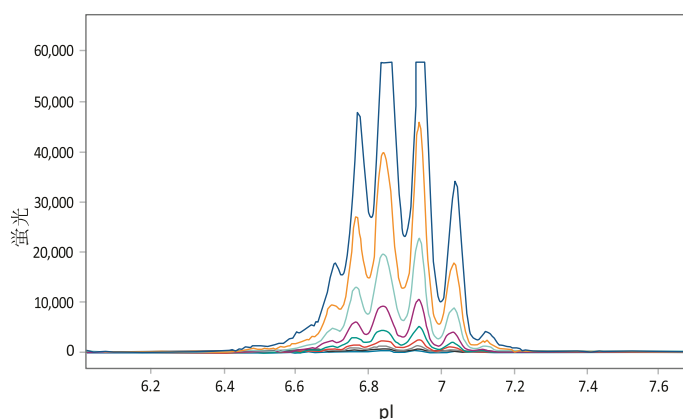
- バッチ試薬を準備し、Maurice にセットします。準備の詳細については、「付録 A：試薬の準備」を参照してください。
- 金属性の 96 穴プレート用もしくはバイアル用のインサートを Maurice にセットします。
- 「付録 B：cIEF カートリッジの準備」の手順に従ってカートリッジを準備し、Maurice にセットします。
- Compass for iCE ソフトを起動します。
- Batch スクリーンをクリックします。
- File メニューから **New Batch** をクリックします。サイズ (分子量) とチャージ (等電点) の両方のアッセイが実行可能な Maurice の場合は、**Maurice cIEF** を選択します。
- Layout ペインでサンプルの場所をハイライト表示し、**Add** をクリックしてサンプルを追加します。
- 新しいメソッドを作成し、次ページの表に示すようにパラメーターを設定します。

メソッドのパラメーター	設定
プリフォーカス	時間: 1.分 電圧: 1500 V
フォーカス	時間: 8.0 分 電圧: 3000 V
検出	吸光度: 0.005 秒 蛍光: 3, 5, 10, 20 秒
サンプルロード時間	55 秒
スタンダード	pI 4.05: 250 ピクセル pI 9.99: 1800 ピクセル

9. サンプルごとに2回連続で反復インジェクションをします。Injections ペイン内のインジェクションを選択してハイライト表示し、**Replicate** をクリックし、2回目のインジェクションを追加します。

10. バッチを保存します。

11. **Start** をクリックします。



**図 3.** 蛍光検出モードでの mAb（モノクローナル抗体）のシグナルの飽和。250 µg/mL、蛍光露光時間 30 秒（青色のトレース）では、2つの最も顕著なアイソフォームが飽和を示している。各トレースは mAb を 0.977～250 µg/mL まで 2 倍連続希釈。各サンプルは 0.35% Methyl cellulose、4% Pharmalyte 3-10、10 mM アルギニンおよび 10 mM イミノ二酢酸（陽極スペーサー）を含む。サンプル溶液は最初に 1500 V で 1 分間、続いて 3000 V で 6 分間の泳動分離を実施。

## 結果のレビューと最適化

1. 吸光度測定でのサンプル濃度の最適化。Maurice は吸光度のシグナル感度と直線性ダイナミックレンジに関して、iCE280 と iCE3 システムと同等の結果が得られるように設計されています。3つのシステムの唯一の違いは、Maurice は mAU で結果を報告しますが、iCE280 と iCE3 システムは AU (1000 mAU=1 AU) で結果を報告します。各サンプルの最初の結果を確認し、最大/メインピークが 600 mAU を超えないようにサンプル濃度を調整します。すべてのメインピークは 50 mAU 以上、600 mAU 以下である必要があります。

**注:** メインピークとは、少なくとも総ピーク面積の 20% を占めるピークです。

2. 蛍光測定でのサンプル濃度の最適化。蛍光シグナルを最適化する際、シグナルの飽和とクエンチング（消光）によって引き起こされるアーティファクトを回避することが重要です。これらの事象はいずれも、タンパク質濃度に対するシグナルの線形応答（直線性）に影響します。シグナルの飽和は、最大値近くで平坦になるピーク形状によって特定でき、不正確な定量結果をもたらします（図 3、青いトレース）。最も強いピークが 60,000 蛍光ユニット以下になるように露光時間を短縮することで、シグナルの飽和を簡単に回避することが可能です。Maurice は、複数の露光時間で蛍光測定を行うため、シグナルの飽和の特定と回避が容易になります。あるいは、サンプルのタンパク質濃度を下げると、シグナルが減少して、飽和現象がなくなり、ピーク形状と定量性が向上します。

シグナルクエンチングは、化合物に依存する現象で、複数の最も大きな電荷アイソフォームで発生する可能性があります。それらの蛍光発光を抑制してシグナルを低下させます（図 4）。吸光度検出モードと蛍光検出モード間でピークの高さと総ピーク面積の結果を比較することで、クエンチングを簡単に検出することができます。図 4 で示すように、吸光度プロファイルと比較すると、相対的に少ないアイソフォームに対してメインピークの相対強度は低下しています。メインピークのシグナル直線性を回復するには、サンプル濃度を下げる必要があります。蛍光測定に最適な濃度範囲を特定するには、化合物の希釈系列を測定し、検量線を描き、タンパク質の濃度に対して総ピーク面積をプロットします。最適なサンプル濃度では、タンパク質濃度と総ピーク面積との間に強い線形相関が見られます。

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

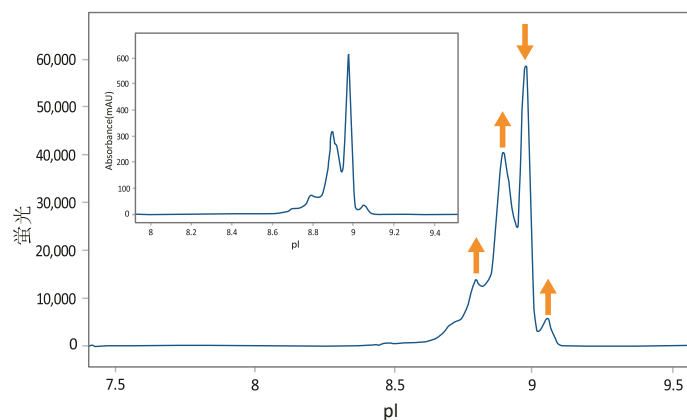


図 4. 蛍光検出モードにおける mAb のシグナルクエンチング。  
250 µg/mL で 20 秒の蛍光露光時間において、メインピークの蛍光シグナルの抑制はクエンチングによるものです。サンプルには、0.35% メチルセルロース、2M 尿素、6% Pharmalyte 3-10、陰極（陰極）スペーサーとして 10 mM アルギニン、および陽極（陽極）スペーサーとして 10 mM イミノ二酢酸を含む。最初に 1500 V を 1 分間、次に 3000 V で 7 分間泳動することによりサンプル溶液を分離した。

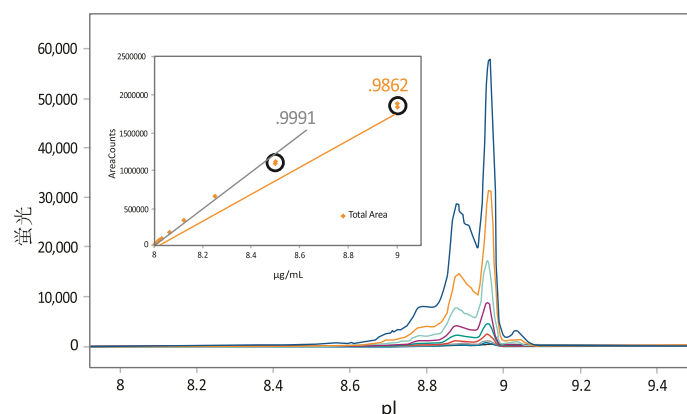


図 5. mAb ネイティブ蛍光シグナルの線形ダイナミックレンジの特性評価。2つの線形回帰線を示すタンパク質濃度に対する蛍光総ピーク面積のプロットグラフ：オレンジ色の線はすべてのデータポイントを含み、灰色の線は 250 と 500 µg/mL のデータポイントを除外して線形回帰分析。ピークのトレースは、0.488 から 125 µg/mL までの mAb の 2 倍連続希釈によるもの。各サンプルは、0.35% メチルセルロース、2M 尿素、6% Pharmalyte 3-10、10 mM アルギニン（陰極スペーサー）、および 10 mM イミノ二酢酸（陽極スペーサー）を含む。最初に 1500 V を 1 分間、次に 3000 V で 7 分間泳動することによりサンプル溶液を分離した。

図 5 のグラフは、250 と 500 µg/mL (○で囲んだ点) のサンプルのシグナルが、オレンジ色の線形回帰線で示されているように、クエンチングにより線形関係から大きく外れていることを示しています。この mAb を 125 µg/mL 以下の濃度で測定すると、クエンチング現象が回避され、灰色の線形回帰曲線で示されるように、電荷プロファイルの全ピークは線形定量が可能になります (図 5)。

3. インジェクションプロファイルの評価。各サンプルについて、両方のインジェクションを見て、ピークプロファイルと比較します。図 8 に示されているように、ピークプロファイルは再現可能である必要があります。反復サンプルインジェクションでピークプロファイルが異なる場合は、次のセクションに進みます。反復ピークプロファイルに再現性がある場合は、「分離度の最適化」セクションに進んでください。

### 再現性のないピークプロファイル

ピークプロファイルに再現性のない場合、主に 2つの原因があり、それはサンプルの凝集と沈殿です (図 6 と 7)。サンプルの凝集は等電点電気泳動によって引き起こされ、必ずしもサンプルに由来するわけではありませんが、等電点電気泳動中に非抗体タンパク質の 50%以上が沈殿する可能性があります。図 6 に示すサンプルは、等電点付近でのタンパク質の沈殿に起因する再現性のないスパイクを示しています。

再現性のないピークプロファイルは、タンパク質可溶化剤で簡単に対処することができます。40%の SimpleSol タンパク質可溶化剤（調製したサンプルの最終濃度）または 4 M の尿素をサンプル溶液に加えると、ほぼ必ずサンプルで凝集がなくなります。40%の SimpleSol または 4M の尿素から始めることをお勧めします。これにより再現性のあるピークプロファイルが得られますが、サンプルに使用する添加剤の量を制限したい場合は、より低い濃度を使用してサンプルをスクリーニングすることができます。1つのバッチで 20%と 40%の両方の SimpleSol または 2 M と 4 M の尿素をスクリーニングする場合は、次のセクションの手順を参照してください。

サンプルの準備後、以前に使用したものと同一メソッドパラメーターで、各サンプルを 2 回反復インジェクションするバッチを設定します。バッチ実行後、図 8 に示すように、両方のインジェクション結果を見て、ピークプロファイル（再現可能でなければなりません）を比較します。

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

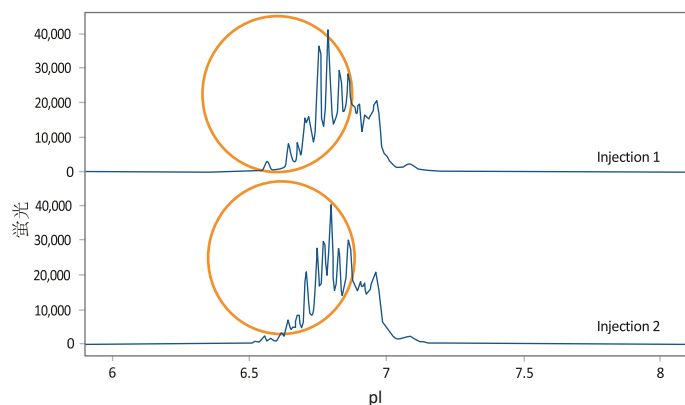


図 6. 電荷プロファイルの再現性に影響を与える沈殿/凝集。250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 20 秒のネイティブ蛍光露光時間で、2 回反復インジェクションすると、この mAb の電荷プロファイルに再現性のないスパイクが見える。各サンプルには、0.35% メチルセルロース、4% Pharmalyte 3-10、10 mM アルギニン（陰極スペーサー）、および 10 mM イミノ二酢酸（陽極スペーサー）を含む。最初に 1500 V を 1 分間、続けて 3000 V で 6 分間泳動しサンプル溶液を分離した。

サンプルの反復インジェクションで再現性が得られない場合は、SimpleSol または尿素有量を増やす必要があります（サンプルの変性手順については、付録 D を参照してください）。反復インジェクション間で再現性があり、分離度が許容範囲内であれば、メソッド開発は完了です（図 7 および 8）。よりはっきりとピークを分離する必要がある場合は、「分離度の最適化」セクションに進んでください。

### 再現性のないピークプロファイルへの対応

SimpleSol を適量追加（準備したサンプル中の最終濃度が 20-40%）または尿素有量を溶解します。:

1. 1 本の凍結乾燥の尿素有量を含んだバイアルに、320  $\mu\text{L}$  の精製水を加えます。
2. ボルテックスで尿素有量を溶解します。これにより、合計 560  $\mu\text{L}$ 、10 M の尿素有量となります。

**注:** 毎回フレッシュな尿素有量を準備します。尿素有量の溶解後、その日のうちに使用し、再利用しないこと。

3. SimpleSol または尿素有量を含む 4% Pharmalyte pH 3-10 で 200  $\mu\text{L}$  のサンプル溶液を準備します:

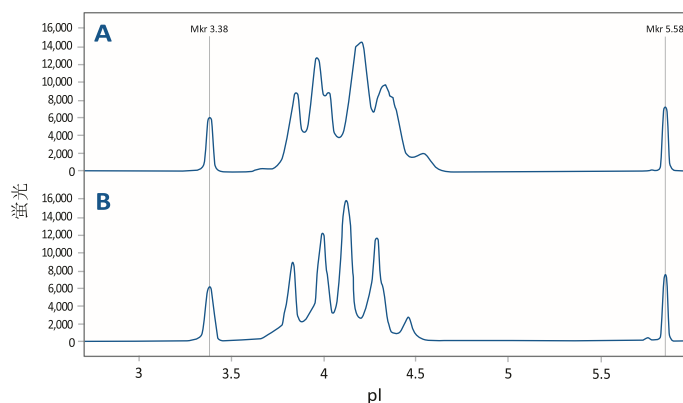


図 7. サンプル溶液に SimpleSol を加えて、組換えヒトエリスロポエチン (EPO; R&D Systems PN 286-EP) の沈殿/凝集を防止。

(A) SimpleSol 無添加サンプルのインジェクション。(B) 40% SimpleSol 添加サンプルのインジェクション。200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 20 秒のネイティブ蛍光露光時間において、SimpleSol 無添加サンプルのインジェクションでは分離度が低い (A)。サンプル溶液に 40% SimpleSol を加えると、ピークはよく分離し、電荷プロファイルの再現性が高い (B)。サンプルには、0.35% メチルセルロース、3.5% Pharmalyte 2.5-5、0.5% Servalyte 3-5、および 10 mM イミノ二酢酸を陽極スペーサーとして含み、40% SimpleSol は添加もしくは無添加。最初に 1500 V を 1 分間、続けて 3000 V で 12 分間泳動することによりサンプル溶液を分離した。

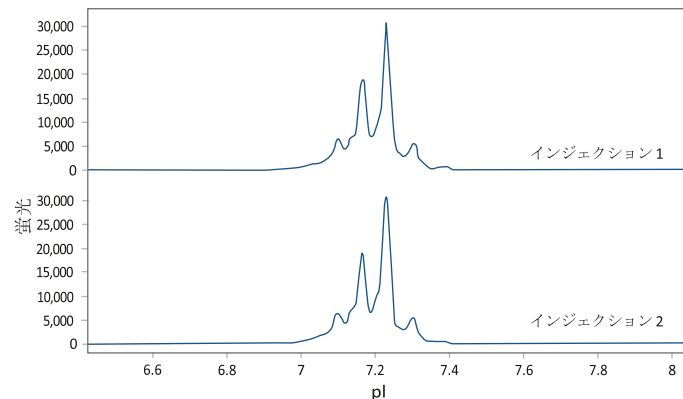


図 8. サンプル溶液に尿素有量を添加し、mAb の沈殿/凝集を排除。250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と 20 秒のネイティブ蛍光露光時間で、2 回反復インジェクションでは、mAb サンプル溶液に 2M 尿素有量を添加後、再現性の高い電荷プロファイルを示した。サンプルには、0.35% メチルセルロース、2M 尿素有量、4% Pharmalyte 3-10、10mM アルギニン（陰極スペーサー）、および 10 mM イミノ二酢酸（陽極スペーサー）を含む。最初に 1500 V を 1 分間、続けて 3000 V を 7 分間泳動しサンプル溶液を分離した。

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

cIEF マスターミックス	単一サンプル	マスターミックス ((単一サンプル×X) + 20%)				
サンプル数	1	2	3	4	5	
精製水	0 µL	0 µL	0 µL	0 µL	0 µL	
1% MC	70 µL	168 µL	252 µL	336 µL	420 µL	
*10M の尿素 /SimpleSol	80 µL	192 µL	288 µL	384 µL	480 µL	
Pharmalyte 3–10	8 µL	19.2 µL	29 µL	38 µL	48 µL	
500 mM Arginine	4 µL	9.6 µL	14.4 µL	19.2 µL	24 µL	
pI marker 9.99	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	12 µL	
pI marker 4.05	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	12 µL	
<b>総容量</b>	<b>166 µL</b>	<b>398 µL</b>	<b>598 µL</b>	<b>797 µL</b>	<b>996 µL</b>	

表 2. cIEF マスターミックス中の 40% SimpleSol または 4 M 尿素入り 4% Pharmalyte pH 3–10 (最大タンパク質サンプル量= 34 µL)。

\*注 : タンパク質可溶化剤として SimpleSol または尿素のいずれかを選択してください。両方を混ぜないでください。

cIEF マスターミックス	単一サンプル	マスターミックス ((単一サンプル×X) + 20%)				
サンプル数	1	2	3	4	5	
精製水	40 µL	88 µL	132 µL	176 µL	208 µL	
1% MC	70 µL	168 µL	252 µL	336 µL	420 µL	
*10M の尿素 /SimpleSol	40 µL	96 µL	144 µL	192 µL	240 µL	
Pharmalyte 3–10	8 µL	19.2 µL	29 µL	38 µL	48 µL	
500 mM Arginine	4 µL	9.6 µL	14.4 µL	19.2 µL	24 µL	
pI marker 9.99	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	12 µL	
pI marker 4.05	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	12 µL	
<b>総容量</b>	<b>166 µL</b>	<b>390 µL</b>	<b>586 µL</b>	<b>781 µL</b>	<b>964 µL</b>	

表 3. cIEF Master Mix 中の 20% SimpleSol または 2 M 尿素入り 4% Pharmalyte pH 3–10 (タンパク質の最大サンプル量= 34 µL)。

\*注 : タンパク質可溶化剤として SimpleSol または尿素のいずれかを選択してください。両方を混ぜないでください。

- 最初のサンプルスクリーニングで決定した最適なタンパク質濃度に各サンプルを希釈します。
- 表 2 または表 3 で示されている容量で、cIEF マスターミックスを準備します。スクリーニングするサンプルの数=X。
- 各サンプル用マイクロ遠心チューブに 166 µL の cIEF マスターミックスを加えます。
- 34 µL の 1.0 mg/mL のサンプルを 166 µL の cIEF マスターミックスを含んだチューブに加えます。
- 各サンプルをボルテックスで完全に混合します。

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

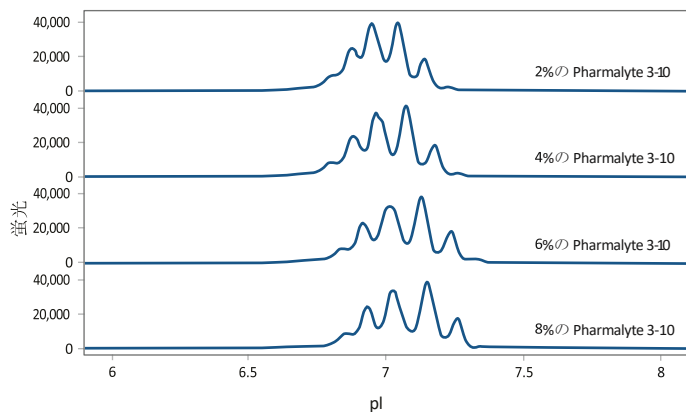
- f. 13,000xg で 5 分間遠心して、気泡を取り除き、シグナルのスパイクを最小限に抑えます。
- g. ピペットで溶液上部から 160  $\mu$ L の溶液をゆっくり吸引し、インサート付きサンプルバイアルまたは 96 穴プレートのウェルに分注します。溶液を分注する際は、気泡が入らないように、ピペットチップをインサートまたはウェルの底まで完全に入れることをお勧めします。

**注:** サンプルバイアルやウェルの底に気泡がある場合は取り除いてください。

- h. バイアルを使用する場合は、透明なスクリーキャップでサンプルバイアルを閉じます。
- i. 適切な遠心アダプターを使用して、サンプルプレートまたはサンプルバイアルを 1000xg で 5 分間遠心します。

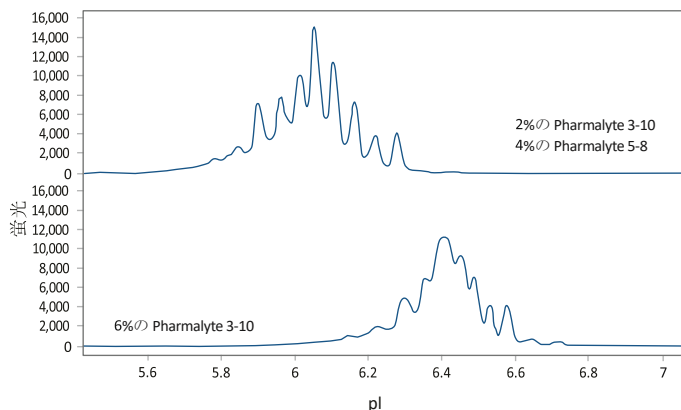
### 分離度の最適化

より高いピーク分解度が必要な場合は、広い範囲の両性電解質の濃度を上げるか (図 9)、または狭い範囲の両性電解質を加えることで (図 10)、最適化が可能です。ただし、その前にピークパターンに再現性がある必要があります。迅速に分離度を向上させるには、狭い範囲のキャリア両性電解質を加えます。通常、広い pH 範囲の両性電解質の 1~5 倍の狭い範囲の両性電解質を加えます。狭い範囲の両性電解質と pH 3-10 の両性電解質の比率が 1:1 の混合溶液から始めることをお勧めします。



**図 9.** 広範囲の両性電解質の濃度を上げることで、mAb のピーク分離度の向上。サンプル 250  $\mu$ g/mL で 20 秒のネイティブ蛍光露光時間のプロファイルでは、Pharmalyte 3-10 の濃度を上げると

分離度が向上。トレースは、mAb の Pharmalyte 3-10 の応答曲線から得られたもの。各サンプルには、0.35%メチルセルロース、2~8% Pharmalyte 3-10、5~20 mM アルギニン (陰極スペーサー)、および 5~20 mM イミノ二酢酸 (陽極スペーサー) を含む。最初に 1500 V を 1 分間、次に 3000 V を 7 分間泳動することによりサンプル溶液を分離した。



**図 10.** 狭い範囲の両性電解質を加えて、融合タンパク質のピーク分離度の改善。400  $\mu$ g/mL のサンプルと 20 秒のネイティブ蛍光露光時間のプロファイルでは、狭い範囲の両性電解質 Pharmalyte 5-8 を加えると分離度が改善する。トレースは、融合タンパク質の mAb の Pharmalyte 3-10 の応答曲線から得られたもの。各サンプルには、0.35%メチルセルロース、2M 尿素、2~6% Pharmalyte 3-10 および 0~4% Pharmalyte 5-8、10 mM アルギニン (陰極スペーサー)、および 10 mM イミノ二酢酸 (陽極スペーサー) を含む。最初に 1500 V を 1 分間、続けて 3000 V を 7-10 分間泳動しサンプル溶液を分離した。

狭い範囲の両性電解質のみを使用することも可能ですが、この場合は陽極または陰極スペーサーを加える必要があります。500 mM アルギニンは、陰極スペーサーとして Method Development Kit に含まれています。

狭い範囲の両性電解質を加えると、フォーカス (集束) 時間を長くする必要があります。1500 V で 1 分間に続いて、3000 V で 10 分間フォーカスし、その後フォーカス時間を最適化することをお勧めします。表 4、5、および 6 に、一般的な狭い範囲のメソッドを載せてあります。

多くの cIEF メソッドが公開されているので、cIEF のメソッド開発とピーク分離度の最適化に関する追加情報について、これらのジャーナル出版物で確認できます。1,2,3,4,5

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

酸性メソッド	両性電解質の範囲 (pH)		低 pI マーカー	高 pI マーカー	1%の MC	精製水	*10M の尿素	*SIMPLESOL	サンプル (1 mg/mL)	プリフォーカス @ 1500 V	フォーカス @ 3000 V
	3-10	2.5-5									
4%の両性電解質 比率は 1:1 尿素/ SimpleSol 無し	4 µL	4 µL	2 µL	2 µL	70 µL	78 µL	0 µL	0 µL	40 µL	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:1 2M 尿素/20%の SimpleSol	4 µL	4 µL	2 µL	2 µL	70 µL	38 µL	40 µL	40 µL	40 µL	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:1 4M 尿素/40%の SimpleSol	4 µL	4 µL	2 µL	2 µL	70 µL	0 µL	80 µL	80 µL	38 µL	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:3 尿素/ SimpleSol 無し	2 µL	6 µL	2 µL	2 µL	70 µL	78 µL	0 µL	0 µL	40 µL	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:3 2M 尿素/20%の SimpleSol	2 µL	6 µL	2 µL	2 µL	70 µL	38 µL	40 µL	40 µL	40 µL	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:3 4M 尿素/40%の SimpleSol	2 µL	6 µL	2 µL	2 µL	70 µL	0 µL	80 µL	80 µL	38 µL	1 min	10 min

表 4. 酸性レンジメソッド。\*注: タンパク質可溶化剤として SimpleSol または尿素のいずれかを選択し、両方を混ぜないこと。

中性メソッド	両性電解質の範囲 (pH)		低 pI マーカー	高 pI マーカー	1%の MC	精製水	*10M の尿素	*SIMPLESOL	サンプル (1 mg/mL)	プリフォーカス @ 1500 V	フォーカス @ 3000 V
	3-10	5-8									
4%の両性電解質 比率は 1:1 尿素/ SimpleSol 無し	4 µL	4 µL	2 µL	2 µL	70 µL	78 µL	0 µL	0 µL	40 µL	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:1 2M 尿素/20%の SimpleSol	4 µL	4 µL	2 µL	2 µL	70 µL	38 µL	40 µL	40 µL	40 µL	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:1 4M 尿素/40%の SimpleSol	4 µL	4 µL	2 µL	2 µL	70 µL	0 µL	80 µL	80 µL	38 µL	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:3 尿素/ SimpleSol 無し	2 µL	6 µL	2 µL	2 µL	70 µL	78 µL	0 µL	0 µL	40 µL	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:3 2M 尿素/20%の SimpleSol	2 µL	6 µL	2 µL	2 µL	70 µL	38 µL	40 µL	40 µL	40 µL	1 min	10 min

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

4%の両性電解質 比率は 1:3 4M 尿素/40%の SimpleSol	2 $\mu$ L	6 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	70 $\mu$ L	0 $\mu$ L	80 $\mu$ L	80 $\mu$ L	38 $\mu$ L	1 min	10 min
--	-----------	-----------	-----------	-----------	------------	-----------	------------	------------	------------	-------	--------

表 5. 中性レンジメソッド。\*注: タンパク質可溶化剤として SimpleSol または尿素のいずれかを選択し、両方を混ぜないこと。

塩基性メソッド	両性電解質の範囲 (pH)		低 pI マーカー	高 pI マーカー	1%の MC	精製水	*10M の 尿素	*SIMPLES OL	500 mM ARGININE	サンプル (1 mg/mL)	プリフォー カス @ 1500 V	フォーカ ス @ 3000 V
	3-10	8-10.5										
4%の両性電解質 比率は 1:1 尿素/ SimpleSol 無し	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	70 $\mu$ L	74 $\mu$ L	0 $\mu$ L	0 $\mu$ L	4 $\mu$ L	40 $\mu$ L	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:1 2M 尿素/20%の SimpleSol	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	70 $\mu$ L	34 $\mu$ L	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L	4 $\mu$ L	40 $\mu$ L	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:1 4M 尿素/40%の SimpleSol	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	70 $\mu$ L	0 $\mu$ L	80 $\mu$ L	80 $\mu$ L	4 $\mu$ L	34 $\mu$ L	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:3 尿素/ SimpleSol 無し	2 $\mu$ L	6 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	70 $\mu$ L	74 $\mu$ L	0 $\mu$ L	0 $\mu$ L	4 $\mu$ L	40 $\mu$ L	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:3 2M 尿素/20%の SimpleSol	2 $\mu$ L	6 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	70 $\mu$ L	34 $\mu$ L	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L	4 $\mu$ L	40 $\mu$ L	1 min	10 min
4%の両性電解質 比率は 1:3 4M 尿素/40%の SimpleSol	2 $\mu$ L	6 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	70 $\mu$ L	0 $\mu$ L	80 $\mu$ L	80 $\mu$ L	4 $\mu$ L	34 $\mu$ L	1 min	10 min
8%の Narrow range 尿素/SimpleSol 無し	0 $\mu$ L	12 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	70 $\mu$ L	74 $\mu$ L	0 $\mu$ L	0 $\mu$ L	4 $\mu$ L	36 $\mu$ L	1 min	10 min
8%の Narrow range 2M 尿素/20%の SimpleSol	0 $\mu$ L	12 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	70 $\mu$ L	34 $\mu$ L	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L	4 $\mu$ L	30 $\mu$ L	1 min	10 min

表 6. 塩基性レンジメソッド。\*注: タンパク質可溶化剤として SimpleSol または尿素のいずれかを選択し、両方を混ぜないこと。

## 分離度の最適化方法

1. サンプルの pI を決定します。
2. 対象の pH 範囲で狭い範囲の両性電解質を選択します。
3. 合計 4%の両性電解質濃度 (200  $\mu$ L のサンプル溶液あたり 8  $\mu$ L の両性電解質) で、1 : 1 の割合で狭い範囲と 3-10 の広い範囲の両性電解質を混ぜた混合溶液か

ら始めます。メソッドのレシピについては、表 4、5、および 6 を参照してください。

4. サンプルのピークを接近して囲むように、キットに含まれている pI マーカーを 2 つ選択します。これらのマーカーは、正確な pI 測定のために、狭い範囲の両性電解質の pH 範囲内にある必要があります。サンプル溶液に低および高 pI マーカーを各 1  $\mu$ L 加えます。サンプル準備とメソッドパラメーターに関して、表 4、5、6 を参照してください。

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

- 1500 V で 1 分間、続けて 3000 V で 10 分間フォーカスします。
- さらに分離が必要な場合は、両性電解質混合液内の狭い範囲の両性電解質の量を増やします。両性電解質の濃度を上げると、分離度も向上します。両性電解質の濃度は 8%以下にする必要があります。

## 堅牢性 (Robustness)

統計分析ソフトウェアパッケージの実験計画法 (DOE: Design of Experiment (DOE)) を使用してメソッドの堅牢性を最適化することも可能です。

DOE 原理の適用に関する詳細は、アプリケーションノート「コンピューターを利用した iCE 電荷不均一性アッセイの開発」

([http://www.proteinsimple.com/documents/Application\\_Note\\_Computer-Aided\\_Assay\\_Development\\_for\\_iCE.pdf](http://www.proteinsimple.com/documents/Application_Note_Computer-Aided_Assay_Development_for_iCE.pdf) からダウンロード) を参照してください。

## 参考文献

1. Analysis of charge heterogeneities in mAbs using imaged CE, X He, A Que and J Mo, *Electrophoresis*, Mar 2009; 23(11):1605–11.
2. Applications of imaged capillary isoelectric focusing technique in development of biopharmaceutical glycoprotein-based products, C Anderson, Y Wang, and R Rustandi, *Electrophoresis*, Jun 2012; 33(11):1538–44.
3. Application of capillary electrophoresis in glycoprotein analysis, R Rustandi, C Anderson, and M Hamm, *Methods Mol Biol*, 2013; 988:181–97.
4. Application of imaged capillary IEF for characterization and quantitative analysis of recombinant protein charge heterogeneity, Z Sosic, D Houde, A Blum, T Carlage, and Y Lyubarskaya, *Electrophoresis*, Nov 2008; 29(21):4368–4376.
5. Determination of charge heterogeneity and level of unconjugated antibody by imaged cIEF, J Lin and A Lazar, *Methods Mol Bio*, 2013; 1045:295–302.

6. Charge-based analysis of antibodies with engineered cysteines: from multiple peaks to a single main peak, X Chen, M Nguyen, F Jacobson and J Ouyang, *mAbs*, Nov/ Dec 2009; 1:6, 563–571.

## 付録 A: 試薬の準備

表 7 に示すようにバッチ試薬を準備し、図 11 のように試薬バイアルを Maurice にセットします。

試薬	容量	キャップ	ポジション
0.5% Methyl Cellulose	2.0 mL	Blue pressure cap	P1
Fluorescence Calibration Standard	500 µL	Blue pressure cap	P2
精製水	2.0 mL	Blue pressure cap	P3
空バイアル (空気)	N/A	Blue pressure cap	P6
精製水	2.0 mL	Clear screw cap	N1

表 7. バッチ試薬の準備

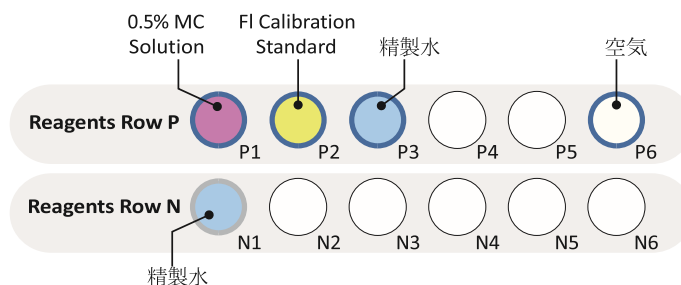


図 11. 試薬バイアルの配置

## 付録 B: cIEF カートリッジの準備

1. カートリッジをパッケージから取り出します。パッケージは後で必要になるため、保管しておきます。
2. 電解液タンクを上に向けて、カートリッジを平らな面に置きます。
3. 両方の電解液タンクからストッパーのキャップを取り外します。
4. 陰極液 (Catholyte solution) 2 mL を OH<sup>-</sup>電解液タンク (白いポート) に追加します。
5. 陽極液 (Anolyte solution) 2 mL を H<sup>+</sup>電解液タンク (赤いポート) に追加します。

## Maurice cIEF メソッド開発ガイド

**注:** 電解液タンクに入れすぎないようにしてください。

40  $\mu\text{L}$  のタンパク質サンプルを加え、最終的なサンプル量は 200  $\mu\text{L}$  になります。

6. 各タンクをゴム栓キャップで密閉します。OH<sup>-</sup>タンクには灰色のストッパーを、H<sup>+</sup>タンクには赤色のストッパーを使用します。タンクから余分な液体が出てきた場合は、必ず糸くずの出ないラボ用ワイプで拭いてください。

## 付録 C: サンプルの脱塩と濃縮

1. 500  $\mu\text{L}$  サンプルを Amicon Ultracel 50K Membrane Centrifugal Filter (Millipore PN 4311) に加えます。
2. 12,000 rcf で 5 分間、遠心します。
3. ろ過した容量を 20 mM Tris バッファー pH 7.0 (Life Technologies PN AM9851) で置換します。
4. 遠心分離とバッファー交換を更に 2 サイクル行います。
5. 簡単な脱塩では、バッファー交換後容量を 500  $\mu\text{L}$  にします。サンプルを濃縮する必要がある場合、もしくはすぐに使用しない場合は、カラム上に残った 100  $\mu\text{L}$  のバッファー交換サンプルを -20°C 以下で保管してください。

## 付録 D: 変性サンプルの準備

極端な場合、一部のタンパク質は cIEF 分析中に溶液中に留まるために、40% SimpleSol または 4 M 尿素よりも濃度を高くする必要があります。この場合、10 M 尿素を含む cIEF マスターミックスに 1/4 量のサンプルを加えて変性させる必要があります。サンプルの最終尿素濃度を間違いなく 8 M にするには、次のサンプルの準備例に従います。

96 mg の尿素粉末と次の量の試薬を加え、160  $\mu\text{L}$  のマスターミックスを作成します。

- 1% Methyl Cellulose 70  $\mu\text{L}$
- 両性電解質 (合計) 8  $\mu\text{L}$
- 各 pI marker 2  $\mu\text{L}$  ずつ
- 精製水 適量



Toll-free: (888) 607-9692  
Tel: (408) 510-5500  
info@proteinsimple.com  
proteinsimple.com

© 2019 ProteinSimple. The ProteinSimple logo, Maurice and iCE are trademarks and/or registered trademarks of ProteinSimple.