

Maurice システム

CE-SDS (キャピラリー電気泳動-SDS) メソッド開発ガイド



序章

このメソッド開発ガイドでは、Maurice®および Maurice S.で CE-SDS メソッドを迅速かつ簡単に開発および最適化する方法を紹介しています。アッセイパフォーマンスを最適化するために調整すべき全てのパラメーターや、どのような条件でサンプル測定を開始するかについての概要を説明しています。

測定開始方法

CE-SDS モードを使用して簡単に Maurice でサンプルを測定することができます。別の CE-SDS プラットフォームからメソッドを移行する場合、25X ProteinSimple Internal Standard (PN 046-144) を代わりに混ぜるだけで、同じ最適なサンプルの調製方法をそのまま使用できます。CE 以外の方法から移行する場合、ProteinSimple の提供するデフォルト条件でのサンプル調製方法から始めてみることをお勧めします。デフォルトのサンプル調製の手順については、当社の Maurice CE-SDS Application Guide と Quick Reference Guide を参照ください。

いずれの場合も、Maurice のデフォルトの測定条件で最初の測定を開始します。表 1 は、還元処理と非還元処理のデフォルト設定をまとめたものです。

SCIEX PA 800/PA 800 Plus のメソッドを既にお持ちで、それらを Maurice に移行したい場合は、PA 800/PA 800 Plus からメソッドを移行する方法に関していくつか指針を紹介します。

ステップ	試薬/パラメーター	還元条件	非還元条件
サンプル準備	ProteinSimple Sample Buffer	少なくとも 0.5X	少なくとも 0.5X
	添加物	650 mM β-ME	11.5 mM IAM
変性	時間	10 分	10 分
	温度	70 °C	70 °C
EK (エレクトロキネティック) インジェクション	時間	20 秒	20 秒
	電圧	4,600 V	4,600 V
分離 (Standard IgG)	時間	25 分	35 分
	電圧	5,750 V	5,750 V

表 1. 還元および非還元 CE-SDS メソッド条件。デフォルトの Maurice CE-SDS 測定パラメーターには、EK (エレクトロキネティック (動電学的)) インジェクション、および分子量に依存するさまざまな分離時間設定が含まれます。

メソッド開発ガイドの注意点

図 1 は CE-SDS メソッド開発のワークフローを示しており、データの何を見るべきか、最適データが得られない場合に何を行うべきかを示しています。まずサンプルバッファーの構成が適切であることを確認後、最初のサンプルを Maurice のデフォルト条件で測定します。感度と分離度の初期評価後、必要に応じてサンプル濃度とインジェクション条件を調整することができます。最適なシグナルと分離度を得た後、必要に応じて予測外のフラグメントを削除し、メソッドの最適化を完了します。

サンプルに関する注意点

サンプルの濃度

最適な結果を得るために、適切な濃度のサンプルを用いることが重要です。Maurice CE-SDS アッセイで用いる一般的なタンパク質濃度は 0.2~1.5 mg/mL です。サンプル濃度を上げると分離度は低下する可能性があります。少量の不純物をより検出することができる場合があります。

低濃度サンプルの濃縮が必要な場合もあります。インジェクション条件を調整してシグナルを最適化することも可能です。これらは、EK インジェクションの注意点で詳しく説明します。

サンプル濃度がシグナルにどのように影響するかを示すために、NISTmAb (IgG1k、ロット 14HB-D-002) を 0.25~1.5 mg/mL で滴定し、非還元条件下で Maurice のデフォルトのメソッドにて測定しました (図 2)。このモノクローナル抗体 (mAb) には定量化がとても困難な非常に低レベルの断片が含まれています。サンプル濃度を上げると、これら小さな不純物の検出が容易になります (図 2、挿入図)。サンプル濃度を濃くしすぎると、ピークが広がり分離度が失われる可能性があることに注意して下さい。

サンプルの準備

Maurice では同じバッチ内で還元または非還元条件下でサンプルを測定することができます。IgG の還元手順を最適化すると、ジスルフィド (S-S) 架橋が完全に切断され、二量体の形成が回避されます。還元剤として、2-メルカプトエタノール (β-ME) をお勧めします。

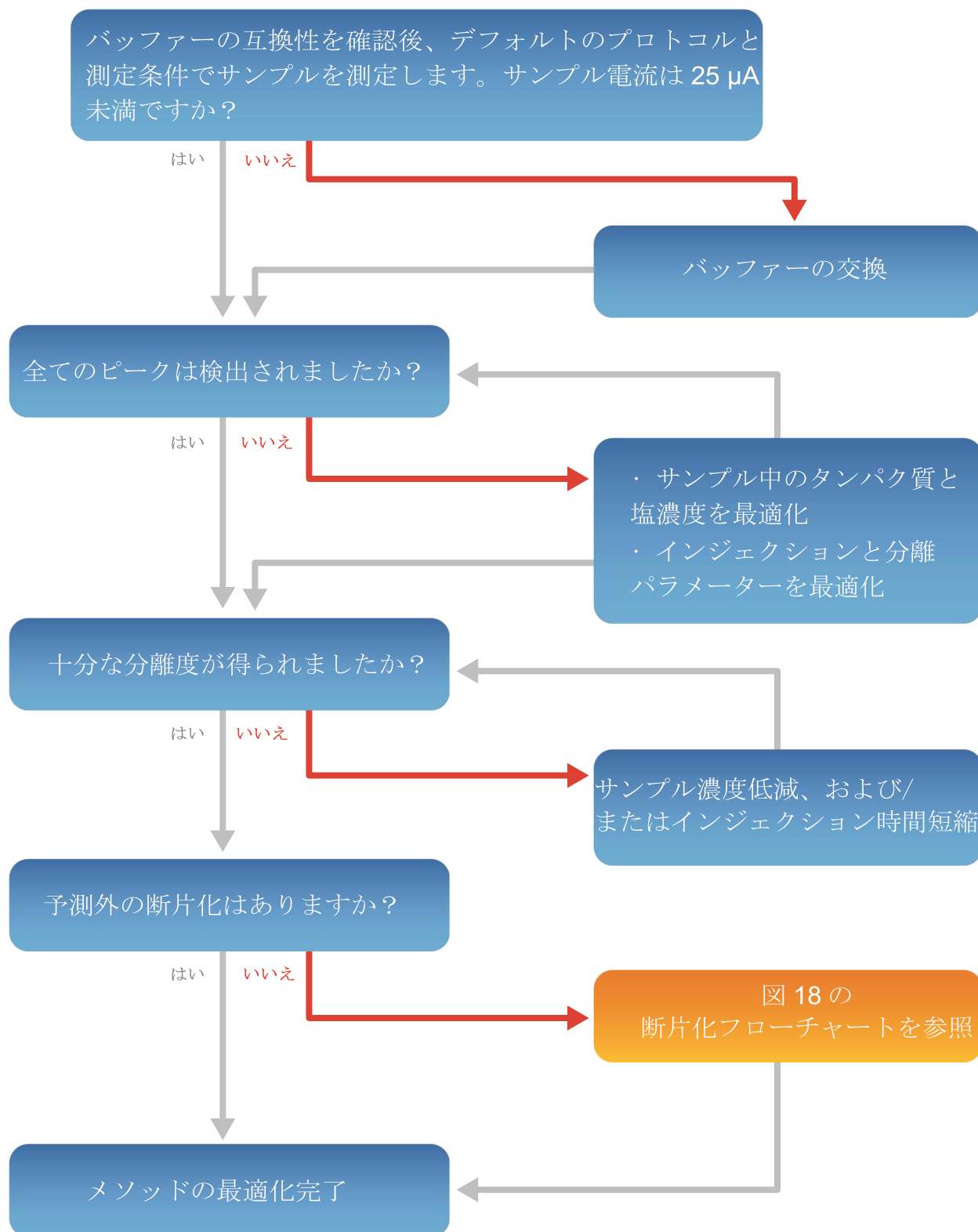


図 1. Maurice での CE-SDS メソッド開発のワークフロー

Maurice CE-SDS Method Development Guide

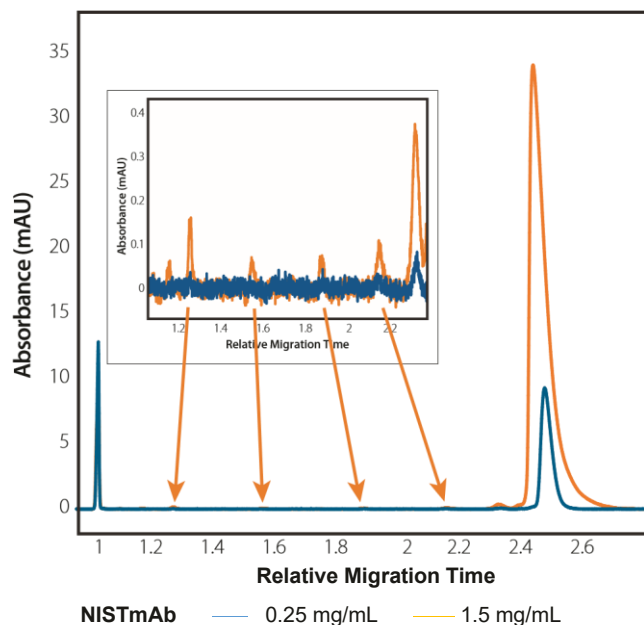


図 2. 非還元条件下での NISTmAb の滴定。NISTmAb 濃度を上げると、存在量の少ない断片（挿入図）をより適切に検出できる。

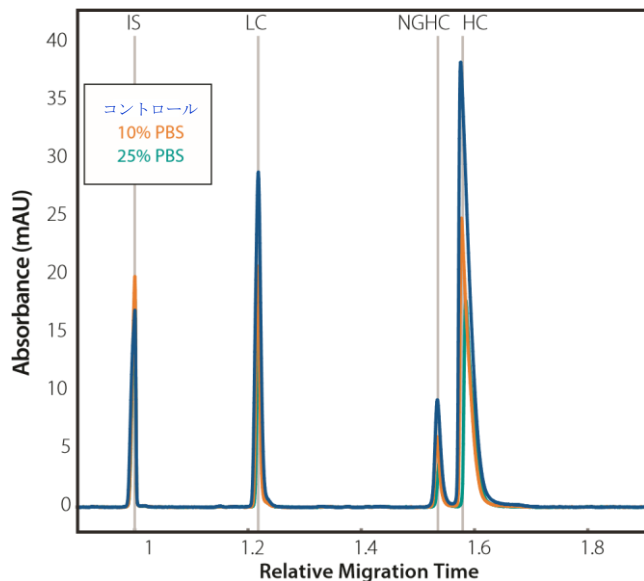


図 3. サンプル内イオン組成のインジェクション効率への影響。1 mg/mL ProteinSimple IgG Standard を Maurice 1X Sample Buffer（コントロール、青）、10%PBS（オレンジ）または 25%PBS（緑）で希釈し、還元、変性後、Maurice で測定。サンプルを 10~25%PBS で希釈すると、コントロールに比べてシグナルが大幅に低下する。IS = Internal Standard（内部標準）、LC = 軽鎖、HC = 重鎖、NGHC = 非グリコシル化重鎖。

非還元型 IgG サンプルを最大限に変性しながらも、理想的にはタンパク質の断片化や凝集を最小限に抑えます。この場合、変性中に S-S 結合を保護するために、ヨードアセトアミド (IAM) を加えることをお勧めします。

どちらの場合も、SDS を含むサンプルバッファーを加える必要があります。

プロトコルについては、CE-SDS Application Guide の付録 A をご覧ください。

サンプルマトリックス – イオン組成

サンプル濃度に加えて、サンプルマトリックスのイオン組成も感度と分離度に影響を与えます。理想的には、バッファーがインジェクション効率に与える影響を最小限にするために、最終サンプルの塩濃度を 50 mM 未満（これにより、25 μ A 未満の電流が観測されます）にする必要があります。サンプル濃度が高くイオン強度を下げる必要がある場合は、サンプルを脱塩、もしくは Maurice CE-SDS 1X Sample Buffer (PN 046-012) で希釈します。サンプルに含まれる塩はインジェクションされる量を減らす可能性があるため、インジェクション時間を延ばさなければいけない場合があります。図 3 は、サンプルマトリックスのイオン強度が動電学的 (EK) インジェクション効率を変化させ、シグナル強度に及ぼす影響を示しています。ProteinSimple IgG Standard (PN 046-039) を、Maurice CE-SDS 1X Sample Buffer（コントロール）、10%または 25%PBS で希釈しました。デフォルトの測定条件でサンプルを比較した場合、インジェクションされる IgG の量は、25%PBS（約 35 mM 塩）では約 70% 低く、10%PBS では約 50% 低くなります。インジェクション時間を長くする（30 および 40 秒）ことで、より塩濃度の高いサンプルでシグナルの回復が可能であることを示しました（図 4）。

サンプルの pH

最終サンプルの pH は、考慮すべきもう 1 つの重要なパラメータです。EK インジェクション効率は、図 5 に示すように pH を変えることで影響を受けることがあります。この実験では、様々な pH で ProteinSimple IgG Standard を 100 mM Tris を含む 1%SDS に希釈し、非還元条件下（図 5、左）および還元条件下（図 5、右）で測定しました。

pH が上がるにつれてインジェクション効率は増加しますが、pH 約 9.5 でプラトーに達します。Maurice CE-SDS 1X Sample Buffer は 100 mM Tris、1%SDS で pH 9.5 であり、最高の EK インジェクション効率が得られるように最適化されています。

Maurice CE-SDS Method Development Guide

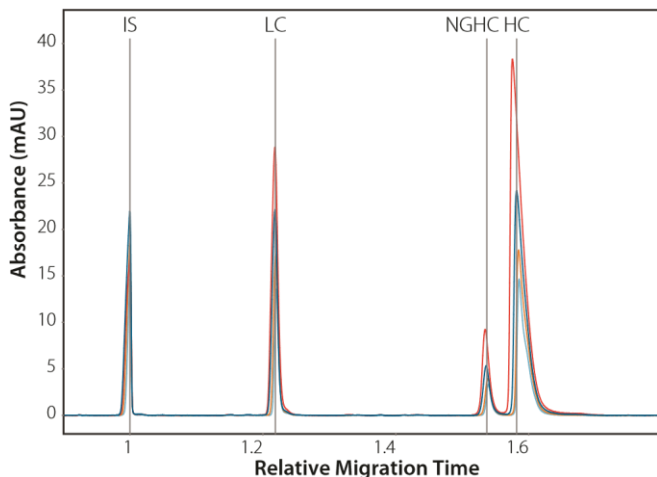


図 4. サンプルインジェクション時間の増加によるシグナルの回復。還元型 IgG Standard 0.5 mg/mL を Maurice 1X Sample Buffer (赤) もしくは 25% PBS (シアン、オレンジ、青) で希釈した。同じインジェクション時間で比較しても、バッファの違い (赤とシアン) により、塩ベースの溶液 (PBS) でインジェクションしたイオン数が多いためシグナルが減少する。インジェクション時間を 30 秒 (オレンジ)、または 40 秒 (青) に増加させるとシグナルが回復する。

各サンプルは異なるマトリックスバッファで溶解されているので、一部のサンプルマトリックス成分が分離度の低下やピーク形状の歪みを引き起こすことがあることに注意してください。付属の Maurice CE-SDS バッファ交換表を確認し、サンプル混合液の各成分の濃度が推奨範囲内であることを確認してください。推奨範囲内に収まらない場合、サンプルの脱塩もしくはバッファ交換をする必要があります。そのプロトコルは、CE-SDS Application Guide の付属 C を参照ください。

動電学的 (EK) サンプルインジェクションの注意点

EK サンプルインジェクションの基本

CE-SDS モードではサンプルを EK インジェクションでカートリッジ内のキャピラリーに導入します。EK インジェクションは、キャピラリーがサンプル溶液に接している間にキャピラリーの注入口に電圧を加えて機能します。電圧がかかると、吸い上げ効果が発生し、サンプルはキャピラリーに引き込まれます。タンパク質やバッファ成分を含む荷電イオンは、電圧がかかると発生する電界によりキャピラリー内を移動し、その発生した電界はサンプルのインジェクション効率にも影響を及ぼします。インジェクションされるイオン数は、サンプルの導電率とイオンの電気泳動移動度からなる関数で表されます。EK インジェクションされる量は、サンプルの導電率に反比例します。サンプルの導電率が高いほど、EK インジェクション効率は低くなります。したがって、塩濃度の高いサンプルは希釈することをお勧めします。EK インジェクションは、そのスタッキング効果により、ハイドロダイナミックインジェクション法に比べより感度が向上します。EK インジェクションはサンプル中のイオン数とタンパク質の数に非常に敏感なため、最適なデータを得るには、EK インジェクションのパラメーターの変更を必要とする場合があります。

サンプルインジェクション時間

デフォルトのインジェクション時間は 20 秒です。必要に応じて、インジェクション時間を 10~60 秒で調整可能です。サンプルインジェクション時間は、(インジェクション電圧とは対照に) 弊社の推奨するサンプルインジェクション最適化パラメーターです。

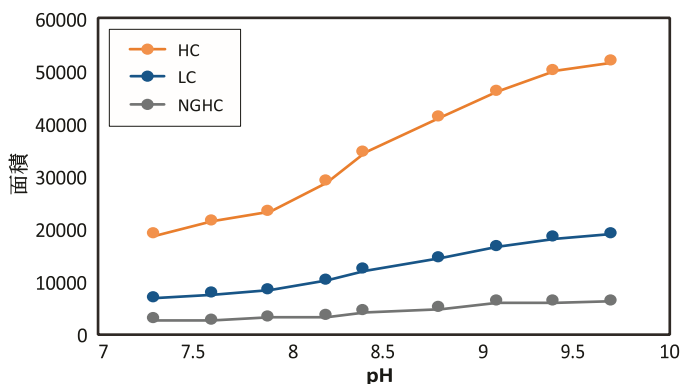
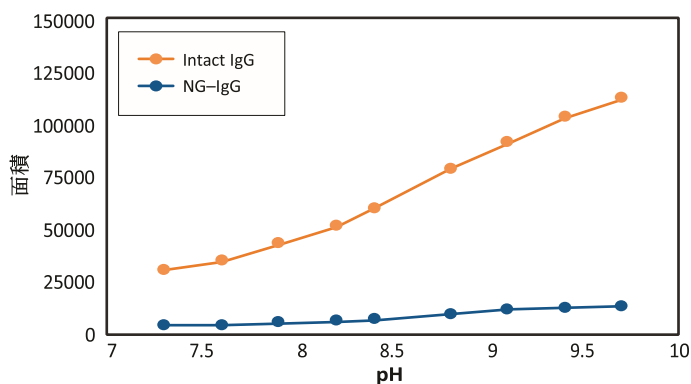


図 5. EK インジェクション効率は、サンプルマトリックスの pH に依存。100 mM Tris、1% SDS を含むバッファを様々な pH で調整し、サンプルバッファとして使用する。非還元型 IgG (右) と還元型 IgG (右) の両方で示されているように、pH が高いほどインジェクション効率が上がる。NG-IgG = Intact な非グリコシル化 IgG (non-glycosylated intact IgG); NGHC = 非グリコシル化 IgG 重鎖 (non-glycosylated IgG heavy chain); HC = IgG 重鎖 (IgG heavy chain); LC = IgG 軽鎖 (IgG light chain)。

Maurice CE-SDS Method Development Guide

サンプルインジェクション電圧

Maurice のデフォルトのサンプルインジェクション電圧は 4600 V で、ほとんどのメソッドに適しています。インジェクション電圧は 6000 V まで上げることが可能ですが、過度な加熱を避けるために注意して行う必要があります。これは分離度に影響を及ぼし、サンプルのマトリックス組成によって大きく異なることがあります。

分離条件に関する注意点

分離電圧

Maurice のデフォルトの分離電圧は 5750 V です。電圧を上げると、サンプル内のタンパク質の移動は速くなりますが、ジュール熱が上がり、分解能が低下する可能性もあります。

電圧を下げると、サンプル中のタンパク質の移動は遅くなります。これにより分解能は向上しますが、測定時間が長くなるためスループットが低下します。

分離時間

適切な分離時間は、分析する分子によって異なります。例えば、還元型 IgG サンプルのデフォルト分離時間は 25 分です。これはより小さな分子量のピークが予想されるためです。非還元型 IgG の場合は主に大きな分子量のピークが予想されるため、35 分のデフォルトの分離時間をお勧めします。ProteinSimple MW Ladder 内のタンパク質の移動時間は、様々な見かけ上の分子量の大まかな測定時間の目安となります。

分離時間を長くすると、これまで検出されなかったより大きな分子量をもつ分子解析で役立ちますが、測定時間が長くなるためスループットが低下します。分離時間を短くしてもパフォーマンスは変わりませんが、スループットは向上します。より大きな分子量が検出ウィンドウを通過するのに十分な分離時間が設定されていることを確認してください。

Maurice でのサンプル測定

PA 800/PA 800 Plus からのメソッド移行

SCIEX™ システムと Maurice のキャピラリーの長さや分離マトリックスの違いにより、インジェクションと分離電圧は異なります。以前 PA 800 または PA 800 Plus でサンプルを分析したことがある場合、最初の Maurice での分析では、Maurice 用に最適化されたデフォルトの試薬と分析条件を試してみることをお勧めします。また、シグナル強度と分解能を比較するために、最初の測定では ProteinSimple IgG standard 1 mg/mL を測定することをお勧めします。

メソッド移行が可能かどうかテストするために、PA 800 と Maurice の両方で、各機器用の試薬とデフォルト条件で 1 mg/mL で 5 つの還元および非還元型 mAb を測定しました。図 6 に示すように、同等の結果が得られました。初期結果を取得し、データの分離度と感度を評価した後、必要に応じて Maurice メソッドのサンプル調製と測定パラメーターをさらに最適化することが可能です。

同じ量のサンプルを測定すると、SCIEX 機器と比べて、Maurice での吸光度が高くなる場合があります。ProteinSimple Maurice CE-SDS 1X Sample Buffer の組成は、100 mM Tris pH 9.5、1% SDS です。pH が低い SCIEX SDS Sample Buffer では、Maurice の Sample Buffer と比較して EK 効率が低くなります。この効果の例を図 7 に示します。BSA (ウシ血清アルブミン) を SCIEX または Maurice のサンプルバッファーで 0.5~1.5 mg/mL の濃度に希釈し、Maurice で測定しました。

MAURICE で新規のサンプルを測定する場合

新たなサンプルを最適に測定する方法について予備知識がない場合は、最初にデフォルトの Maurice プロトコルと試薬をデフォルトの測定条件で試してみることをお勧めします。

実験の注意点:

- ProteinSimple Maurice CE-SDS 1X Sample Buffer (PN 046-012) でサンプルを希釈します (必要な場合はバッファー交換後)。
- サンプルバッファー量: サンプル量の比率は 1:1 より大きくする必要があり、より高い比率 (例: .2:1、5:1、10:1 など) が推奨されます。
- 希釈後のタンパク質濃度は 0.2~1 mg/mL である必要があります。標準 IgG 分子として ProteinSimple IgG standard (PN 046-039) を含めることをお勧めします。サンプルと Standard を比較して、サンプルインジェクションパラメーターの調整が必要になる場合があります。

新たな mAb の最初のバッチの測定手順を説明するため、2 つの濃度の同じ IgG を還元および非還元条件下で測定しました (図 8)。サンプルの分離度と感度を把握する目的で、このバッチではデフォルトの 20 秒間、デフォルトより短い 10 秒間、および 2 つの長い時間 (30 秒と 40 秒間) で各サンプルをインジェクションしました。繰り返しインジェクションし再現性を確認します。このような最初の実験から、サンプルを十分に理解し、必要に応じてさらに最適化することができます。

Maurice CE-SDS Method Development Guide

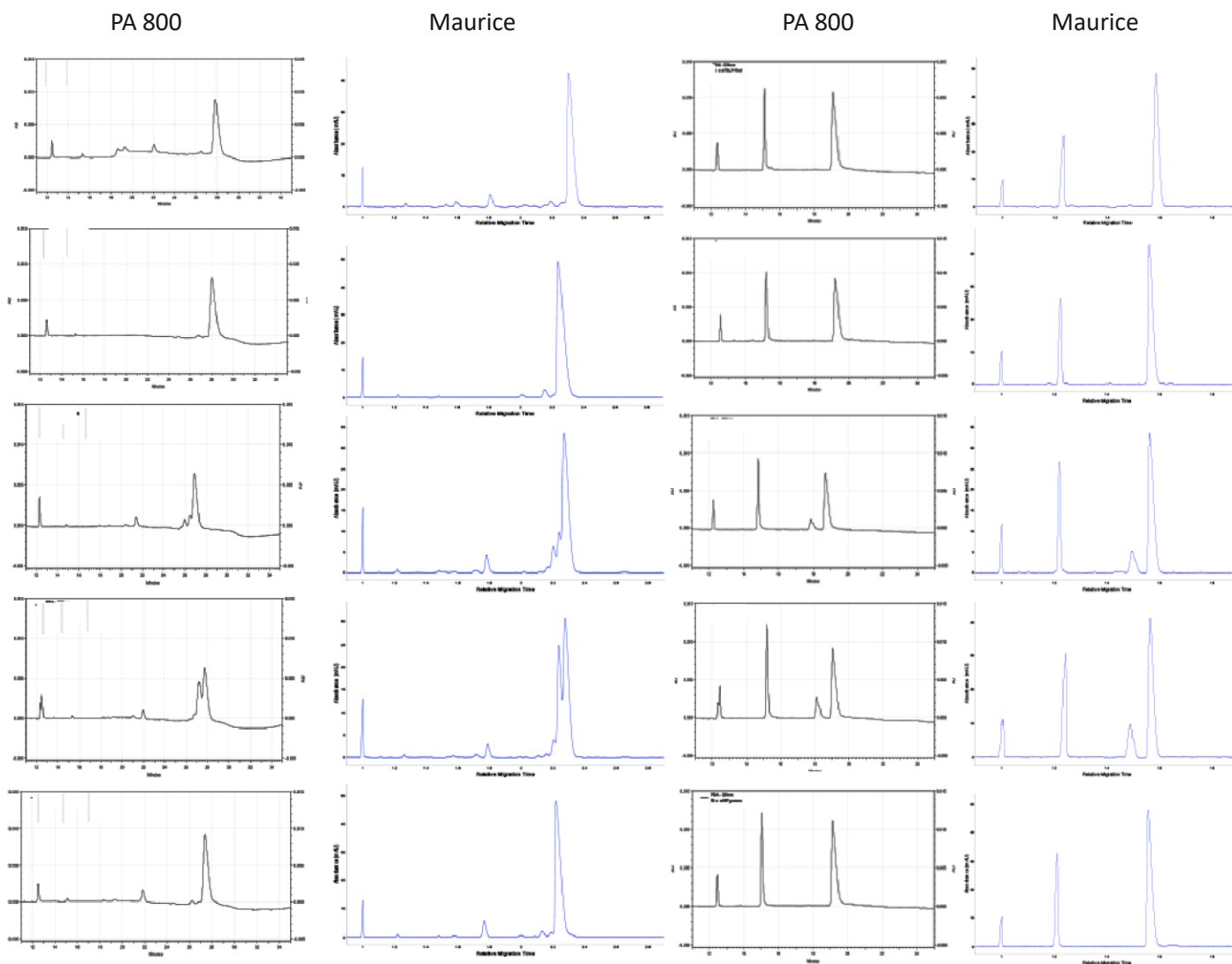


図 6. PA 800 または Maurice のデフォルトプロトコルを使用して、非還元（左）と還元条件下（右）で、最適化していない状態で 5 つのモノクローナル抗体を 1 mg/mL でスクリーニング。2 つのシステム間で同等のプロファイルが得られた。すべてのグラフで、X 軸は時間、Y 軸は吸光度。

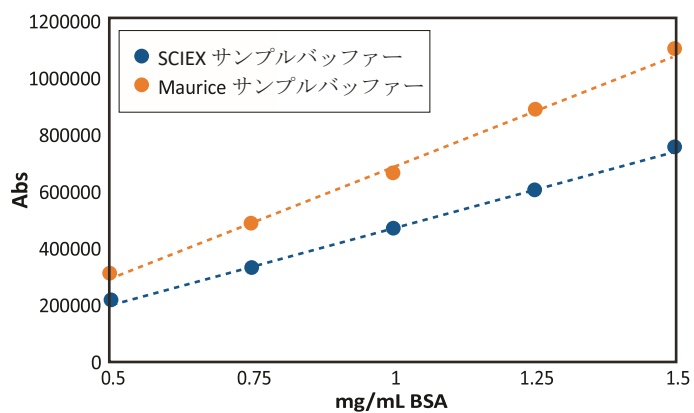


図 7. Maurice と PA 800 のサンプルバッファーを Maurice で測定し比較。還元型 BSA (Thermo、23209) を Maurice または PA 800 サンプルバッファーで希釈し、Maurice にてさまざまな濃度で測定した。PA 800 SDS サンプルバッファーで希釈した BSA は、同じタンパク質濃度の Maurice CE-SDS サンプルバッファーと比較して、シグナルは約 30% 低くなった。

Maurice CE-SDS Method Development Guide

初期結果の確認

シグナルの大きさ

メインピークは、理想的には 30~50 mAU に収まります。感度が十分かどうか判断するために、総ピーク面積の 0.1%~0.3% と見込まれるマイナーピークを探します。それらは、エレクトロフェログラムでベースラインのノイズレベルを超えている必要があります。これらのピークが見られない場合、サンプル濃度 (図 9) またはサンプルインジェクションパラメーターを増やすことで感度を高めることができます。より多くのタンパク質、またはより長いサンプルインジェクション時間でこれら小さなピークを高くすることができます。

分離度

分離度を上げるには、最初にサンプルインジェクション時間を 5~15 秒まで短縮するか、サンプル濃度を減らします。図 10 に示すように、サンプルインジェクション時間をより短くすると、非還元型 mAb の非グリコシル化ピーク (NG IgG) とグリコシル化 (Intact な IgG) ピークの分離度を大幅に改善することができます。サンプル濃度を下げても、分離度は向上します。20 秒間インジェクションした IgG サンプル 1 mg/mL と比べる

と、40 秒間インジェクションした IgG サンプル 0.25 mg/mL の方が分離度は優れています。

メソッドの最適化

Maurice は優れたパフォーマンスを得るために最適化されていますが、分析結果をさらに微調整をしたい場合があるかもしれません。このセクションでは、メソッドをより最適化する方法について説明します。

インジェクション条件の最適化

サンプルインジェクション時間は、Maurice にサンプルを導入する EK インジェクション時間を制御します。デフォルトの 20 秒のインジェクション時間から始めることをお勧めします。しかし、サンプルのインジェクション時間または電圧を変更することで、キャピラリーにインジェクションするサンプル量を制御することができます。

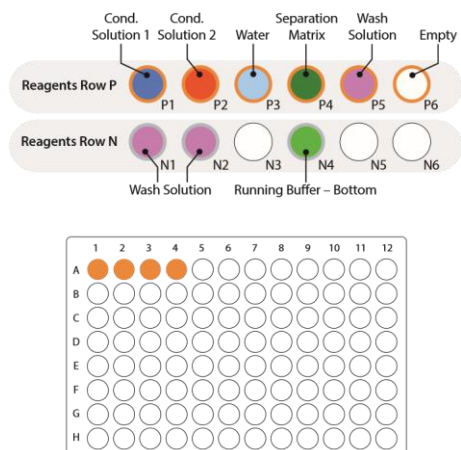


図 8. 新規 mAb の初回スクリーニングバッチ。簡単なバッチを設定し、最初の実験で様々な変数をすばやくテストすることが可能になる。

	インジェクション名	サンプル ID	位置	メソッド	インジェクション時間
1	Sample 1	1 mg/mL NR	A1	Non-reduced IgG	20 秒 (デフォルト)
2	Sample 1	1 mg/mL NR	A1	Non-reduced IgG 10s	10 秒
3	Sample 1	1 mg/mL NR	A1	Non-reduced IgG 30s	30 秒
4	Sample 1	1 mg/mL NR	A1	Non-reduced IgG 40s	40 秒
5	Sample 2	0.25 mg/mL NR	A2	Non-reduced IgG	20 秒 (デフォルト)
6	Sample 2	0.25 mg/mL NR	A2	Non-reduced IgG 10s	10 秒
7	Sample 2	0.25 mg/mL NR	A2	Non-reduced IgG 30s	30 秒
8	Sample 2	0.25 mg/mL NR	A2	Non-reduced IgG 40s	40 秒
9	Sample 3	1 mg/mL R	A3	Reduced IgG	20 秒 (デフォルト)
10	Sample 3	1 mg/mL R	A3	Reduced IgG 10s	10 秒
11	Sample 3	1 mg/mL R	A3	Reduced IgG 30s	30 秒
12	Sample 3	1 mg/mL R	A3	Reduced IgG 40s	40 秒
13	Sample 4	0.25 mg/mL R	A4	Reduced IgG	20 秒 (デフォルト)
14	Sample 4	0.25 mg/mL R	A4	Reduced IgG 10s	10 秒
15	Sample 4	0.25 mg/mL R	A4	Reduced IgG 30s	30 秒
16	Sample 4	0.25 mg/mL R	A4	Reduced IgG 40s	40 秒

Maurice CE-SDS Method Development Guide

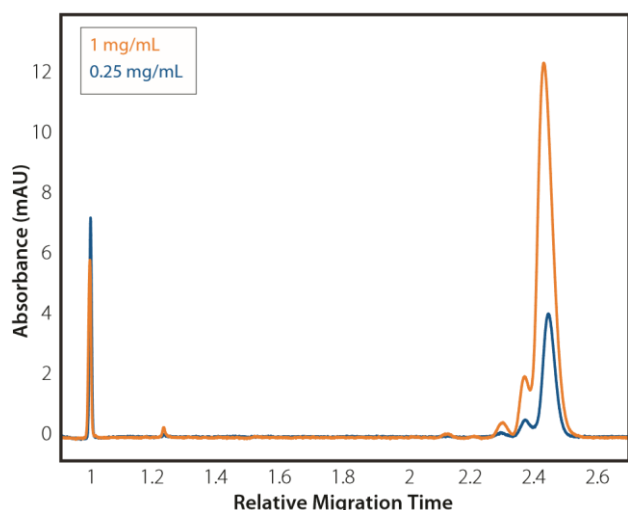


図 9. 非還元型 IgG 1 mg/mL と 0.25 mg/mL の比較。サンプル濃度を上げると、より小さなピークの検出が可能になる。

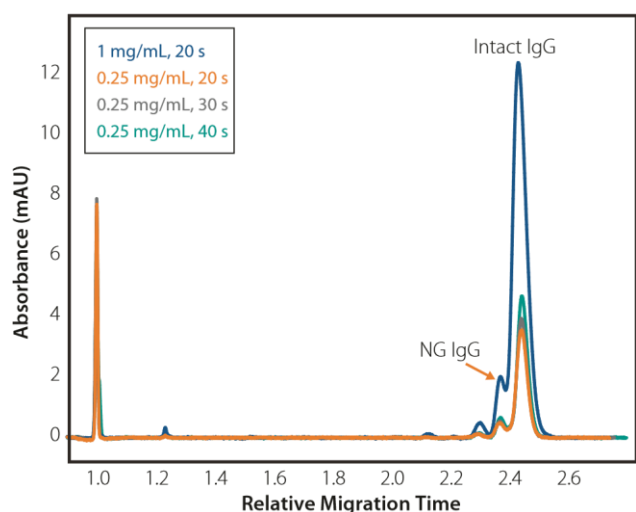


図 10. 非還元型 IgG Standard 0.25 mg/mL を 20、30、および 40 秒間インジェクションし、20 秒間インジェクションした IgG 1 mg/mL と比較した。NG IgG と Intact な IgG の分離結果を表示。サンプル濃度を下げると、インジェクション時間が長くなっても分離度は高くなる。

サンプル濃度	インジェクション時間	NG IGG / INTACT 分離度
1 mg/mL	20 s	0.68
0.25 mg/mL	20 s	2.39
	30 s	2.66
	40 s	2.81

シグナルの増加

タンパク質濃度が低い、またはサンプルにイオンが多い場合、インジェクション条件の変更を必要とする場合があります (図 11)。インジェクション時間を延長および/または電圧を上げるとより多くのサンプルがロードされますが、キャピラリーにインジェクションされるタンパク質とイオンが増え、スタッキング効率が下がるので、分離度が低下することがあります。インジェクション電圧を高くすると、ジュール熱が発生する可能性があります。分離度も下がる可能性があります。シグナルを増加させるために、インジェクション時間をデフォルトの 20 秒から 25 ~ 50 秒に延ばしてみてください。電圧を 4600 V から 6000 V に変更することも可能ですが、より多くのイオンがインジェクションされます。過度のジュール加熱を回避するため、インジェクション電圧よりもインジェクション時間の変更をお勧めします。

インジェクション時間増加による影響を理解するため、20~40 秒間インジェクションして、NISTmAb 1 mg/mL を還元および非還元条件下で測定しました。さまざまな分子量でシグナルが増加した結果を図 12 に示します。

分離度の向上、もしくはシグナルの減少

高濃度のタンパク質サンプルを用いる場合は、図 13 のフローチャートに従ってください。異常なピーク形状で分離度が低い場合、サンプルを多くインジェクションし過ぎていることがわかります。1X Sample Buffer でサンプルをさらに希釈し、インジェクション時間を長くすると、高濃度の (およびイオン濃度が高い可能性のある) サンプルを短時間でインジェクションする場合と比べて、ピーク形状と分離度が向上します。

シグナルを低減するには、最初にサンプルを 1X Sample Buffer でさらに希釈してみます。インジェクション時間をデフォルトの 20 秒から 10~15 秒に減らすこともできます。電圧をデフォルトの 4600 V 未満に下げると、インジェクションされるイオンも少なくなります。しかしながら、インジェクション電圧よりもインジェクション時間を短くすることをお勧めします。

Maurice CE-SDS Method Development Guide

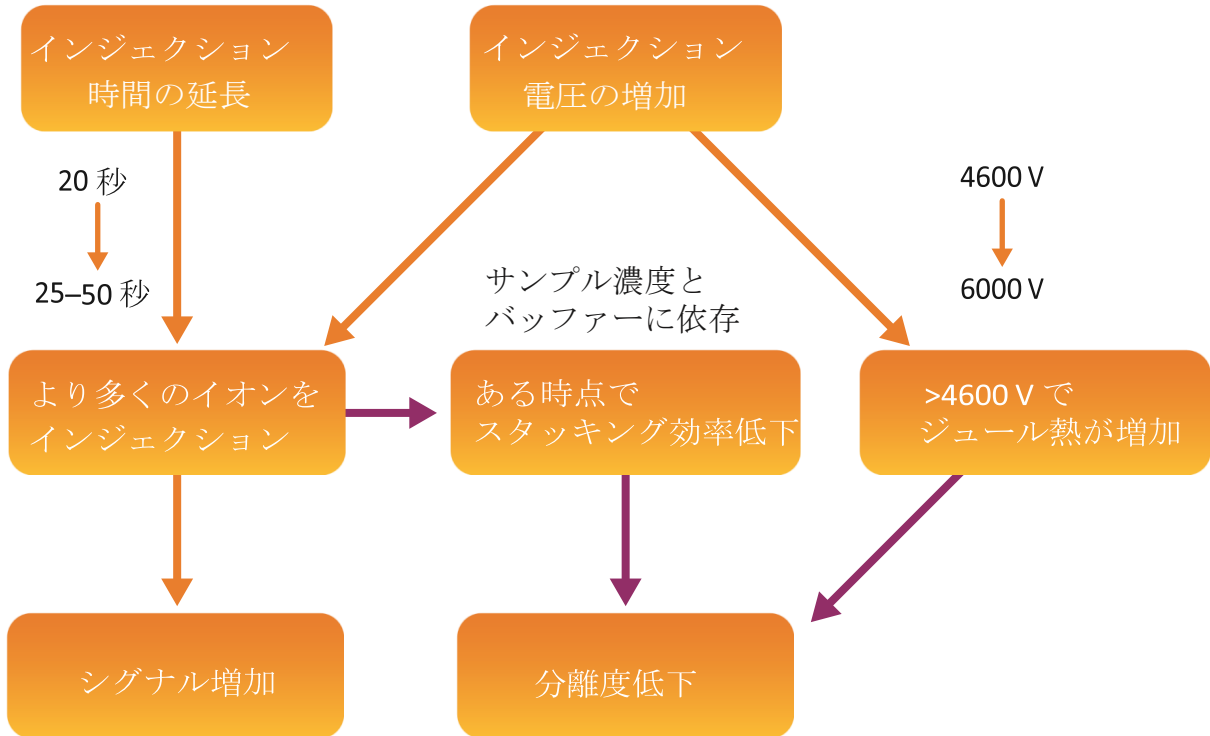


図 11. シグナルを増加させるためのワークフロー

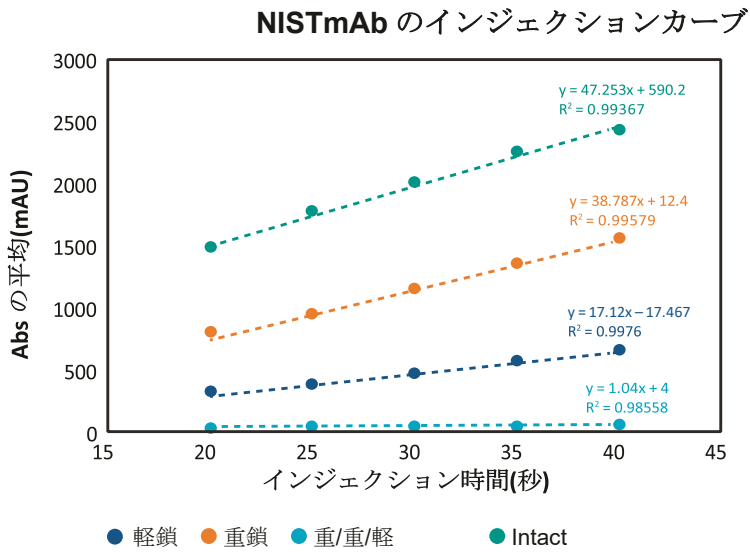


図 12. 異なるインジェクション時間による NISTmAb 断片の定量。インジェクション時間を 20 秒より長くすると、シグナルが大きくなる可能性がある。インジェクション時間を 20 秒から 40 秒に延ばすと、平均してシグナルは 1.8 倍に増加する。

Maurice CE-SDS Method Development Guide

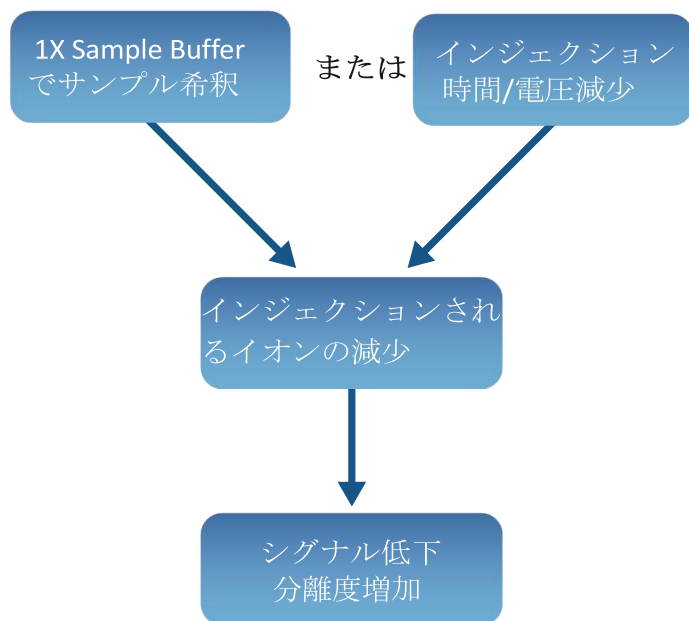


図 13. シグナル低減のワークフロー

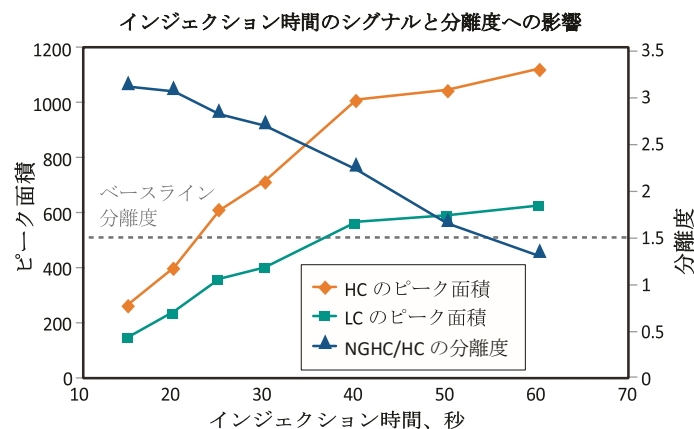


図 14. サンプルインジェクション時間、分離度、シグナルの関係。IgG サンプル 0.25 mg/mL を異なるインジェクション時間で分析した。この例では、シグナルと分離度に基づいて、40 秒の最適なインジェクション時間を選択される。インジェクション時間が 40 秒を超えると得られるシグナル面積はプラトーに達し、またインジェクション時間が長くなると分離度が低下する。最小ベースライン分離度は 1.5 (灰色の線) と定義されている。

IgG 分子のシグナル、分離度、およびインジェクション時間の関係を図 14 に示します。広範囲のインジェクション時間にわたって IgG サンプル 0.25 mg/mL をインジェクションしました。この分子の場合、シグナルと分離度の間における最良のバランスとして、最適なインジェクション時間は 40 秒でした。

サンプル準備の最適化: 非還元条件

非還元型サンプルを調製するための基本的なプロトコルは、[CE-SDS Application Guide](#) の付録 C を参照下さい。Maurice で Intact な (非還元型) IgG 分子を分析するには、システイン残基の遊離チオール基をブロックすることが重要です。これにより、凝集につながる分子間ジスルフィド結合の形成が防止され、遊離重鎖および軽鎖フラグメントの生成が減少します。

これらのチオール基は、ヨード酢酸 (IAA)、IAM、または N-エチルmaleimide (NEM) などの試薬を使用したアルキル化によってブロックすることができます。アルキル化とジスルフィド結合の形成は塩基性条件下で安定なため、低い pH のサンプルバッファーを使用する場合、さらに最適化が必要になる場合があります。図 15 に示すように、アルキル化が不完全な場合、更なる断片化が生じます。この例では、各実験で新しい試薬を作成することの重要性も示しています。新たに準備した IAM を使用すると、予期せぬ断片化を防ぐことができます。

保護されていないシステイン残基による断片化を減らすため、場合によってはアルキル化剤の最適な濃度と変性プロトコルを微調整する必要があります。

サンプル準備の最適化: 還元条件

β -ME、ジチオスレイトール (DTT)、トリス (2 カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) などの還元剤は、ジスルフィド結合を還元するためにタンパク質化学で一般的に使用されています。IgG に還元剤を加えると、他のより小さな分子断片とともに、重鎖と軽鎖の測定が可能になります。 β -ME は最も一般的な還元剤ですが、mAb の重鎖の二量体を形成することがあります。この場合、代替還元剤として DTT または TCEP を使用することができます。DTT でサンプルを還元するには、IAM で未反応の DTT を削除するため 2 ステップの手順が必要になります。さらに未反応の DTT はタンパク質分析領域にピークを生成し、定量に影響を及ぼすことがあります。TCEP は β -ME の代替品として受け入れられており、より幅広い pH にわたってより高い還元能力、安定性、および活性を持っているという利点があります。

図 16 では、ProteinSimple IgG standard を各還元剤で還元し、Maurice で分析しました。テストした各還元剤で同様のデータが得られました。

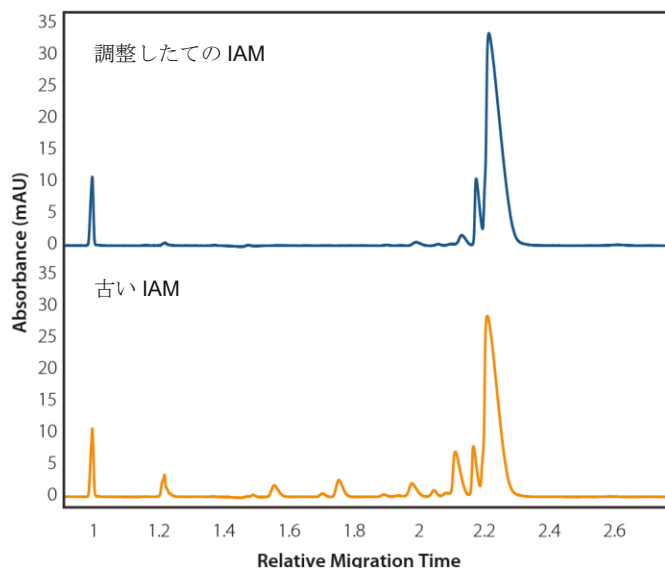
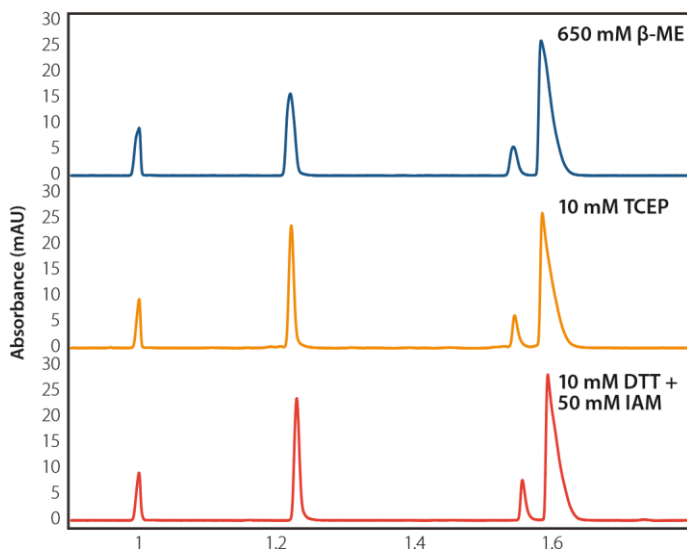


図 15. 不完全なアルキル化で、mAb の断片化が増加。適切かつ新たに調製したアルキル化剤（この場合は IAM）を使用すると、最小限の断片化が観察される（上）。測定当日に調製されなかった IAM を使用すると、不完全なアルキル化が発生し、より多くの断片化が見られる（下）。



還元 メソッド	LC の面積	NGHC の面積	HC の面積	LC % 面積	NGHC % 面積	HC % 面積
β-ME	352	93	701	30.8	8.2	61.1
TCEP	345	90	669	31.3	8.2	60.8
DTT+IAM	304	79	592	31.1	8.1	60.8

図 16. ProteinSimple IgG Standard を 650 mMβ-ME で 10 分間 75°C で還元（上）、10 mM TCEP で 10 分間 75°C で還元（中央）、または 20 mM DTT で 10 分間 75°C で還元し、後に 50 mM IAM で室温で 15 分間、暗所でインキュベート（下）。3 つの還元剤全てにおいて、同様のシグナルと%面積が検出された（表）。

IgG の断片化分析

抗体の一般的な断片化分布のプロファイルは十分に特性評価が行われています。重鎖と軽鎖のさまざまな組み合わせにより、非還元条件下では、最低 6 つのピークを検出できます（図 17 左）。ジスルフィド結合の還元により、通常 2 つのメインピーク（重鎖と軽鎖）が生じますが、非グリコシル化重鎖（NGHC）も検出されることもあります（図 17 右）。予想される既知のクリッピング、ストレス、またはサンプル調製に起因する予期せぬ理由で、更にフラグメントが観察されることがあります。

鎖間ジスルフィド結合の加水分解または切断により、IgG が非酵素的に断片化することがあります。加水分解は pH がより高いバッファーで起きやすいため、断片化はバッファーに依存する可能性があります。予期せぬ断片化を最小限に抑えるために、分析する特定分子のサンプル前処理条件の最適化が必要となる場合があります（図 18）。非還元型サンプルのアルキル化反応で使用する特定のアルキル化剤の条件最適化が必要となります。還元型サンプルの場合は、還元剤と還元条件を最適化する必要があります。サンプルバッファーの pH も、断片化に影響することがあります。変性手順の調整に加えて、より低い pH のサンプルバッファーをテストすることをお勧めします。

非還元サンプルでの断片化の低減

CE-SDS Application Guide で推奨されている非還元型サンプルの前処理条件で予期せぬ断片化が見られる場合は、サンプルが壊れやすいので、より穏やかな変性条件が必要かもしれません。加熱時間を短くすると断片化を低減し、Intact な IgG の割合が増えます。

もう 1 つの方法は、タンパク質の変性温度を下げることです。また、アルキル化剤の変更が必要な場合もあります。これらの変更時には、タンパク質と SDS の複合体が完全に形成されていることの確認が重要です。

還元サンプルでの断片化の低減

還元条件下で低分子量の断片が見られる場合は、70°C で 15 分の代わりに、5~10 分に変性時間を短縮してみてください。還元剤および/または濃度を変更すると、結果が改善される場合があります。

Maurice CE-SDS Method Development Guide

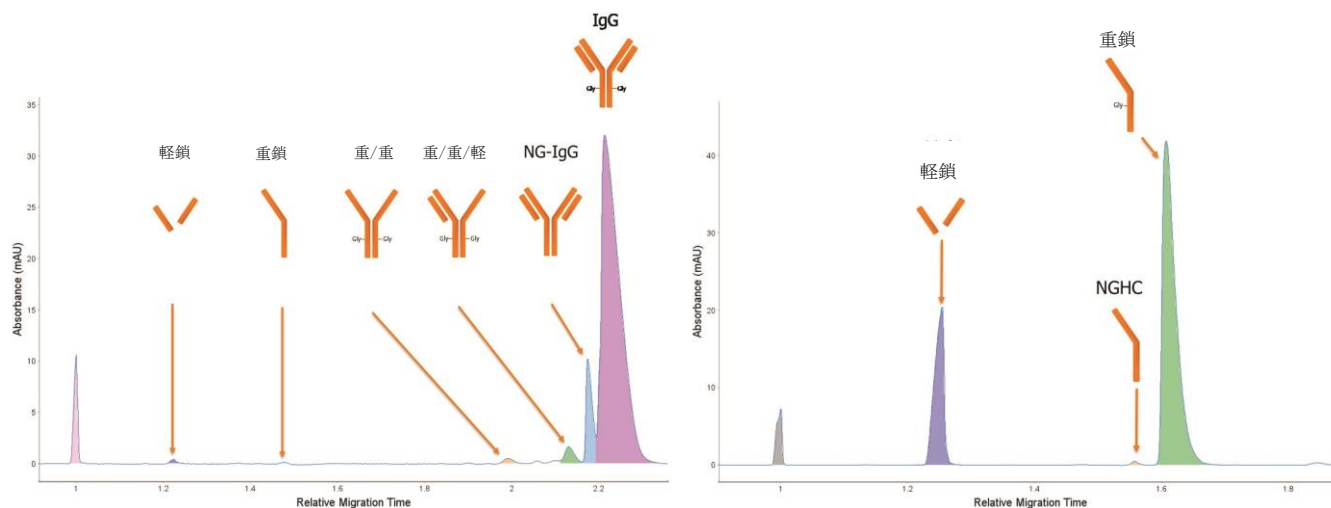


図 17. IgG1k の断片化プロファイル。IgG1k (1 mg / mL) は、還元剤の存在下または非存在下で変性した。さまざまなフラグメントのイラストが含まれている。

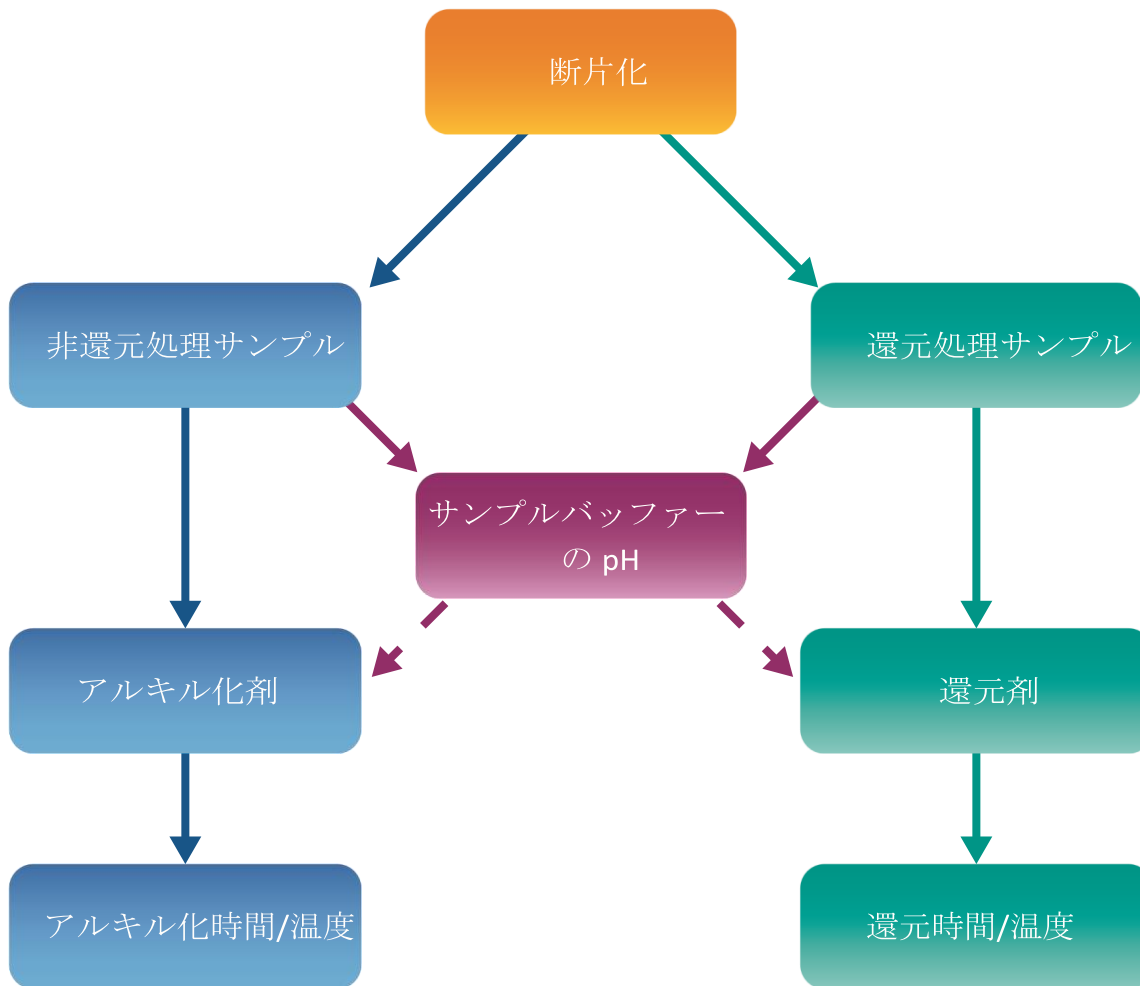
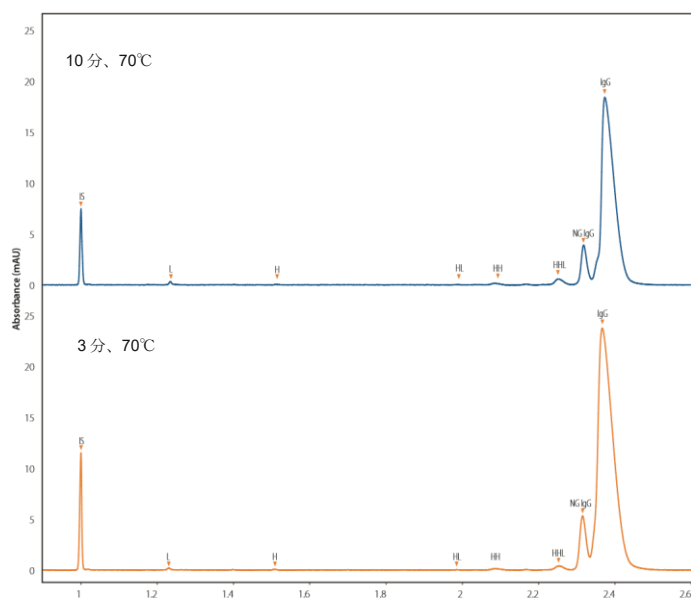


図 18. 予期せぬ断片化に対処するためのワークフロー

Maurice CE-SDS Method Development Guide



サンプル	IgG	NG IgG	重/重軽	重/重	重/軽	重	軽
10分、70℃	88.0	8.8	1.9	0.5	0.0	0.1	0.7
3分、70℃	89.5	8.8	0.9	0.3	0.0	0.1	0.3

図 19. IgG 熱処理時間短縮の影響。70℃、10分後で、全ピーク面積の約 3.1%は低分子量断片化に起因する可能性。より短い時間熱処理すると、全ピーク面積の 1.5%のみが断片由来。

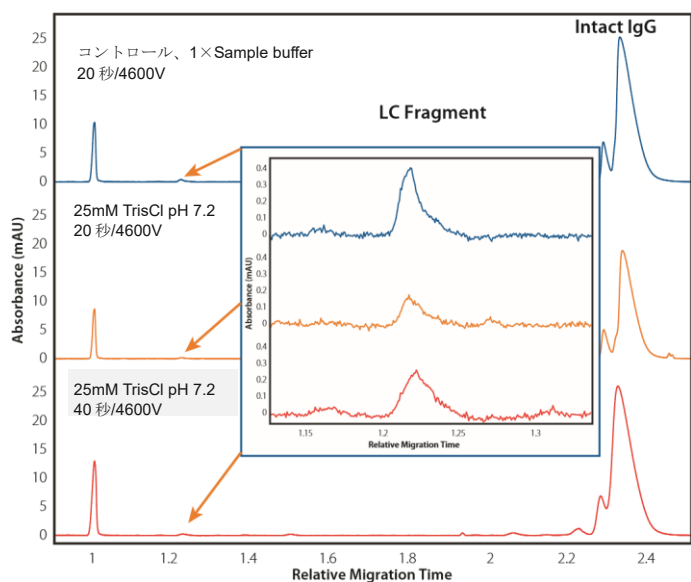


図 20. サンプルバッファの pH は EK インジェクションに影響。非還元型 IgG 0.5 mg/mL を 20 秒のインジェクションで 1X Maurice Sample Buffer (pH 9.5) (A)、25 mM Tris pH 7.2 (B)、または 40 秒のインジェクションで 25 mM Tris pH 7.2 のいずれかで測定。インジェクション時間を長くすると、pH の低いサンプルバッファの低い EK インジェクション効率を償う。

サンプルバッファの PH を下げて断片化を低減

多くの場合、各 mAb に最適化された製剤バッファが決められています。これらのバッファは通常、pH 4~7.4 であり、理想的にはタンパク質の安定性を最大にするように選択されています。これらのバッファは、最終的な導電率が許容範囲内（結果として得られる電流が 25 μ A 未満）で、最終的な SDS 濃度が 1~2%である限り、サンプルバッファとして Maurice で使用することができます。

一般に、低い pH のサンプルバッファでは、インジェクション効率が低下する可能性があるため、インジェクション時間を増やす必要があります。図 20 では、Maurice でデフォルトのサンプルインジェクション時間で測定する前に、非還元型 IgG サンプル (0.5 mg/mL) を Maurice 1X Sample Buffer (上部パネル) または 25 mM Tris pH 7.2 (中央パネル) で希釈しました。Tris バッファで希釈したサンプルのシグナルは約 50%小さくなります。インジェクション時間を 40 秒 (下のパネル) に延長すると、Maurice 1X Sample Buffer で希釈したサンプルと同等のデータが得られます。

見かけ上の分子量の決定

タンパク質の見かけ上の分子量を決定するには、測定時に Maurice CESDS Molecular Weight Markers (PN 046-432) を使います。分子量ラダーの範囲は 10~270 kDa で、バッチ作成時に既存の MW Markers メソッドを使用して測定する必要があります。サンプルタンパク質の分子量がレポートされるように、Compass for iCE ソフトウェアの Analysis 設定ウィンドウで分子量ラダーを必ず有効にしてください (図 21)。デフォルトではソフトウェアは、分子量決定用のラダーはないものと想定しています。Markers Injection ボックス (オレンジ) を変更することにより、MW ラダーを使用したインジェクションを設定し、サンプルの見かけ上の分子量を決定することができます。

マーカーのインジェクション番号を設定すると、目的のタンパク質の分子量が Compass for iCE の Peaks テーブルに表示されます。図 22 は、還元型 IgG と比較した分子量ラダーの移動パターンを示しています。

Maurice CE-SDS Method Development Guide

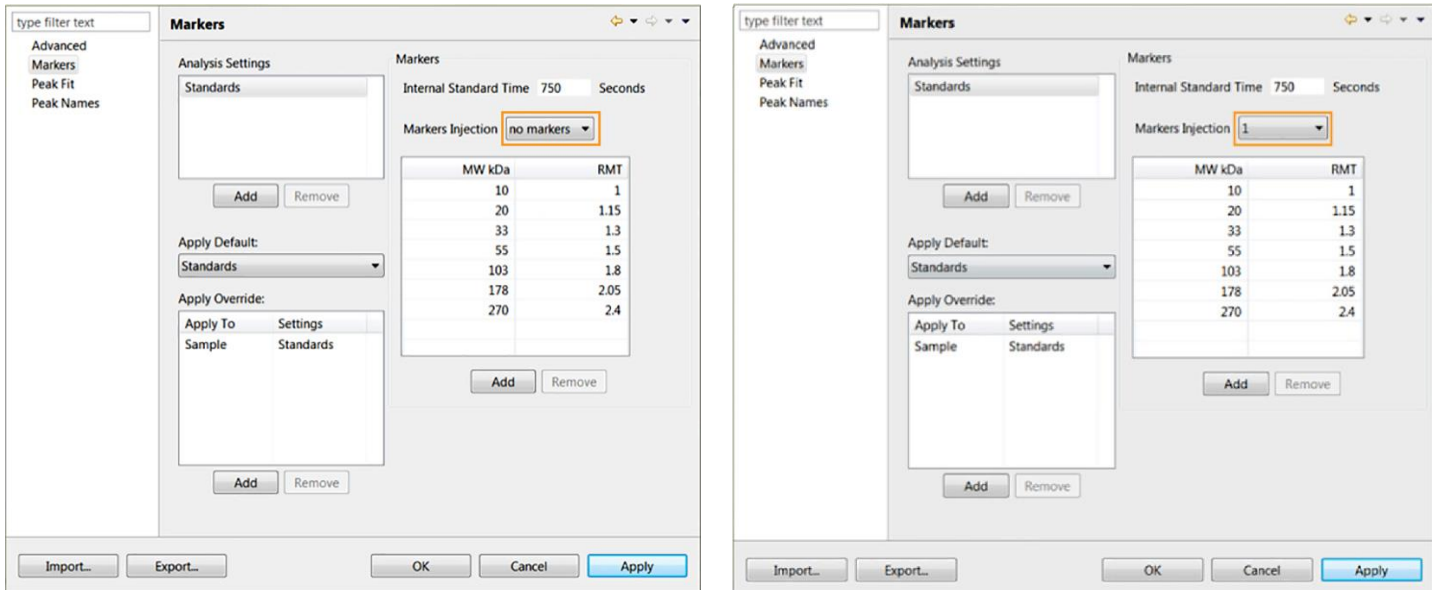
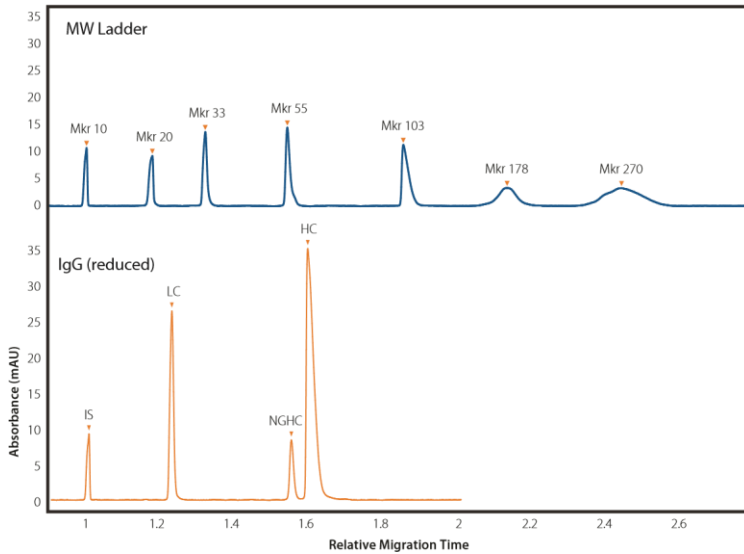


図 21. Compass for iCE ソフトウェアで分子量スタンダードを有効にする。



PEAK	NAME	RMT	MW (kDa)	AREA	%TOTAL	RESOLUTION
1	IS	1.000	10	162.8		
2	LC	1.221	24	507.9	30.5	15.42
3	NGHC	1.540	55	137.2	8.2	19.00
4	HC	1.583	62	1021.8	61.3	2.39

図 22. 還元型 IgG と CE-SDS 分子量ラダーの並列測定。ラダー有効時、Compass for iCE は還元型 IgG の MW (分子量) を追加してリスト表示する。

付録

個々のバッファー成分

成分	テスト範囲	推奨範囲	推奨範囲外濃度での影響	推奨事項
Arginine	100-200 mM	200 mM まで	最大濃度は効果なし	
Ascorbic acid	2-10 mM	≤10 mM	僅かにシグナル減少	インジェクション時間を最大 25~30 秒に増やす
EDTA	5-20 mM	20 mM まで	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
Glycerol	5-25%	≤25%	小さなシグナルは減少	インジェクション時間を最大 25~30 秒に増やす
Glycine	10-200 mM	≤200 mM	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
HEPES pH 7.2	20-100 mM	20 mM	シグナル強度に悪影響を及ぼす	20 mM 以下に希釈、インジェクション時間を最大 40~50 秒に増やす
L-Histidine HCl	20-100 mM	≤50 mM	シグナル強度に悪影響を及ぼす	50 mM 以下に希釈、インジェクション時間を最大 40~50 秒に増やす
L-Methionine	1-5 mM	≤5 mM	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
Maltose	2-10%	≤10%	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
Mannitol	1-5%	≤0.05%	分離度とピーク形状に悪影響を及ぼす	0.5%以下に希釈
NaCl	10-150 mM	≤40 mM	シグナル強度に悪影響を及ぼす	40 mM 以下に希釈、インジェクション時間を最大 40~50 秒に増やす
PBS	10-50%	≤25%	シグナル強度に悪影響を及ぼす	25 mM 以下に希釈、インジェクション時間を最大 40~50 秒に増やす
PEG 300, 400	1-10%	≤5%	ピークのテーリングを引起こし、シグナル強度に悪影響を及ぼす	5%以下に希釈
Proline	100-200 mM	≤200 mM	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
PVP (MW 40,000)	0.2-10%	<1%	ピーク形状とシグナル強度に悪影響を及ぼす	1%以下に希釈
Sodium acetate	250 mM	≤100 mM	シグナル強度に悪影響を及ぼす	100 mM以下に希釈
Sorbitol	0.5-5%	≤0.05%	分離度とピーク形状に悪影響を及ぼす	0.5%以下に希釈
Sucrose	100-300 mM	≤300 mM	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
Thimerosal	0.0025%-0.01%	≤0.0025%	ピーク形状とシグナル強度に悪影響を及ぼす	0.0025%以下に希釈

Maurice CE-SDS Method Development Guide

Trehalose	100-300 mM	≤300 mM	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
TrisCl pH 7.6	20-100 mM	50 mM	シグナル強度に悪影響を及ぼす	50 mM 以下に希釈、インジェクション時間を最大 40~50 秒に増やす
Tween 20	0.02-0.05%	≤0.05%	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
Tween80 (P80, polysorbate 80)	0.02-0.05%	≤0.05%	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈

確認済みバッファー

成分	テスト範囲	推奨範囲	推奨範囲外濃度での影響	推奨事項
80 mM histidine, 110 mM NaCl, 0.05% P80		≤25%	分子量>10 kDa でシグナルが著しく減少	25%以下に希釈
25 mM histidine, 250 mM glycine, 1% sucrose, 0.01% P80 pH5.8		50%	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
20 mM histidine, 10% sucrose, 0.02% P80 pH 6.0		50%	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
10 mM histidine, 130 mM sodium bicarbonate, 5% sucrose, 0.01% P80 pH5.5		50%	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
10 mM histidine-HCl, 5 mM methionine, 8% trehalose, 40 mM NaCl, 0.05% Tween20, pH6.5		≤50%	シグナル強度がいくらか減少	インジェクション時間を最大 30~40 秒に増やす
200 mM arginine, 0.01% P80 adjusted to pH7.3 with phosphoric acid		50%	最大濃度でも影響示さず	サンプルバッファーで 1:1 に希釈
3% Proline, 10 mM Tris, 10 mM sodium phosphate, 5% sucrose, 0.02% P80, pH7.0		50%	シグナル強度がわずかに減少	インジェクション時間を最大 25~30 秒に増やす
10 mM acetate, 5% sorbitol, 0.04% P80 pH 5.5		≤25%	ピーク形状と % area に影響	25%以下に希釈
17 mM sodium citrate, 3 mM citric acid, 5% sucrose, 0.02% P80 pH 5.0		≤25%	シグナル強度に悪影響を及ぼす	25 mM 以下に希釈、インジェクション時間を最大 40~50 秒に増やす
0.3 mg/mL sodium citrate, 1.8 mg/mL citric acid, 125 mM NaCl pH 5.0		≤25%	シグナル強度に悪影響を及ぼす	25 mM 以下に希釈、インジェクション時間を最大 40~50 秒に増やす