

MauriceFlex cIEF Fractionation メソッド開発ガイド



イントロダクション

MauriceFlex cIEF Fractionation 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、多様多種のタンパク質に対応できるよう、Fluorescence Calibration Standardやfractionation 試薬の他、サンプル準備に必要な全ての試薬、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。MauriceFlexの測定準備ができていないかを確認するためにSystem Suitability Kit（システム適合性キット）も含まれています。このcIEF Fractionationメソッド開発ガイドはあらゆるステップで役立ちます。複数分子に利用できるMauriceFlexの汎用性の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。

MauriceFlex cIEF Fractionation Method Development Kitの内容 (PN PS-MDK01-F)

pIマーカー

製品番号	試薬	数量/容量*
046-028	Maurice cIEF pI marker - 3.38	210 µL
046-029	Maurice cIEF pI marker - 4.05	210 µL
046-030	Maurice cIEF pI marker - 5.85	210 µL
046-031	Maurice cIEF pI marker - 6.14	210 µL
046-032	Maurice cIEF pI marker - 7.05	210 µL
046-033	Maurice cIEF pI marker - 8.40	210 µL
046-047	Maurice cIEF pI marker - 9.50	210 µL
046-034	Maurice cIEF pI marker - 9.99	210 µL
046-035	Maurice cIEF pI marker - 10.17	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	Anolyte Solution	0.08 M H ₃ PO ₄ in 0.1% Methyl Cellulose	2 x 10 mL
102506	Catholyte Solution	0.1 M NaOH in 0.1% Methyl Cellulose	2 x 10 mL
102505	0.5% MC	0.5% Methyl Cellulose	2 x 10 mL
101876	1.0% MC	1.0% Methyl Cellulose	1 x 10 mL
046-025	Maurice cIEF Fluorescence Calibration Standard	Fluorescence standard for cIEF Calibration	1 x 5.5 mL
Not sold separately	Urea	Lyophilized urea	5 vials
046-574	SimpleSol Protein Solubilizer	SimpleSol stock solution for protein solubilization for cIEF	1 x 24 mL
042-691	500 mM Arginine	500 mM arginine. For use as a cathodic blocker	1 x 500 µL
046-044	Maurice cIEF System Suitability Kit	The kit contains 8 tubes of lyophilized System Suitability Peptide Panel and 1 vial of System Suitability Test Mix	1 kit
046-580	2 M Ammonium Acetate	2 M ammonium acetate. For use as fractionation mobilizer	1 x 350 µL

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)	200 µL
5-8	Pharmalyte pH 5-8 (Pharmalyte PN 17-0453-01)	100 µL
2.5-5	Pharmalyte pH 2.5-5 (Pharmalyte PN 17-0451-01)	100 µL
8-10.5	Pharmalyte pH 8-10.5 (Pharmalyte PN 17-0455-01)	200 µL
2-9	Servalyt pH 2-9 (seed grade, Servalyt PN 42935)	50 µL

消耗品

18 - 25 °C保存。

製品番号	説明	数量/容量
101-0059*	cIEF Fractionation Cartridge	1
110-0019	MauriceFlex crimp top glass reagent vials, 2 mL	2 x 100
110-0018	MauriceFlex glass vials with insert, 0.3 mL	15
102-0012**	Maurice 96-well plates	15

*cIEF Fractionationカートリッジを再注文する際は、PN PS-MC02-Fを注文してください

**Maurice 96-well plates (quantity 10)を再注文する際は、PN 046-021を注文してください

注文情報

このキットは以下で再注文できます:

- **Phone:** 1-888-607-9692, option 1
- **Fax:** 1-408-520-4831
- **Email:** orders@proteinsimple.com

別途要購入品

- Maurice cIEF用の消耗品
 - Maurice cIEF Cartridge PN PS-MC02-C
 - 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
- Maurice sample vials with integrated inserts, 0.2 mL, PN 046-083 (optional)
- 精製水 (DI) もしくはLC-MSグレード
- Iminodiacetic acid (Millipore PN 22000)
- 15 mLの遠心チューブ
- ピペットとチップ
- 卓上遠心機とチューブ
- ボルテックス

- 氷とアイスバケツ
- プレートアダプター付き遠心機 (サンプルバイアル PN 046-083 を使用する場合は、12 mm、2 mL バイアル用のバイアルアダプター)
- 96ウェルプレートアダプター付き分光光度計、または280/350 nm蛍光を備えたプレートリーダー (オプション)

バッファー交換 - "Appendix D: Desalting and concentrating samples"参照

- Amicon Ultracel 50K membrane centrifugal filter (Millipore PN UFC9050)
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。
- 1 M Tris-HCl buffer pH 7.0 (Life Technologies PN AM9851)

サンプルの変性 - "Appendix E: Denaturing sample preparation."参照

- Urea, electrophoresis grade (Sigma-Aldrich PN U6504)
注: タンパク質の沈殿を防ぐために4 Mの尿素が必要な場合に必要です。

良い結果へのガイドライン

- 凍結乾燥状態の尿素は乾燥し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、再利用しないでください。
- 凍結乾燥のペプチドを溶解した後は、分注して-20 °Cで保存してください。溶解後のペプチドは2 - 8 °Cで1か月、-20 °Cで6か月保存できます。
- MauriceFlex FractionationとMauriceFlex cIEFバッチにおけるpIマーカースンプル溶液で少なくとも50倍希釈して使用します。Maurice cIEFバッチのpIマーカースンプル溶液で100倍希釈して使用します。
- MauriceFlexバッチの準備が整うまで、溶解後のpIマーカースンプルと調製したサンプルは氷上に保管します。
- フラクシオンを質量分析する場合は、LC-MSグレードの水を使用してください。
- 各バッチには、フレッシュなAnolyte、Catholyte、Fluorescence Calibration Standard、0.5% MCおよび調整済みMobilizer溶液を使用してください。
- 試薬やバイアルを再利用しないでください。
- カートリッジを扱う際、またはパッケージから取り出す際は、キャピラリーの先端部分に接触しないように注意してください。カートリッジを持っている間はキャピラリーに触れないようにしてください。

- 保存する前は必ずpost-run cleanupを行い、必ず元のパッケージに入れて室温で保管してください。
- 使用する前に、必ずcIEF Fractionationメソッド開発ガイドを全て読んでください。

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:

- Maurice cIEFと同様の数のピークを持つピークプロファイルを取得します
- サンプルとpIマーカーのすべてのピークがフォーカシングの最終画像に表示されます

メソッド開発は通常、Maurice cIEFメソッドのいくつかのパラメータを最適化するだけです。大抵、Maurice cIEFメソッドのサンプルに20 mM arginineを追加するだけで十分な性能を発揮するため、さらに最適化する必要はありません。

フラクショネーションがうまくいかない、または沈殿・凝集しやすい分子を扱う場合は、図 1に従いメソッドを最適化します。最初は、一般的なメソッドで、分離電流とフォーカシング後のピークを評価します。目的のピークが得られたら、目的のピークの純度や濃度に合わせてフラクショネーションを最適化します。

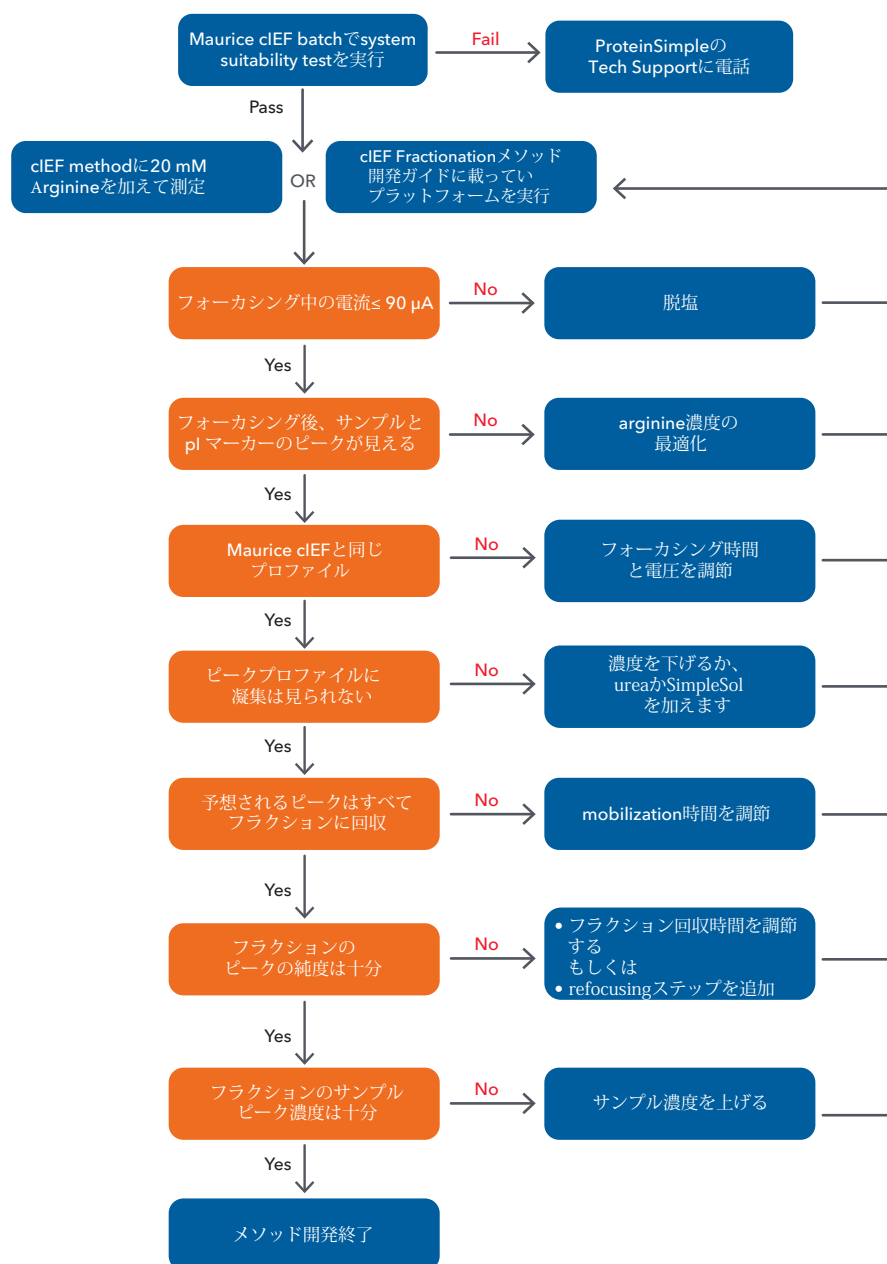


図 1. cIEFフラクショネーションのメソッド開発ワークフロー

ステップ1. MauriceFlexの性能チェック

MauriceFlex cIEF Fractionation Method Development Kit には、メソッド開発を始める前に、MauriceFlex が正しく機能するかを確認するためにシステム適合性 (System Suitability) テストサンプルが含まれています。

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 µL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 µL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1.5 mLの遠心チューブに移します。
6. チューブを3回、それぞれ5秒間ボルテックスします。

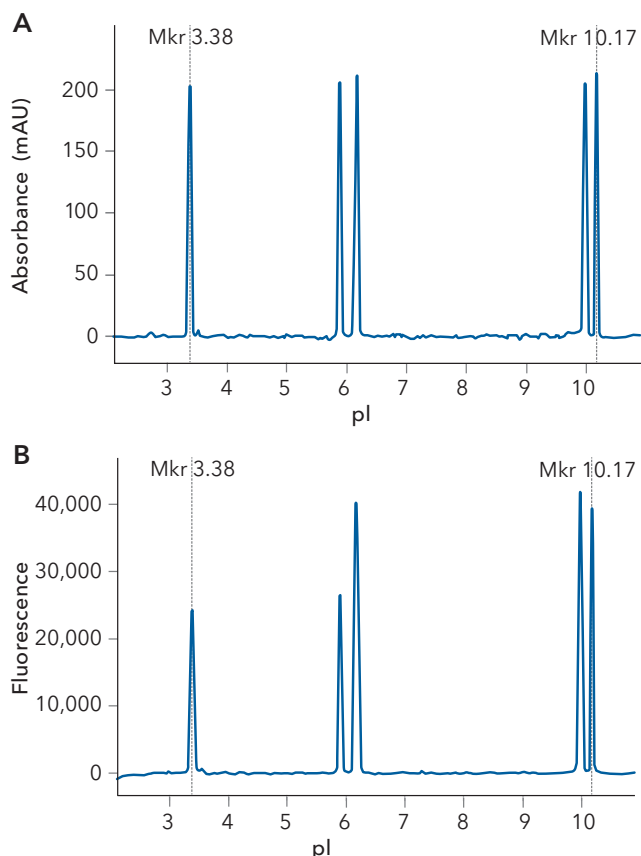


図 2. Maurice cIEFバッチを用いたSystem SuitabilityテストのUV吸光度測定結果 (A) と蛍光測定結果 (B)。

7. チューブを 10,000 xg 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 µL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、ある場合は取り除きます。

9. バイアルを使用する場合、透明なスクリュウ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 xgで5分間遠心します。

MAURICE cIEFのセットアップと測定開始

1. バッチ試薬を準備し、MauriceFlexにセットします。準備の詳細は "付録 A: Maurice cIEF試薬の準備" を参照してください。
2. スライドロックを左から右にスライドし、バッチ試薬を所定の位置にロックします。
3. MauriceFlex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。
4. "付録 B: Maurice cIEFカートリッジの準備" に従ってカートリッジを準備し、MauriceFlexに取り付けます。
5. Compass for iCEを起動します。
6. Batchスクリーンをクリックします。
7. Fileメニューより **New Batch** をクリックし、**Maurice cIEF** を選択します。
8. 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。
9. 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	
Focus Period 1	時間: 1.0 分 電圧: 1500 V
Focus Period 2	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	pI 3.38: 300 ピクセル pI 10.17: 1800 ピクセル

10. 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。

11. バッチを保存します。
12. **Start**をクリックします。
13. バッチ終了後、"付録 C: Maurice cIEFカートリッジのpost-run cleanup"に従って、カートリッジのpost-run cleanupを実行します。

予想される結果

1. 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ります。
 - 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は異なるため、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異なります。

2. 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、support@proteinsimple.com でアプリサポートへお問い合わせください。

ステップ 2. cIEF Fractionation メソッド開発

フォーカシングの最適化

MauriceFlex cIEF fractionation のメソッド開発は cIEF Fractionation カートリッジで分子のプロファイルを検証することから始まります。

- オプション 1: Maurice cIEF メソッドが開発されている場合、まず、cIEF サンプルに arginine を加え、pI マーカーを増やし、cIEF Fractionation カートリッジで似たようなプロファイルが得られるかを確認します。
- オプション 2: Maurice cIEF メソッドをまだ開発していない場合、[Maurice cIEF Method 開発ガイド](#) に従ってメソッドを開発し、オプション 1 とこのガイドに従って cIEF Fractionation カートリッジで follow-up run を実行します。

- オプション 3: このガイドのいずれかの MauriceFlex プラットフォームに従い、cIEF Fractionation カートリッジのピークプロファイルをテストします。さらに最適化が必要になる場合もあります。

フォーカシングの最適化は、まず、cIEF Fractionation Cartridge を用いて MauriceFlex cIEF バッチを実行し、分離電流とピークプロファイルを評価します。このバッチタイプは cIEF 分離のみを行い、フラクショネーションは行わないため、MauriceFlex でのフォーカシング方法を迅速に検証することができます。Maurice cIEF Cartridge (PN PS-MC02-C) に比べ、cIEF Fractionation カートリッジの分離キャピラリーは長いので、カートリッジの光学窓内にピークを集中させるために、cathodic blocker として arginine をサンプルに追加する必要があります。MauriceFlex cIEF および MauriceFlex Fractionation バッチのサンプルを準備する手順については、次のセクションで説明します。

サンプル成分、特に塩は、cIEF メソッドにおいて分離を妨げる可能性があります。サンプル溶液中の塩濃度が 10 mM を超えると、pH グラディエントが圧縮し、より高い分離電流が流れ、cIEF Fractionation カートリッジを損傷する可能性があります。タンパク質濃度が高い (>20 mg/mL) 場合、タンパク質をサンプル溶液の中で最終使用濃度 (1 mg/mL) に希釈し、分析を成功させるのに十分、イオン強度を下げる必要があります。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を用いて、cIEF Fractionation Cartridge を用いたフォーカシングとフラクショネーションを最適化することができます：

- バッファーを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、イオン濃度を下げ、複数回のフラクショネーションからフラクションをプールして目的のフラクションを回収します。
- サンプルの成分が cIEF メソッドにどのような影響を与えるかについての詳細は、[Maurice cIEF Method Development Guide](#) を参照してください。

サンプル溶液の準備

最初の測定では、サンプルのタンパク質濃度 ~1 mg/mL で、塩濃度は 10 mM 未満である必要があります。例えば、150 mM の NaCl を含む 15 mg/mL のサンプルの場合、3 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 1 mg/mL のタンパク質と 10 mM の NaCl が含まれます。

サンプルのタンパク質濃度が低いか、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。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 D: サンプルの脱塩と濃縮" を参照してください。

既にMaurice cIEFメソッドで分析をしている場合、cIEF Fractionationカートリッジを使用するとき20 mM arginineを追加し、フォーカシング後にすべてのピークと pIマーカーが見えるようにします。20 mM arginineの添加前後のMaurice cIEFとMauriceFlex cIEFを用いたピークプロファイルの比較については図3を参照してください。まだMaurice cIEFメソッドを開発していない場合は、表1-3にあるMauriceFlexプラットフォームメソッドのいずれかでサンプルを準備します。

1. サンプルを水で5 mg/mLに希釈します。タンパク質が5 mg/mL未満の場合は、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 D: サンプルの脱塩と濃縮"を参照してください。
2. サンプルあたり160 µL of MauriceFlex cIEF Master Mixを準備します：
 - a. 自身のcIEFメソッドを用いる場合、サンプル溶液に1.5%の各 pI マーカーと 20 mM arginineが含まれるようにマスターミックスを調整します。
 - b. プラットフォーム法を使用する場合は、表 1-3のマスターミックスを準備します(準備するサンプルの数 = X)。分子のpIに基づいてマスターミックスを選択します。
3. 100 µLのMauriceFlex cIEFマスターミックス溶液をサンプルごとに個別のマイクロ遠心チューブに加えます。
4. 25 µLの5.0 mg/mLのタンパク質サンプルをチューブ内で100 µLのMauriceFlex cIEFマスターミックスを混ぜます。
5. 各サンプルをしっかりボルテックスし、完全に混合します。
6. 13,000 xgで5分間遠心して気泡を除去し、粒子を沈殿させます。
7. 溶液の上部100 µLを慎重に吸引し、96ウェルプレートにピペットします。気泡が入らないように、溶液を分注するときはピペットチップをウェルの底までしっかり入れてください。

注: MauriceFlex cIEFバッチを実行する場合、プレート内のどの段にもサンプルを加えることができます。

注: 100 µLのサンプルを用いて最大2回インジェクションすることができます。同じ調製サンプルで複数のメソッドをテストする場合は、インジェクション4回分の150 µLのサンプルを調製します。
8. 遠心プレートアダプターを使用して、サンプルプレートを5分間1000 xgで遠心します。

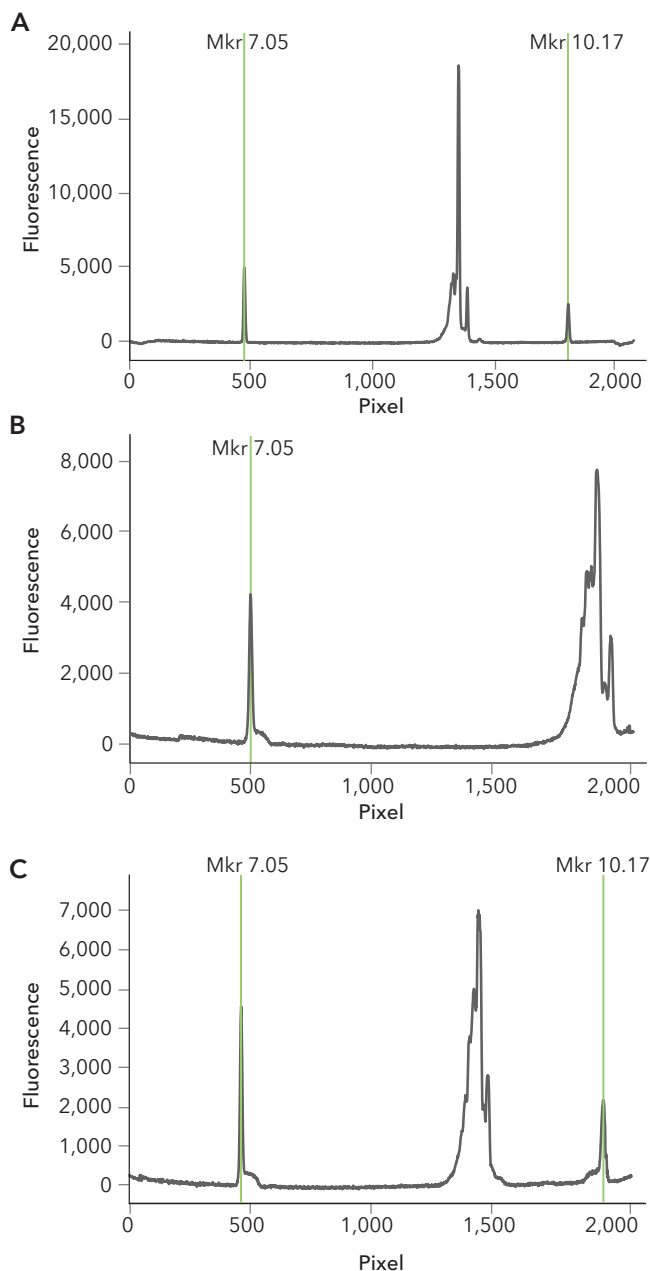


図3. MauriceFlex cIEFメソッド用に20 mM arginineを加えたときの効果。Maurice cIEFサンプル溶液を用いて、cIEF CartridgeではNIST mAbを0.2 mg/mL (A)、cIEF Fractionation Cartridgeでは0.5 mg/mL (B)、そしてさらに20 mM arginineを加えたMaurice cIEFサンプル溶液を用いて0.5 mg/mLで実行しました(C)。20 mM arginineをサンプルに加えると、塩基性pIマーカー(10.17)がcIEF Fractionation Cartridgeの光学窓で見えるようになります。Maurice cIEFサンプル溶液には0.35% methyl cellulose、1% Pharmalyte 3-10、3% Pharmalyte 8-10.5、およびcathodic blockerとして5 mM arginineを加えました。Maurice cIEFで1500 Vで1分間、続けて3000 Vで8分間サンプルを分離しました。MauriceFlex cIEFで500 Vで10分間、1000 Vで10分間、続けて1500 Vで25分間サンプルを分離しました。

MauriceFlex cIEFマスターミックス	サンプルの終濃度	1サンプル	Master Mix ((1サンプル* X) + 20%)			
# サンプル数		1	2	3	4	
DI water	N/A	66 µL	158 µL	238 µL	317 µL	
1% Methyl Cellulose	0.35%	70 µL	168 µL	252 µL	336 µL	
Pharmalyte 3-10	1%	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	
Pharmalyte 8-10.5	3%	6 µL	14.4 µL	22 µL	29 µL	
500 mM Arginine	25 mM	10 µL	24 µL	36 µL	48 µL	
pI Marker 7.05	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
pI Marker 10.17	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
Total volume		160 µL	384 µL	576 µL	768 µL	

表1. pI 8 ~ 10 にほとんどの電荷変異体を持つ分子のMauriceFlex cIEF Master Mix溶液。

MauriceFlex cIEFマスターミックス	サンプルの終濃度	1サンプル	Master Mix ((1サンプル * X) + 20%)			
# サンプル数		1	2	3	4	
DI water	N/A	68 µL	163 µL	245 µL	326 µL	
1% Methyl Cellulose	0.35%	70 µL	168 µL	252 µL	336 µL	
Pharmalyte 3-10	0.8%	1.6 µL	3.8 µL	5.8 µL	7.7 µL	
Pharmalyte 5-8	1.6%	3.2 µL	7.7 µL	11.5 µL	15.4 µL	
Pharmalyte 8-10.5	1.6%	3.2 µL	7.7 µL	11.5 µL	15.4 µL	
500 mM Arginine	20 mM	8 µL	19.2 µL	29 µL	38 µL	
pI Marker 6.14	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
pI Marker 9.50	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
Total volume		160 µL	384 µL	576 µL	768 µL	

表2. pI 7 ~ 9 にほとんどの電荷変異体を持つ分子のMauriceFlex cIEF Master Mix溶液。

MauriceFlex cIEFマスターミックス	サンプルの終濃度	1サンプル	Master Mix ((1サンプル * X) + 20%)			
# サンプル数		1	2	3	4	
DI water	N/A	60 µL	144 µL	217 µL	288 µL	
1% Methyl Cellulose	0.35%	70 µL	168 µL	252 µL	336 µL	
Pharmalyte 3-10	1%	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	
Pharmalyte 5-8	3%	6 µL	14.4 µL	22 µL	29 µL	
200 mM Iminodiacetic Acid	14 mM	14 µL	34 µL	50 µL	67 µL	
500 mM Arginine	5 mM	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	
pI Marker 4.05	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
pI Marker 7.05	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
Total volume		160 µL	384 µL	576 µL	768 µL	

表3. pI 5 ~ 8 にほとんどの電荷変異体を持つ分子のMauriceFlex cIEF Master Mix溶液。

MauriceFlex のセットアップと測定開始

- fractionation adapterを装置に置きます。
注: fractionation adapterを取り付ける前に、試薬プラットフォームのPとN列にあるバイアルをすべて取り除きます。
- バッチ試薬を準備し、MauriceFlexに入れます。準備の詳細については、“付録 F: MauriceFlex cIEF試薬の準備”を参照してください。
- サンプルプレートサンプルプラットフォームに置きます。
- “付録 G: cIEF Fractionationカートリッジの準備”の手順に従いカートリッジを準備し、カートリッジをMauriceFlexに取り付けます。
- Compass for iCEを起動します。
- Batch**スクリーンをクリックします。
- Fileメニューより**New Batch**をクリックし、**MauriceFlex cIEF**を選択します。
- デフォルトのサンプルの場所はA1です。その場所を変更するには、A1を選択し、Layoutペインで**Remove**をクリックします。次に、サンプルのあるウェルをハイライト表示し、**Add**をクリックしサンプルを追加します。
- Compassでデフォルトのmethodを使用し、下記のパラメーターを使用します。
注: すべての画像の検出は蛍光のみです。

メソッドのパラメーター	設定
Focus Period 1	時間: 10 分 電圧: 500 V
Focus Period 2	時間: 10 分 電圧: 1000 V
Focus Period 3	時間: 25 分 電圧: 1500 V
Focus Period Imaging	検出間隔: 5 分 露光時間: 0.2 秒
Final Focus Detection	露光時間: 0.2 秒
サンプルロード	20 秒

- バッチを保存します。
- Start**をクリックします。
- バッチが完了したら、“付録 I: cIEF Fractionation カートリッジのpost-run cleanup”に従って、カートリッジのpost-run cleanupを実行します。

フォーカシング結果を確認して最適化する

すべてのピーク(分子とpIマーカー)がカートリッジの光学窓内に残り、初期電流が90 μ A未満である場合、フォーカシングは最適化されています。MauriceFlex cIEFバッチのデフォルトの分離設定を用いてNIST mAbを測定したときに観察されたピークプロファイル、電流および電圧プロットの例を参考のために以下に示します(図 4)。

さらに最適化が必要な場合は、次のガイドラインに従ってください。

- すべてのピークが見えるように**arginine濃度を最適化**します。MauriceFlex cIEF fractionationで使用するためにMaurice cIEFで開発したメソッドに20 mM arginineを加えることをお勧めします。塩基性 pI マーカーが表示されない場合、または pI マーカーの位置が 1900 を超える場合は、arginine濃度を濃くします。キャピラリー内に作成したpHグラディエントが最適でない場合、必要に応じてarginine濃度を調整することもできます。arginineによるpHグラディエントの圧縮は非線形であり、分子のpIによりピークプロファイルの分離度とピークシフトの程度に異なる影響を与えることがあります(図 5)。
- 蛍光検出でサンプル濃度を最適化**します。サンプル濃度を最適化してピークプロファイルを検証する場合、シグナルの飽和によるアーチファクトを避けることは重要です。シグナルの飽和は、最大値付近で平坦なピーク形状で識別でき、ピークが歪んだり、ピーク間の分離度が低下したりする可能性があります。シグナルの飽和を避けるために、ピークの蛍光強度は60,000未満でなければなりません。MauriceFlexバッチはピークの定量や分離度を評価するためのものではありませんが、同じ分子に用いたMaurice cIEFバッチとピークの数とは同等でなければなりません。

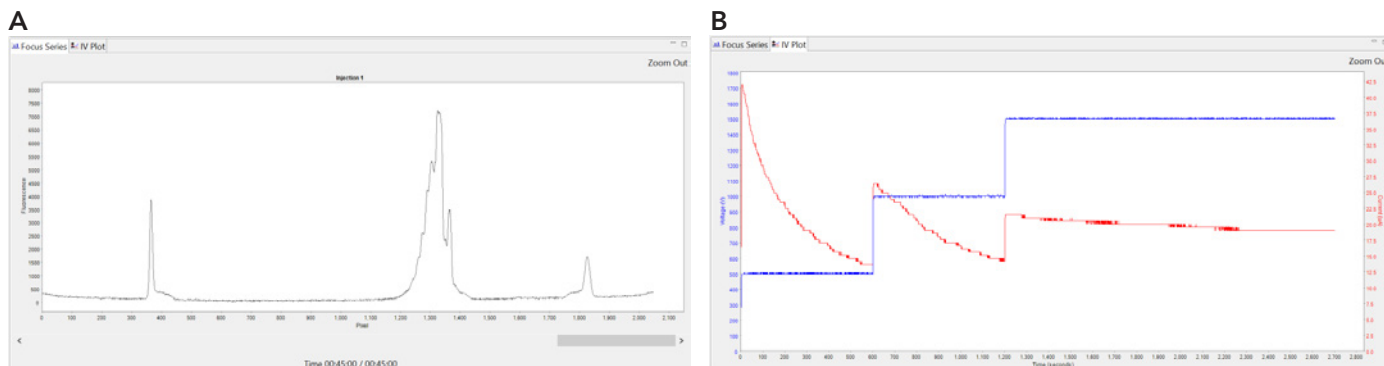


図 4. 0.5 mg/mL NIST mAbのCompass for iCEにおけるMauriceFlex cIEF分離プロファイル (A) と IVプロット (B)。サンプルには0.35% methyl cellulose、1% Pharmalyte 3-10、3% Pharmalyte 8-10.5、およびcathodic blockerとして25 mM arginineが含まれていました。MauriceFlex cIEF Fractionationカートリッジを用いて、500 Vを10分間、次に1000 Vを10分間、その後1500 Vを25分間電圧をかけてサンプルを分離しました。

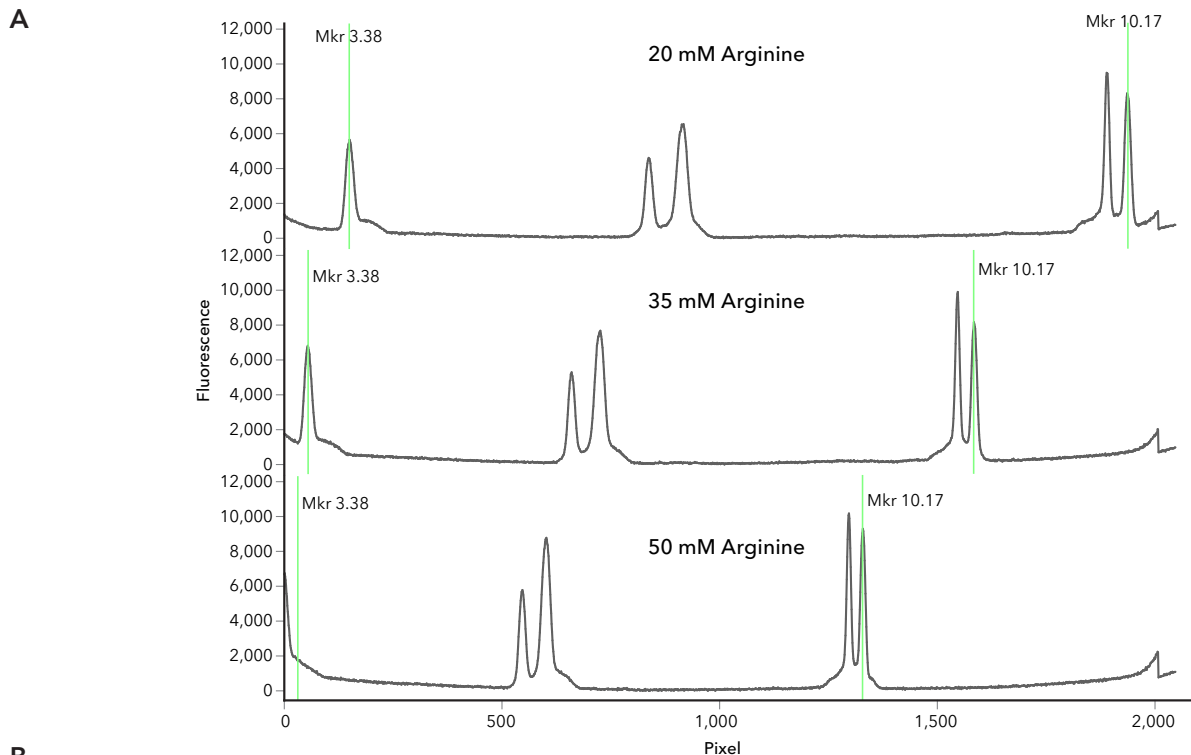


図 5. pHグラディエントに対するarginineの影響。System Suitability testサンプルに20、35、もしくは50 mM arginineを追加しました (A)。Aで示されているサンプル中のpIマーカー3.38および10.17のピクセル位置 (B)。arginineを追加していないサンプルには、0.35% methyl cellulose、4% Pharmalyte 3-10、anodic spacerとして10 mM iminodiacetic acid、cathodic blockerとして10 mM arginineが含まれています (結果は示されていません)。MauriceFlexのcIEF Fractionation Cartridgeを用いて、500 Vを10分間、次に1000 Vを10分間、続いて1500 Vの電圧を10分間かけてサンプルを分離しました。

3. **フォーカシング時間と電圧を最適化します。** デフォルトのフォーカシングでは、分離終了時に完全にフォーカシングしないことがあります。このような場合、Focus Period 3を10分に減らし、必要に応じてフォーカシングのステップを追加します (Focus Period 4 および 5) (図 6)。Focus Period 4 では、2000 Vで5分刻みで、最大10分まで延長することをお勧めします。必要に応じて、2500 Vで5分間のFocus Period 5を追加します。cIEF Fractionationカートリッジを使用する場合、拡散とフォーカシング時の電気浸透流 (EOF) の影響を最小限に抑えるため、Focus Period 3の集束時間を長くするよりも、電圧を上げてFocus Periodを追加することをお勧めします。必要に応じてフォーカシングパラメータを調整して、最小限の EOF で安定したピークプロファイルを取得します。

4. **サンプルを最適化して沈殿/凝集を最小限に抑えます**
一部の分子はMaurice cIEFバッチ実行時の濃度に比べ、通常使われる濃度よりも高いため、MauriceFlexバッチのフォーカシング中に沈殿/凝集することがあります (凝集/沈殿の詳細についてはMaurice cIEFメソッド開発ガイドを参照してください)。ピークが十分大きいにもかかわらず、

予期外のピーク (スパイクなど) を観察した際は、サンプル濃度を下げるか、サンプルにタンパク質可溶化剤を添加します (図 7)。2 Mの尿素 (調製サンプルの最終濃度) をサンプルに添加すると、ほとんどの場合サンプルの凝集が解消されます。サンプルに使用する添加剤の量を減らしたい場合は、MauriceFlex cIEF batchで濃度を下げてください。

タンパク質可溶化剤としての尿素

尿素を使用する場合は、まず尿素を溶かしてからマスターミックスに加えます:

- 1本の凍結乾燥状態の尿素を含んだバイアルに、320 μ Lの精製水を加えます。
- ボルテックスで尿素を溶解します。これにより、合計560 μ L、10 Mの尿素となります。

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

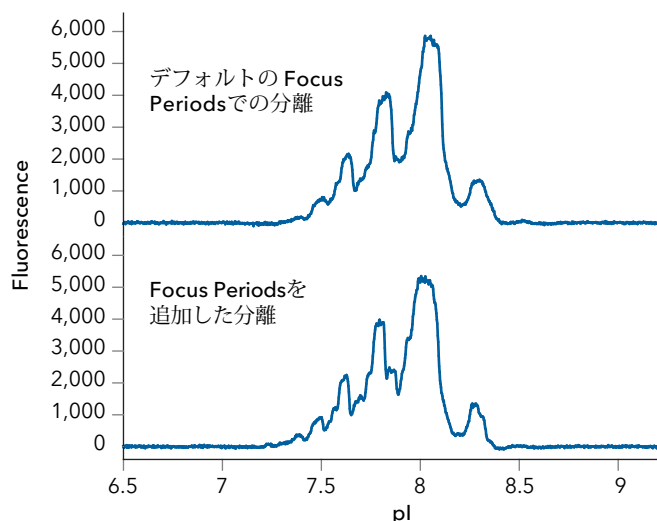


図6. Focus Periodを追加すると、ピークの解像度は向上します。1 mg/mLのmAbをMauriceFlex cIEFのデフォルトのSeparation parameter(focus period 1では500 Vで10分、focus period 2では1000 Vで10分、focus period 3では1500 Vで25分)と、focus periodを追加して最適化したSeparation parameter(focus period 1では500 Vで10分、focus period 2では1000 Vで10分、focus period 3では1500 Vで10分間、focus period 4では2000 Vで10分間、focus period 5では2500 Vで5分間)を用いて分離しました。focus periodを追加すると、Maurice cIEFで観察されたものと同様のピークプロファイルを得ました(データは示されていません)。サンプルには、0.33% methyl cellulose、0.36% Phamalyte 3-10、1.02% Phamalyte 5-8、1.02% Phamalyte 8-10.5、3.5 M urea、およびcathodic blockerとして10 mM arginineが含まれていました。

3. 最初に決定した最適なタンパク質濃度で各サンプルを希釈します。
4. 1サンプルあたり160 μ LのMauriceFlex cIEFマスターミックスを準備します:
 - a. 独自に開発したcIEFメソッドを使用する場合、最終サンプル溶液に2 Mの尿素、1.5%の各pIマーカー、および追加の20 mM arginineが含まれるようにマスターミックスを調整します。
 - b. このガイドのプラットフォームメソッドのいずれかを使用する場合、表4-6の量のマスターミックスを準備します。ここでは、準備するサンプルの数 = Xです。分子のpIに応じてマスターミックスを選択します。
5. マイクロ遠心チューブに100 μ LのMauriceFlex cIEFマスターミックスを加えます。
6. 25 μ Lのサンプルを100 μ LのMauriceFlex cIEFマスターミックスを含んだチューブに加えます。
7. 各サンプルをボルテックスし、完全に混合します。
8. 13,000 xgで5分間遠心して、気泡を取り除き、粒子を沈殿させます。
9. ピペットで溶液上部から100 μ Lの溶液をゆっくり吸引し、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、ピペットチップをウェ

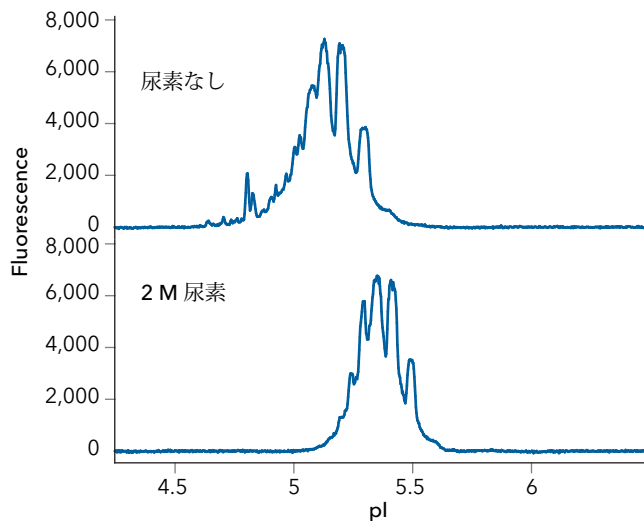


図7. 試料溶液に尿素を加えると沈殿・凝集を防ぎます。尿素を使用しない0.5 mg/mLのIgG Standard (PN 046-039)の分離では、ピークプロファイルにスパイクが見られます。2 Mの尿素を添加すると、沈殿・凝集せずにピークは分離します。尿素を含むサンプルでは、pIがわずかに変化することが予想されます。サンプルには、0.35% methyl cellulose、1% Phamalyte 3-10、3% Phamalyte 5-8、anodic spacerとして14 mM iminodiacetic acid、cathodic blockerとして15 mM arginineが含まれていました。MauriceFlexのcIEF Fractionation Cartridgeを用いて、500 Vで10分間、次に1000 Vで10分間電圧をかけ、その後1500 Vで25分間電圧をかけてサンプルを分離しました。

ルの底まで完全に入れることをお勧めします。

注: MauriceFlex cIEFバッチを実行する場合、プレート内のどの段にもサンプルを加えることができます。

10. 遠心アダプターを用いて、サンプルプレートを1000 xgで5分間遠心します。

FRACTIONATIONの最適化

MauriceFlex Fractionationバッチでは、フォーカシングの完了後に2つのステップがあります - 1つはサンプルのピークをキャピラリーの端に近づけるMobilizationステップ、もう1つは96ウェルプレートにmobilizeされた電荷変異体のフラクションを回収するフラクションステップです。同じMobilizer Solution (5 mM ammonium acetate)を用いてピークのmobilizationを開始しフラクションを回収しますが、Mobilization中はフラクションを回収しません。Mobilizationのデフォルト時間は25分で、フラクションの回収時間は1ウェルあたり45秒です。36ウェル分フラクションを行うとおおよそ31分かかります。

MauriceFlex Fractionationのセットアップと開始

1. fractionation adapterを装置に置きます。

注: fractionation adapterを取り付ける前に、試薬プラットフォームのPとN列にあるバイアルをすべて取り除きます。
2. バッチ試薬を準備し、MauriceFlexに入れます。準備の詳細については、"付録H: MauriceFlex Fractionation試薬の準備"を参照してください。

MauriceFlex cIEF Master Mix	最終サンプル濃度	単一サンプル	Master Mix ((単一サンプル* X) + 20%)			
# of Samples		1	2	3	4	
DI water		26 µL	62 µL	94 µL	125 µL	
1% Methyl Cellulose	0.35%	70 µL	168 µL	252 µL	336 µL	
10 M urea	2 M	40 µL	96 µL	144 µL	192 µL	
Pharmalyte 3-10	1%	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	
Pharmalyte 8-10.5	3%	6 µL	14.4 µL	22 µL	29 µL	
500 mM Arginine	25 mM	10 µL	24 µL	36 µL	48 µL	
pI Marker 7.05	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
pI Marker 10.17	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
Total volume		160 µL	384 µL	576 µL	768 µL	

表 4. ほとんどの電荷変異体のpIが8~10である分子用で尿素を含むMauriceFlex cIEF Master Mix溶液。

MauriceFlex cIEF Master Mix	最終サンプル濃度	単一サンプル	Master Mix ((単一サンプル * X) + 20%)			
# of Samples		1	2	3	4	
DI water		28 µL	67 µL	101 µL	134 µL	
1% Methyl Cellulose	0.35%	70 µL	168 µL	252 µL	336 µL	
10 M urea	2 M	40 µL	96 µL	144 µL	192 µL	
Pharmalyte 3-10	0.8%	1.6 µL	3.8 µL	5.8 µL	7.7 µL	
Pharmalyte 5-8	1.6%	3.2 µL	7.7 µL	11.5 µL	15.4 µL	
Pharmalyte 8-10.5	1.6%	3.2 µL	7.7 µL	11.5 µL	15.4 µL	
500 mM Arginine	20 mM	8 µL	19.2 µL	29 µL	38 µL	
pI Marker 6.14	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
pI Marker 9.50	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
Total volume		160 µL	384 µL	576 µL	768 µL	

表 5. ほとんどの電荷変異体のpIが7~9である分子用で尿素を含むMauriceFlex cIEF Master Mix溶液。

MauriceFlex cIEF Master Mix	最終サンプル濃度	単一サンプル	Master Mix ((単一サンプル * X) + 20%)			
# of samples		1	2	3	4	
DI water	N/A	20 µL	48 µL	72 µL	96 µL	
1% Methyl Cellulose	0.35%	70 µL	168 µL	252 µL	336 µL	
10 M urea	2 M	40 µL	96 µL	144 µL	192 µL	
Pharmalyte 3-10	1%	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	
Pharmalyte 5-8	3%	6 µL	14.4 µL	22 µL	29 µL	
200 mM Iminodiacetic Acid	14 mM	14 µL	34 µL	50 µL	67 µL	
500 mM Arginine	5 mM	2 µL	4.8 µL	7.2 µL	9.6 µL	
pI Marker 4.05	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
pI Marker 7.05	1.5%	3 µL	7.2 µL	10.8 µL	14.4 µL	
Total volume		160 µL	384 µL	576 µL	768 µL	

表 6. ほとんどの電荷変異体のpIが5~8である分子用で尿素を含むMauriceFlex cIEF Master Mix溶液

3. “フォーカシングの最適化”で最適化した方法を用いてサンプルを調製し、96ウェルプレートのA段にサンプルをピペットします。最初のフラクシオネーションでは、30 µLのMobilizer Solution (5 mM ammonium acetate)を同じ96ウェルプレートのB-D段すべてのウェルに加えます。
注: MauriceFlex Fractionationバッチを実行する場合、96ウェルプレートのA段にのみサンプルを加えます。

4. Mobilizer Solutionを加えたサンプルプレートをfractionation adapterに置きます。

5. “付録 G: cIEF Fractionationカートリッジの準備”に従いカートリッジを準備し、カートリッジをMauriceFlexに取り付けます。

6. Compass for iCEを起動します。

7. **Batch**スクリーンをクリックします。

8. Fileメニューより**New Batch**をクリックし、**MauriceFlex Fractionation**を選択します。

9. デフォルトのサンプルの場所はA1です。その場所を変更するには、A1 をクリックしLayoutペインで**Remove**をクリックします。次に、A段のサンプルを加えたウェルをハイライト表示し、**Add**をクリックします。

10. デフォルトのmethodを使用し、下記のパラメーターを使用します。

注: すべての画像の検出は蛍光のみです。

Methodパラメーター	設定
Focus Period 1	時間: 10 分 電圧: 500 V
Focus Period 2	時間: 10 分 電圧: 1000 V
Focus Period 3	時間: 25 分 電圧: 1500 V
フォーカシング中のイメージング	検出間隔: 5 分 露光時間: 0.2 秒
フォーカシング後の検出	露光時間: 0.2 秒
サンプルロード	20 秒
Mobilization Period	時間: 25 分 電圧: 1000 V 検出間隔: 1 分 露光時間: 0.2 秒
Fractionation Period	時間: 45 seconds per well 電圧: 1000 V 検出間隔: 1 分 露光時間: 0.2 秒
フラクシオンウェルの場所	段: B-D 列: 1-12 (合計36ウェル)

11. バッチを保存します。

12. **Start**をクリックします。

13. バッチ終了後、“付録 I: cIEF Fractionationカートリッジの post-run cleanup”に従い、post-run cleanupを実行します。

注: 分子の安定性に応じて、フラクシオネーションプレートをシール、もしくは各フラクシオンを取り出して必要に応じて4 °Cもしくは-20 °Cで保存することもできます。

cIEF Fractionation結果の検証

最適化されたcIEF fractionationメソッドにより、96ウェルプレートにサンプルピークのフラクシオンがmobilizationされ、回収されます。MauriceFlex Fractionationバッチのデフォルト設定を用いてNIST mAbを実行したときのピークmobilization と電流および電圧のプロットの例を参考のために以下に示します (図 8)。

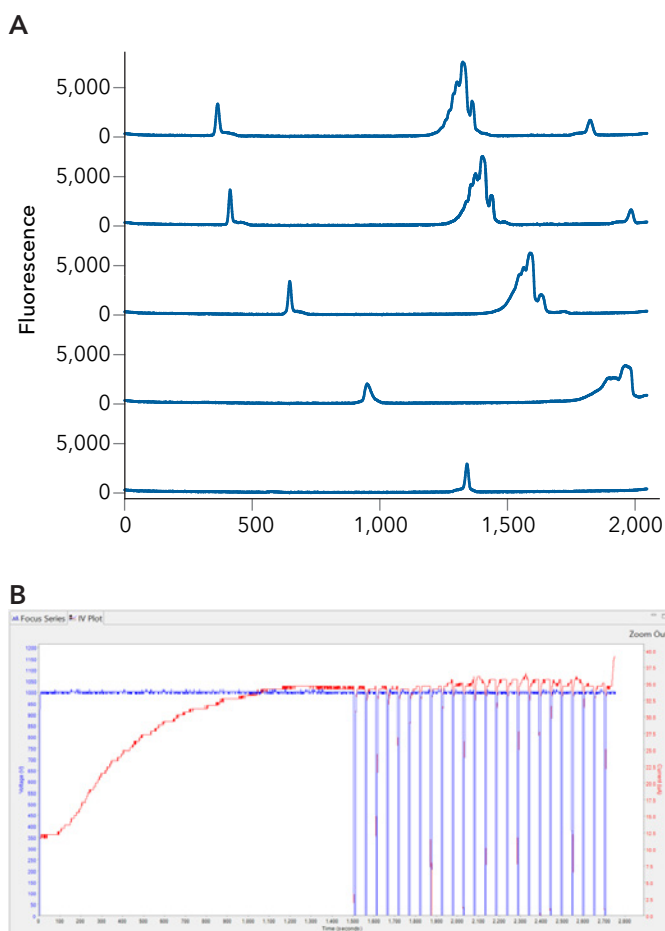


図 8. Compass for iCE で分画中の0.5 mg/mLのNIST mAbのMobilization electropherogram (A) および IV Plot (B)。サンプルには 0.35% methyl cellulose、1% Pharmalyte 3-10、3% Pharmalyte 8-10.5、および cathodic blocker として 25 mM arginineを加えました。MauriceFlexのcIEF Fractionation Cartridgeで、サンプルに500 Vで10分間、次に1000 Vで10分間、1500 Vで25分間電圧をかけて電荷変異体を分離し、その後1000 Vで25分間電圧をかけてmobilizeしました。mobilization後、45 秒間1000 Vの電圧をかけて各フラクシオンを回収しました。

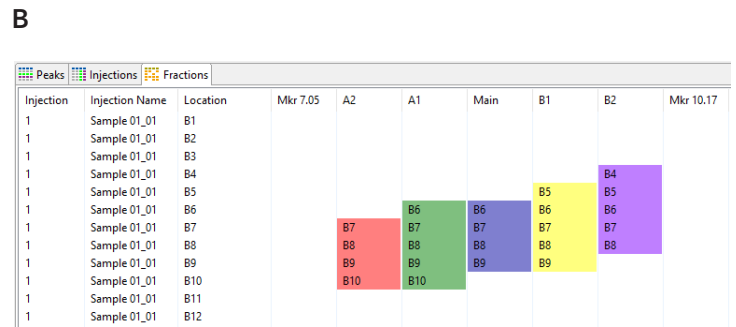
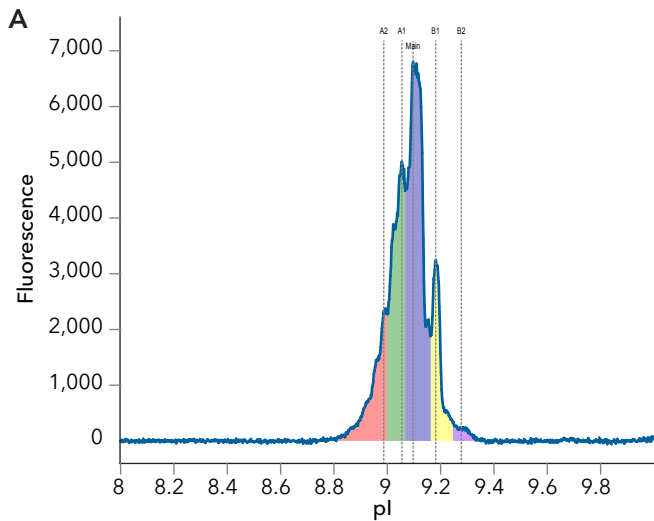


図 9. MauriceFlex FractionationバッチにおけるNIST mAbのピークプロファイル(A)と各電荷バリエーションに対する予想フラクションウェルの位置(B)。図 8と同じ条件でサンプルを準備、分離、およびFractionを回収しました。

特定のフラクションの電荷変異体と同一性を検証するには、そのフラクションを含むサンプルとフラクションネーション前のサンプルをレファレンスとしてを使用して Maurice cIEF バッチを実行することをお勧めします。フラクションで検出されたピークは、フラクションネーション前のレファレンスサンプルのピークと並べて、pIに基づいて同一性を確認できます。ピークの純度はフラクションで検出された各ピークのピーク面積の割合(%)を測定し、フラクションを評価します。ピークの純度を計算し、フラクション内の電荷変異体の濃度を推定するために、Maurice cIEFバッチで蛍光検出することをお勧めします。

純度と同一性を確認するためにフラクションの選択

AnalysisのFractionsウィンドウでピークが含まれると予測されるウェルに基づいて、検証するフラクションを選択します(図 9参照)。Compass for iCEで予測されるフラクションウェルの位置は、96 ウェル プレートに回収したフラクションに

どのピークが含まれているかを最も正確に推定するものです。予測アルゴリズムはmAbをモデルとして設計しているため、分子によっては、ピークの予測範囲外にあるウェルをチェックする必要がある場合があります。

可能な限り最良の予測を確実にするにはAnalysis - Peak Fitの下、ThresholdとWidthを調整しなければならない場合があります。cIEF Fractionationカートリッジを使用するとピークが広がるため、2つのPeak Fit Analysis Groupsを使用することをお勧めします。デフォルトのMauriceFlex Fractionation analysis settingsを使用すると、“Peak Fit” Analysis Groupはフォーカシング後のピーク図に適用され、“Peak Fit Fractions”はフラクションネーションデータに適用されます。これはmobilizationのピーク図です。図 10のデフォルト設定を参照してください。“Peak Fit Fractions”のPeak Find以下ThresholdとWidth設定

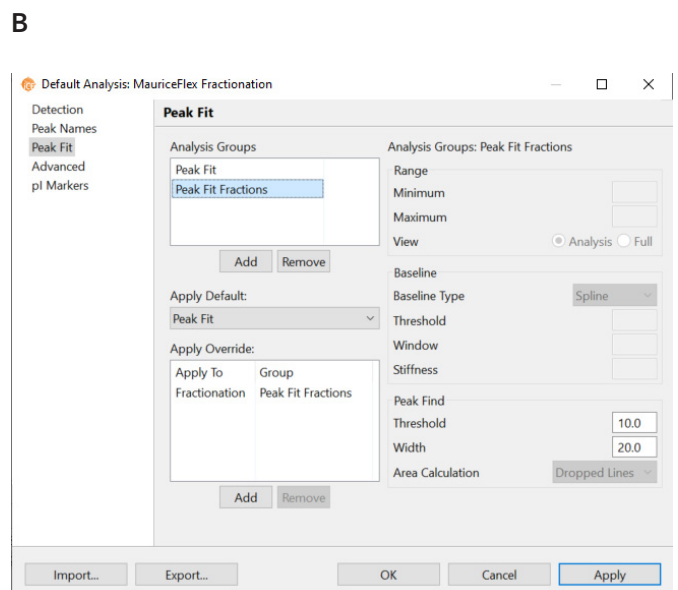
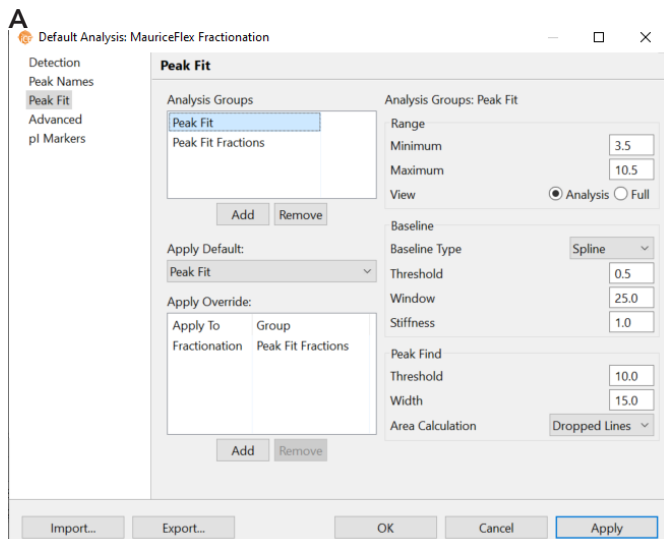


図10. MauriceFlex Fractionationバッチのデフォルトのピーク フィット設定。“Peak Fit” Analysis Groupの幅は15 (A)に設定されており、自動でフォーカシングしたサンプルのエレクトロフェログラムに適用されます。“Peak Fit Fractions” Analysis Groupの幅は、ピーク幅は20に設定されており、Mobilizationエレクトロフェログラム (B) であるFractionationデータに適用されます。Fractionationデータに適用されるPeak Fit groupsでは、ThresholdとWidthのみを変更できます。

は、回収されたピークのウェルの位置を予測するために重要であるため、すべてのmobilizationピーク図で最も酸性のpI マーカーが正確に特定されるように、必要に応じて調整しなければなりません。

Peak Fit settingsに満足したら、ピークがあると予測されるすべてのフラクションと、それらのフラクションの前後5つのフラクションを検証することをお勧めします。

また、蛍光を測定するプレートアダプターを備えた分光光度計を使用して、電荷変異体を最も含むウェル位置を推定することもできます。“read from top”機能を備えた分光光度計が必要になります。励起設定 280 nm、発光設定 350 nm でフラクションを含むfractionation plateを読み取り、電荷変異体を含むウェルを特定します。MauriceFlex 96ウェル プレートの高さ (高さ 16.1 mm) を考慮して、プレートリーダーの設定を調整する必要がある場合もあります。ただし、これは電荷変異体を最も含むフラクションを特定するのに迅速な方法ですが、Maurice cIEF バッチを用いてフラクションをチェックするほど感度は高くなく、量の少ない電荷変異体を含むフラクションを特定できません。プレートリーダーで測定されたシグナルが最も高いウェルの前後7つのウェルを選択して、Maurice cIEF バッチでフラクション中のサンプルの同一性と純度を確認することをお勧めします。

ステップ 3: Maurice cIEFでフラクションの測定

フラクションサンプルの準備

以前Maurice cIEFメソッドを開発した場合は、フラクションとレファレンスサンプルと同じseparation mix (マスターミックス) と separation parameterを使用しますが、マスターミックスと混ぜる前にフラクション前のレファレンスサンプルをMobilizer Solution (5 mM ammonium acetate)で希釈します。Mobilizer Solutionでフラクション前のレファレンスサンプルをMauriceFlex Fractionationバッチに使用するサンプル濃度より5倍低い濃度に希釈することをお勧めします。次に、同じサンプル/マスターミックス比で、フラクション前のレファレンスサンプルとフラクションサンプルの両方をマスターミックスと混合します。このガイドのプラットフォームメソッドのいずれかを使用する場合は、フラクション前のレファレンスサンプルとフラクションを表7~9のマスターミックスの1つで準備し、次のセクションに従いMaurice cIEF assayパラメーターを使用します。フラクション前後のサンプル調製例を以下に示します。

1. フラクション前のレファレンスサンプルを Mobilizer Solution (5 mM ammonium acetate) で、総量 100 μ L でフラクション前に使用した濃度より5倍低い濃度に希釈します。例えば1 mg/mLを fractionation batchに使用した場合、1 mg/mLのサンプル 20 μ Lを80 μ Lの Mobilizer Solution と混合し、フラクション前のレファレンスサンプルを希釈します。

2. マスターミックスを準備します:
 - a. 独自の cIEF メソッドを使用する場合は、十分な量のマスターミックスを20%余分をもって準備します。
 - b. このガイドのプラットフォーム法を使用する場合は、表7-9の量のマスターミックスを準備します。ここでは、準備するサンプルの数=Xです。fractionation バッチに使用したマスターミックスと同じ Pharmalyteを使用します。
3. 各サンプル用に、32 μ L の Maurice cIEF Master Mix 溶液を遠心チューブに加えます。
4. 32 μ LのMaurice cIEF Master Mixを加えたチューブに8 μ Lのサンプル (希釈したフラクション前のサンプルと各フラクション)を加えます。
5. 各サンプルを十分にボルテックスして完全に混合します。
6. 13,000 xgで5分間遠心して、気泡を取り除き、粒子を沈殿させます。
7. 各サンプルの40 μ L全体を慎重にとり、96ウェルプレートのウェルにピペットします。気泡が入らないように、溶液を分注するときはピペットチップをウェルの底までしっかりと入れてください。
8. 遠心プレートアダプターを用いて、サンプルプレートを1000 xgで5分間遠心します。

Maurice cIEFのセットアップと開始

1. バッチ試薬を準備し、MauriceFlexに入れます。準備の詳細については、“付録 A: Maurice cIEF試薬の準備”を参照してください。
2. スライドロックを左から右にスライドさせて、バッチ試薬を所定の位置にロックします。
3. 金属96ウェルプレートのインサートを MauriceFlex に置き、サンプルプレートをインサートに置きます。
4. “付録 B: Maurice cIEFカートリッジの準備”に従い、カートリッジを準備し、カートリッジを MauriceFlex に取り付けます。
5. Compass for iCEを起動します。
6. **Batch**スクリーンをクリックします。
7. Fileメニューより**New Batch**をクリックし、**Maurice cIEF**を選択します。
8. 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。

Maurice cIEF Master Mix	最終サンプル濃度	単一サンプル	Master Mix ((単一サンプル * X) + 20%)			
# of samples		1	5	10	15	
DI water	N/A	15.2 µL	91 µL	182 µL	274 µL	
1% Methyl Cellulose	0.35%	14 µL	84 µL	168 µL	252 µL	
Pharmalyte 3-10	1%	0.4 µL	2.4 µL	4.8 µL	7.2 µL	
Pharmalyte 8-10.5	3%	1.2 µL	7.2 µL	14.4 µL	22 µL	
500 mM Arginine	5 mM	0.4 µL	2.4 µL	4.8 µL	7.2 µL	
pI Marker 7.05	1%	0.4 µL	2.4 µL	4.8 µL	7.2 µL	
pI Marker 10.17	1%	0.4 µL	2.4 µL	4.8 µL	7.2 µL	
Total volume		32 µL	192 µL	384 µL	576 µL	

表 7. ほとんどの電荷変異体のpIが8~10である分子用のMauriceFlex cIEF Master Mix溶液。

Maurice cIEF Master Mix	最終サンプル濃度	単一サンプル	Master Mix ((単一サンプル * X) + 20%)			
# of samples		1	5	10	15	
DI water	N/A	15.6 µL	94 µL	187 µL	281 µL	
1% Methyl Cellulose	0.35%	14 µL	84 µL	168 µL	252 µL	
Pharmalyte 3-10	0.8%	0.3 µL	1.9 µL	3.8 µL	5.8 µL	
Pharmalyte 5-8	1.6%	0.6 µL	3.8 µL	7.7 µL	11.5 µL	
Pharmalyte 8-10.5	1.6%	0.6 µL	3.8 µL	7.7 µL	11.5 µL	
pI Marker 6.14	1%	0.4 µL	2.4 µL	4.8 µL	7.2 µL	
pI Marker 9.50	1%	0.4 µL	2.4 µL	4.8 µL	7.2 µL	
Total volume		32 µL	192 µL	384 µL	576 µL	

表 8. ほとんどの電荷変異体のpIが7~9である分子用のMauriceFlex cIEF Master Mix溶液。

Maurice cIEF Master Mix	最終サンプル濃度	単一サンプル	Master Mix ((単一サンプル * X) + 20%)			
# of samples		1	5	10	15	
DI water	N/A	12.8 µL	77 µL	154 µL	230 µL	
1% Methyl Cellulose	0.35%	14 µL	84 µL	168 µL	252 µL	
Pharmalyte 3-10	1%	0.4 µL	2.4 µL	4.8 µL	7.2 µL	
Pharmalyte 5-8	3%	1.2 µL	7.2 µL	14.4 µL	22 µL	
200 mM Iminodiacetic Acid	14 mM	2.8 µL	16.8 µL	34 µL	50 µL	
pI Marker 4.05	1%	0.4 µL	2.4 µL	4.8 µL	7.2 µL	
pI Marker 7.05	1%	0.4 µL	2.4 µL	4.8 µL	7.2 µL	
Total volume		32 µL	192 µL	384 µL	576 µL	

表 9. ほとんどの電荷変異体のpIが5~8である分子用のMauriceFlex cIEF Master Mix溶液。

9. methodを設定します:

- a. Maurice cIEFメソッドをすでに開発してある場合、同じ separationパラメータを使用し、以下の表の蛍光露光時間(Fluorescence exposure time)を含むように変更します。
- b. Maurice cIEFメソッドをまだ開発していない場合、新しいmethodを作成し、以下の表に示すようにパラメータを設定します。

Methodパラメーター	設定
Focus Period 1	時間: 1分 電圧: 1500 V
Focus Period 2	時間: 8分 電圧: 3000 V
検出	Absorbance: 0.005 秒 Fluorescence: 20, 40, 80 秒
サンプルロード	55 秒

- 10. サンプルごとに1回のインジェクションを行うようにバッチを設定します。
- 11. バッチを保存します。
- 12. **Start**をクリックします。
- 13. バッチ終了後、"付録 C: Maurice cIEFカートリッジの post-run cleanup"に従って、カートリッジのpost-run cleanupを実行します。

ステップ 4: フラクションパラメーターを最適化する

目的の電荷変異体を含むフラクションが得られない場合、または十分な純度の目的のピークが得られない場合は、このセクションで説明するようにフラクションパラメーターを最適化します。

Mobilizationステップ

目的の電荷バリエーションのフラクションが得られない場合、フラクションステップ前に電荷バリエーションがキャピラリーの端近くまで移動し、キャピラリーから出ていないことを確認するために、Mobilizationパラメーターを変更する必要があります。Mobilization時間を最適化するには、まずAnalysisスクリーンでFractionsビューを選択し、Experimentペインで25 minute timepoint (T25)の画像を確認します。Run SummaryスクリーンのFocus Seriesペインでpeak mobilization別に表示することもできます。Injectionsペインで、Method列のFractionationを選択し、Focus Series内のスライダーバーを左右にドラッグします(詳細については、Maurice User Guideユーザーガイドを参照)。Mobilization時間のメソッド開発ワークフローについては、図 11 を参照してください。25分たってもサンプルのピークが見える場合は、バッチのMobilization時間を延ばさなければなりません。フラクション実行におけるフラクション回収合計時間だけMobilization時間を長くすることをお勧めします。例えば、MauriceFlex Fractionationバッチのデフォルト設定を用いる場合、Mobilization時間を25分から56分に延長します

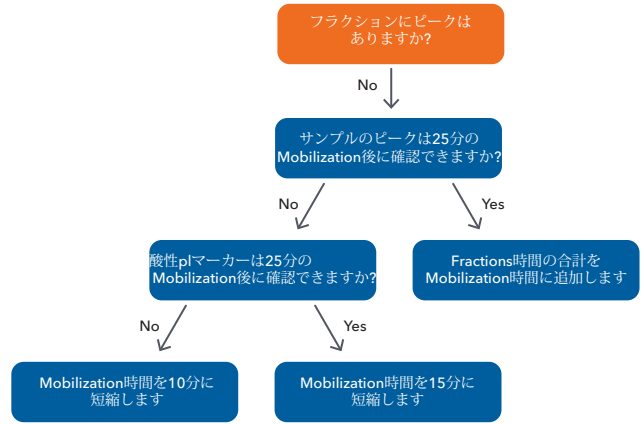


図11. Mobilization時間を最適化するためのワークフロー。

(25分+フラクションステップの31分)。再度フラクションを行い、"純度と同一性を確認するためにフラクションを選択"に従いフラクションの電荷変異を確認します。

フラクションステップが開始する前にサンプルがキャピラリーから出て行ってしまった場合は、Mobilization時間を短くしなければなりません。一般に、Mobilizationステップ(25分)の終わりに酸性 pI マーカーが表示されない場合は、Mobilization時間を10分に短縮して再度フラクションを行い、その後、フラクションで目的の電荷バリエーションを確認します。

尿素を含むサンプルを分析すると、通常、Mobilizationおよびフラクション中のサンプルのMobilizationは遅くなります(図 12)。これは、尿素を含むサンプルに電圧をかけた後に電流が低下するためです。フラクションを開始するときに、目的の電荷バリエーションがキャピラリーの端に近くように、Mobilization時間を35分に延ばすことをお勧めします。

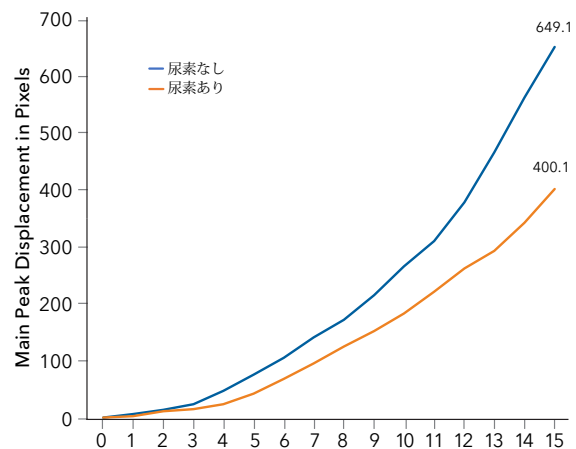


図12. 尿素がサンプル溶液に含まれると、サンプルの移動は遅くなります。MauriceFlex FractionationバッチにおけるMobilization でNIST mAbのメインピークの位置の変化(ピクセル)を各検出間隔で測定しました。尿素を含まないサンプルでは、15分のMobilizationでより長く移動(649.1ピクセル)しましたが、尿素を含むサンプルではわずか400.1しか移動しませんでした。絶対ピクセル位置の代わりに変位を使用し、各測定におけるメインピークの初期ピクセル位置を正規化しました。サンプルは、図8と同じ条件で準備、分離、分取しました。

場合によっては、Mobilizationの電圧を上げると良い場合もあります。一旦電流が安定になると電流が低い(<15 μ A) サンプルはこの間に分離度が下がり、その結果、フラクション中の各電荷変異体の純度は悪くなります。Run SummaryビューでIVプロットが選択されている場合、MobilizationとFractionsステップの電流が表示されます(詳細については、[Mauriceユーザーガイド](#)を参照してください)。電圧を上げると、フラクション中の分離度を維持するのに役立ち、電荷バリエーションの純度が向上します。電圧を上げる場合は、ジュール熱の発熱を最小限に抑えるために、安定した電流が表10の電圧ごとの値を下回っていることを確認してください。尿素を多く含むサンプルは、mobilizationとフラクション中に最大2000 Vを必要とします。初めてMobilization電圧を上げる場合は、電荷バリエーションがMobilizationし過ぎるのを防ぐために、mobilization時間を15分(通常25分)にすることをお勧めします。MobilizationとFractionsの電圧設定はリンクしており、Mobilization電圧を変更するとFractions電圧も変更されることに注意してください。

Mobilization電圧 (V)	電流(μ A)
1000	50
1500	33
2000	25

表10. Mobilizationおよびフラクションステップ中の電圧設定および最大推奨電流。

FractionsとRefocusステップ

所望の純度の電荷バリエーションが得られない場合、フラクションステップでパラメーターを変更しなければなりません。デフォルトのMauriceFlex Fractionationバッチは、36ウェルにわたって1ウェルあたり45秒でフラクションを回収します。ウェル内に複数の電荷バリエーションが入り、単一の電荷バリエーションの純度が80%未満の場合は、フラクション時間を短くして純度を向上させることができます(図13)。デフォルトのMauriceFlex Fractionationバッチ設定で開始した場合は、時間を25秒に短縮し、フラクションに使用するウェル数を60に増やすことをお勧めします。ウェル数を増やすと1ウェルごとの回収時間を短縮できます。回収するフラクション数を最小限にするために、Mobilization時間を増やすこともできます("Collecting Charge Variants in Earlier Fractions"を参照)。25秒で各電荷バリエーションがあまりにも多くのフラクションに分かれる場合、Fractions時間を35秒にすることをお勧めします。Fractionsで設定できる最短時間は20秒であることに注意してください。

Fractions時間を短くしてもフラクション内の電荷変異体の純度が向上しないときもあります。そのような場合、fractionationバッチにRefocusステップを追加することをお勧めします。これにより、Mobilizationとフラクションステップの間でrefocusingするようになります。Refocusステップで電荷変異体の純度を向上させる例を図14に示します。パラメータは、以前のフラクションの結果と分離電圧に基づいて決定します。

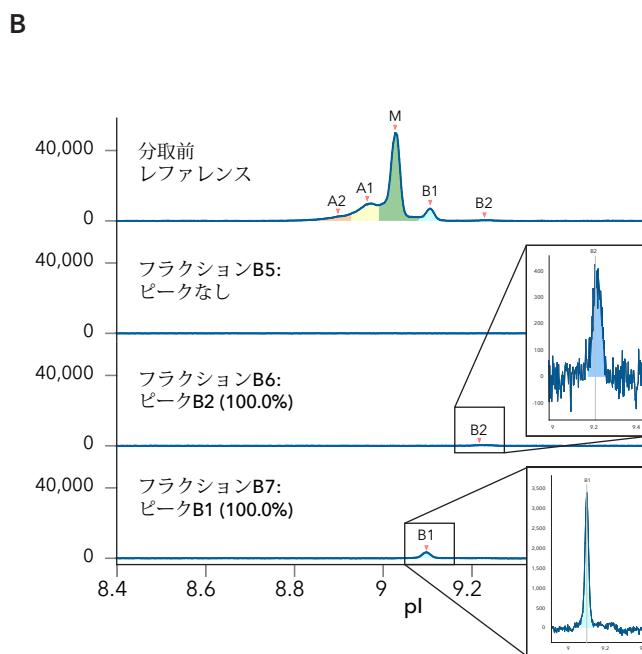
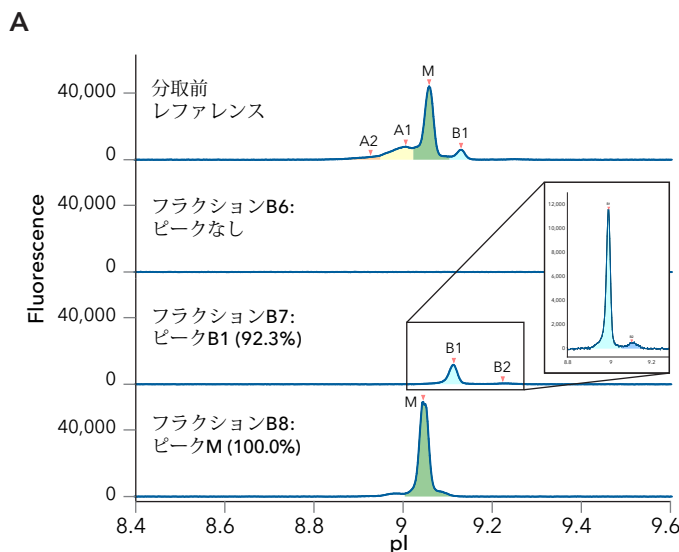
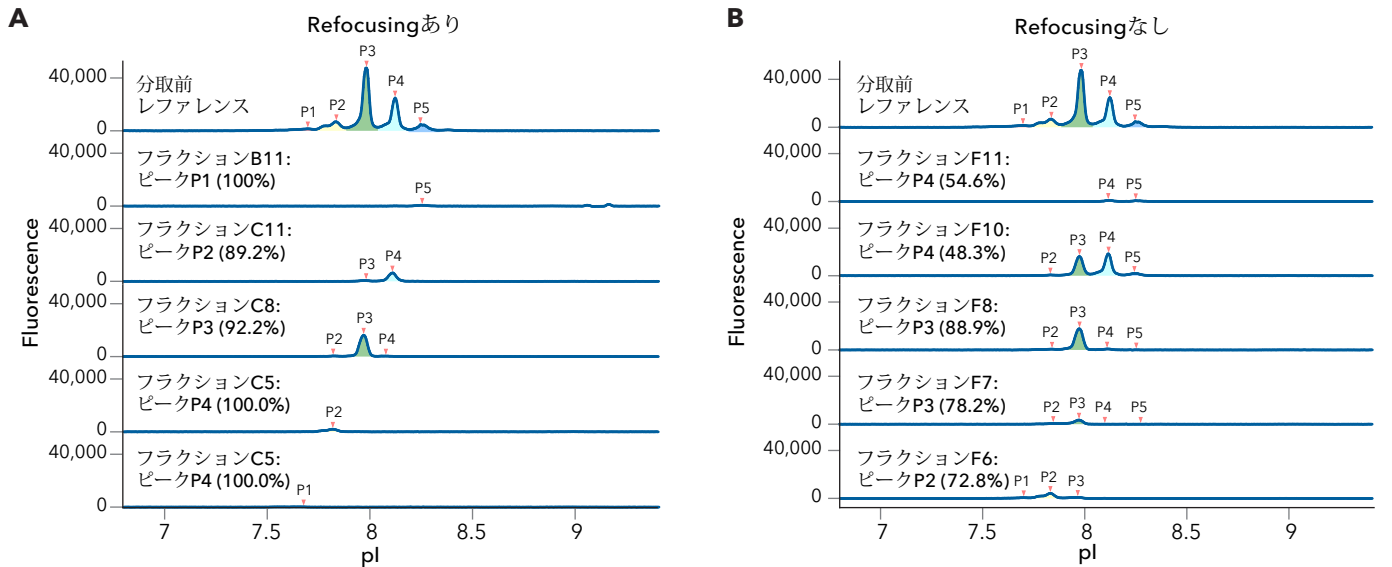


図13. フラクション回収時間を45秒(A)から25秒(B)に短縮すると、電荷変異体の純度は向上します。各フラクションを25秒間回収すると高い純度で回収され、NIST mAbのB2およびB1ピークは、40秒間蛍光露光して各FractionをMaurice cIEF分析し検証しました。代表的なフラクションのチャージバリエーションの純度を示しています。1 mg/mLのNIST mAbでフラクションを行い、0.35% methyl cellulose、1% Pharmalyte 3-10、3% Pharmalyte 8-10.5、およびcathodic blockerとして25 mM Arginineを加えました。MauriceFlex Fractionation分離は、10分間500Vの電圧をかけ、次に1000Vで10分間、その後25分間1500Vの電圧をかけて行い、25分間1000Vの電圧をかけてMobilizationを行いました。Mobilization後、45秒(Aのフラクションで使用)または25秒間(Bのフラクションで使用)1000Vの電圧をかけて各フラクションを回収しました。レファレンスサンプル(0.2 mg/mL)とフラクションサンプルに1500Vの電圧を1分間、続いて3000Vの電圧を8分間かけてMaurice cIEF分離しました。サンプルに、0.35% methyl cellulose、1% Pharmalyte 3-10、3% Pharmalyte 8-10.5、およびcathodic blockerとして5 mM Arginineを加えました。



C Refocusingあり

フラクシオンウェル	P1	P2	P3	P4	P5
B10					100
B11					100
B12					100
C12			9.38	90.62	
C11			10.83	89.17	
C10			28.49	71.51	
C9		4.48	88.41	7.11	
C8		4.32	92.23	3.46	
C7			100		
C6		74.03	25.97		
C5		100			
C4	35.75	64.25			
C2	100				

D Refocusingなし

フラクシオンウェル	P1	P2	P3	P4	P5
F11				54.65	45.35
F10		2.16	42.54	48.26	7.04
F9		3.44	63.03	17.49	1.43
F8		6.2	88.88	4.92	
F7		21.85	78.15		
F6	11.68	72.78	15.54		
F5	30.22	62.16	7.62		

図14. cIEF fractionation中にRefocusすると、フラクシオンのピーク純度が向上します。20秒間の蛍光露光でmAbのフラクシオンをMaurice cIEF分析したところ、Refocus(A, C)するとRefocusしない場合(B, D)に比べて、電荷変異体のピークの純度は向上しました。代表的なフラクシオン(A & B)で最も強いシグナルの電荷変異体のピークの純度が示されています。各チャージバリエーションの純度が80%を超えるフラクシオンに関して、各フラクシオナーゼーション(C & D)の表でハイライト表示されています。1 mg/mLのmAbを用いてMauriceFlex fractionationパッチを行い、0.28% methyl cellulose、0.62% Pharmalyte 3-10、1.55% Pharmalyte 5-8、1.55% Pharmalyte 8-10.5、3.8 M 尿素、およびcathodic blockerとして14.6 mM Arginineを加えました。10分間500Vの電圧をかけて分離し、次に1000Vで10分間、その後1500Vで25分間電圧をかけてから、30分間1500Vの電圧をかけてMobilizationを行いました。25秒間1000Vの電圧をかけて各フラクシオンを回収しました。Refocusしたパッチ(A & C)では、5分間2000Vの電圧でRefocusしました。レファレンスサンプル(0.2 mg/mL)とフラクシオンサンプルに1分間1500Vの電圧をかけ、続いて8分間3000Vの電圧をかけて、Maurice cIEF分離しました。サンプルには、cathodic blockerとして0.30% methyl cellulose、3.7% Pharmalyte 3-10、0.9 M 尿素、および9.3 mM Arginineを加えました。

Refocus時間は次のように計算します:

1. サンプルを含むフラクシオンの最初のウェルを特定します。Maurice cIEFパッチでフラクシオナーゼーションを行って確認できます。
2. フラクシオン時間にフラクシオン番号を掛けて、フラクシオナーゼーションステップでそのウェルに回収するまでの時間を計算します(例: 45 秒 × 10 番目のフラクシオン = 450 秒)。
3. ステップ2の時間を分に変換し、5分差し引きします。
4. ステップ3で計算した時間に25分加えます。
5. 新しいMauriceFlex FractionationパッチのMobilizationステップの時間に、ステップ4で計算した時間を入力します。ただし、最も近い時間(分)に切り上げます。
6. Refocus ProfileウィンドウのSeparationステップで、最後のフォーカシング時間で入力したのと同じ電圧を入力します(図 15)。Refocus時間を5分に設定します。**注:** バッチでrefocusingしている場合、Peak predictionはCompass for iCE に表示されません。

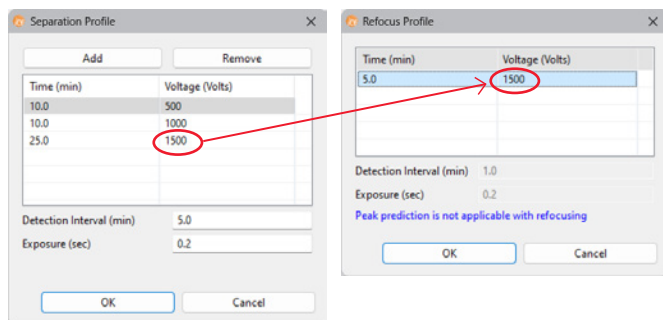


図 15. Separation Profileの最後のFocus Periodに基づいてRefocus Profileの値を入力します。

より始めの方のフラクションで電荷バリエントを回収

最適なfocusing、mobilization、およびフラクション回収時間を決定したら、Mobilization時間を伸ばしてより始めの方のフラクションで目的の電荷バリエントを回収することができます。この変更は、バッチ間で同様のウェルにフラクションが再現性よく回収されることを保証するために、複数のfractionationバッチを完了した後にのみ行うことをお勧めします。新しいMobilization時間は次のように計算します:

1. サンプルを含むフラクションの最初のウェルを特定します。
2. フラクション時間にフラクション番号を掛けて、フラクションステップでそのウェルに回収するま

$$\frac{\text{各フラクションの合計ピーク面積 (Step 2)}}{\text{すべてのフラクションの合計ピーク面積 (Step 3)}} \times \text{Fractionation サンプル濃度} \times 0.2$$

1 mg/mL NIST mAbのフラクションネーションの結果を用いてフラクション濃度を計算する例を以下に示します。

フラクションウェル											
NIST電荷変異体	E8	E9	E10	E11	E12	F12	F11	F10	F9	F8	すべてのフラクションの合計ピーク面積
A2							59208.5	16436.9	23389.6	6325	1981284.8
A1				66947.1	288778.5	105846					
M		76912.8	807819.9	382725.3							
B1	66156.8	73404.5									
B2	7333.9										
各フラクションの合計ピーク面積	73490.7	150317.3	807819.9	449672.4	288778.5	105846	59208.5	16436.9	23389.6	6325	
濃度 (ug/mL)	7.4	15.2	81.5	45.4	29.2	10.7	6.0	1.7	2.4	0.6	

ウェルE8の濃度は以下のように計算されます

$$\frac{73490.7}{1981284.8} \times 1000 \mu\text{g/mL} \times 0.2 = 7.4 \mu\text{g/mL}$$

この濃度計算方法は理論上の濃度とと考えてください。非常に低い濃度でタンパク質が不安定だったり、プレートのウェルに結合することによりサンプルを損失したり、実際の濃度がより低くなる場合があります。フラクションの完全性を維持するために、分子の安定性に応じて、4 °C または -20 °C で low protein-binding tube にフラクションを保存、または fractionation plate をシールすることをお勧めします。

での時間を計算します(例: 45 秒 × 10番目のフラクション = 450秒)。

3. ステップ2の時間を分に変換し、5分差し引きます。
4. 新しいMauriceFlex FractionationバッチのMobilizationステップの時間に、ステップ3で計算した時間を入力します。ただし、最も近い時間(分)に切り上げます。

フラクション濃度

以下の方法で、フラクション中の電荷バリエントのおおよその濃度を計算します。ここでは、フラクションのサンプル希釈係数を0.2と仮定しています。これは、キャピラリーの総容量(~6 μL)をフラクションウェル内のMobilizer Solutionの容量(30 μL)で割ることで得られています。

1. "cIEF Fractionationの結果の確認"に従って、フラクションネーション前のレファレンスサンプルとフラクションを用いて Maurice cIEF バッチを実行します。
2. ステップ1で生成したデータを用いて、各フラクションのすべての電荷バリエントのピーク面積の合計を計算します(たとえば、以下のフラクション E8 の青いボックス)。
3. ステップ1のデータから、電荷変異体を含むすべてのフラクションのピーク面積を合計します(下のオレンジ色のボックス)。
4. 次の式を用いて、フラクションのおおよその濃度を計算します:

付録 A: Maurice cIEF試薬の準備

表 11に示すようにバッチ試薬を準備し、図 16のように試薬バイアルを MauriceFlex 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11. バッチ試薬の準備

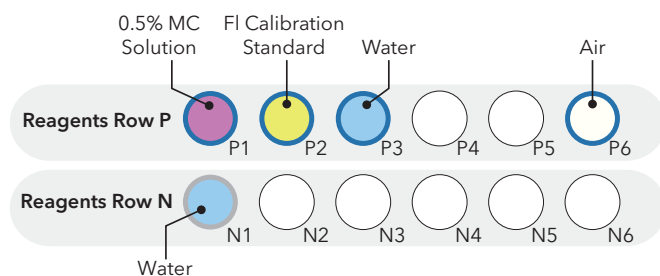


図 16. 試薬バイアルの配置

注: MauriceFlexの試薬バイアルは、バッチを開始する前に、スライドロックを左から右にスライドさせて所定の位置にロックする必要があります。

付録 B: Maurice 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のゴム栓を取り外します。
4. 陰極液 (Catholyte solution) 2 mL を OH-電解液タンク (白いポート) に加えます。
5. 陽極液 (Anolyte solution) 2 mL を H+電解液タンク (赤いポート) に加えます。
注: 電解液タンクに溶液を入れすぎないようにしてください。
6. 各タンクをゴム栓キャップで密閉します。OH-タンクには灰色のゴム栓を、H+タンクには赤色のゴム栓を使用します。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: Maurice cIEFカートリッジの post-run cleanup

1. MauriceFlexのドアを開きます。
2. サンプルを取り出します。まだインジェクションした回数が最大インジェクション数に達していない場合、cleanupで必要になるため、Water (P3) およびAir (P6) のバイアルはそのままし、その他の試薬バイアルは廃棄します。
3. カートリッジを取り外します。
4. 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。
5. 電解液タンクの両方のゴム栓を外します。
6. ピペットまたは低真空を利用して、各タンクから溶液を吸引します。
7. 各タンクに2 mLの精製水を入れ、吸引します。このすばを回繰り返します。
注: キャピラリーに液体が付かないようにしてください。
8. 残りの液体をすべて吸引し、タンクが乾燥していることを確認してください。
9. 両方のゴム栓をタンクに戻します。しっかり閉めてください。
10. 試薬バイアルが図 17のように配置されていることを確認します。バイアルP3に少なくとも 1.5 mL の水が入っていることを確認します。

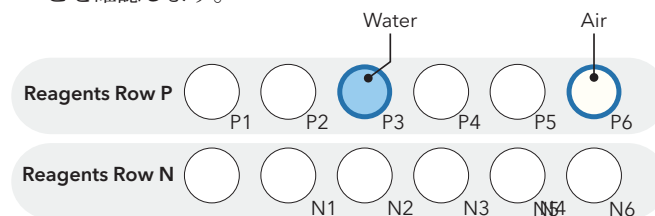


図 17. cIEF Cartridge Post-run cleanup用試薬バイアルの配置

11. MauriceFlexにカートリッジを挿入します。
12. Compassのメインメニューで、Instrumentを選択し、Cartridge Post-Run Cleanupをクリックします。所要時間はわずか5分です。
13. クリーンアップが終わったら、カートリッジと試薬バイアルを取り外します。
14. ゴム栓を外したまま自然乾燥させます。
15. カートリッジとゴム栓を保護パッケージに入れ、室温で保管します。

付録 D: サンプルの脱塩と濃縮

- 500 μL のサンプルを Amicon Ultracel 50K Membrane Centrifugal Filter (Millipore PN UFC9050)に加えます。
- 12,000 xgで5分間、遠心します。
- ろ過した容量を20 mM Tris buffer pH 7.0 (Life Technologies PN AM9851)で置換します。
- 遠心バッファー交換を更に2回行います。
- 簡単な脱塩では、バッファー交換後容量を500 μL にします。サンプルを濃縮する必要がある場合、バッファー交換した残りのサンプルをすぐに使用しない場合は、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下で保存してください。

付録 E: 変性サンプルの準備

アッセイが難しい場合、cIEF 分析中に沈殿/凝集を防ぐために2 Mよりも高い濃度の尿素を必要とします。このような場合は、cIEF Master Mix solution溶液に4 Mの尿素を加えてサンプルを変性しなければなりません。サンプル中の尿素の最終濃度を4 Mにするには、例の準備に従います。

サンプルの総量は200 μL にします。48 mgの尿素粉末と次の量の試薬を加え、160 μL のマスターミックスを作成します。

- 70 μL の1% Methyl Cellulose
- 8 μL の両性電解質 (合計)
- 1.5 μL の各pIマーカー
- 8 μL の500 mM Arginine
- 総量が160 μL になるまで精製水を加えます。

付録 F: MauriceFlex cIEF試薬の準備

表 12に示すようにバッチ試薬を準備し、図 18のように試薬バイアルをMauriceFlexにセットします。

試薬	容量	バイアルタイプ	ポジション
0.5% Methyl Cellulose	2 mL	Crimp top vial	R1
Fluorescence Calibration Standard	350 μL	Glass vial with insert, 0.3 mL	R2
Water	2 mL	Crimp top vial	R3
Water	2 mL	Crimp top vial	R4
Water	2 mL	Crimp top vial	R5
Empty (air)	N/A	Crimp top vial	R6
Catholyte	2 mL	Crimp top vial	K2
Water	2 mL	Crimp top vial	K5

表 12. MauriceFlex cIEF用バッチ試薬の準備

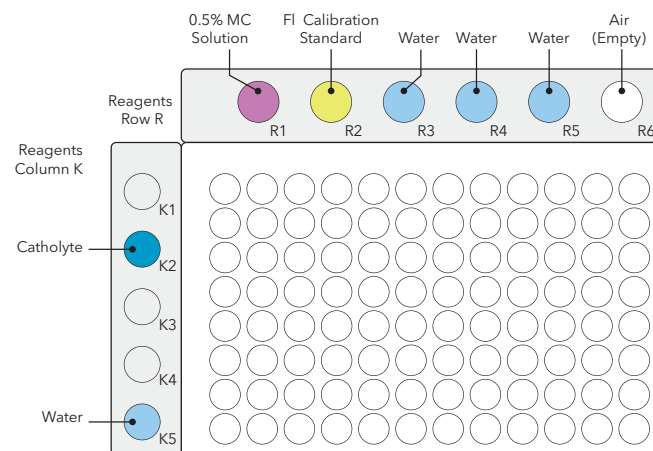


図 18. MauriceFlex cIEF用バッチ試薬バイアルの配置

付録 G: cIEF Fractionation カートリッジの準備

1. cIEF Fractionation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。

注: カートリッジの先端を触れないように注意してください。先端が損傷すると、カートリッジが損傷し、インジェクションに失敗する可能性があります。**注:** カートリッジを持っている間はキャピラリーに触れないようにしてください

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. 電解液タンクの赤いゴム栓を取り外します。

4. 2 mLの陽極液 (Anolyte solution) 電解液タンクに加えます

注: 電解液タンクに溶液を入れすぎないようにしてください

5. 各タンクをゴム栓キャップで密閉します。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きとってください。

付録 H: MauriceFlex Fractionation 試薬の準備

表13に従ってバッチ試薬を準備し、図19に示すように試薬バイアル設置します。

試薬	容量	バイアルの種類	位置
0.5% Methyl Cellulose	2 mL	Crimp top vial	R1
Fluorescence Calibration Standard	350 µL	Glass vial with insert, 0.3mL	R2
Water	2 mL	Crimp top vial	R3
Water	2 mL	Crimp top vial	R4
Water	2 mL	Crimp top vial	R5
Empty (air)	N/A	Crimp top vial	R6
Catholyte	2 mL	Crimp top vial	K2
Mobilizer Solution (5 mM ammonium acetate)	2 mL	Crimp top vial	K3
Mobilizer Solution (5 mM ammonium acetate)	2 mL	Crimp top vial	K4
Water	2 mL	Crimp top vial	K5

表 13. MauriceFlex Fractionation用バッチ試薬の準備

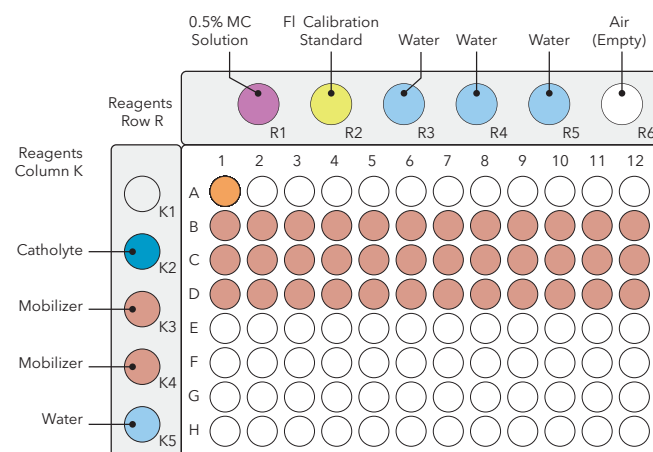


図 19. MauriceFlex Fractionation用バッチ試薬バイアルの配置

付録 I: cIEF Fractionation Cartridgeのpost-run cleanup

1. MauriceFlexのドアを開けます。
2. サンプルを取り出します。インジェクションした回数が最大インジェクション数に達していない場合、クリーンアップ手順で必要になるため、Water (R3)とAir (R6)バイアルを所定の位置に置いたままにします。
3. カートリッジを取り外します。
4. 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。
5. 電解液タンクのゴム栓を外します。
6. ピペットまたは低真空で、各タンクの溶液を吸引します。
7. 各タンクに3 mLの精製水を入れ、吸引します。このすそぎを3回繰り返します。
注: キャピラリーに液体が付着しないようにしてください。
8. 残りの液体をすべて吸引し、タンクが空になったことを確認します。

9. 電解液タンクにゴム栓をします。しっかり閉めてください。
10. 図 20 に示されているように試薬バイアルが配置されていることを確認します。バイアル R3 に少なくとも 2 mL の水が入っていることを確認します。

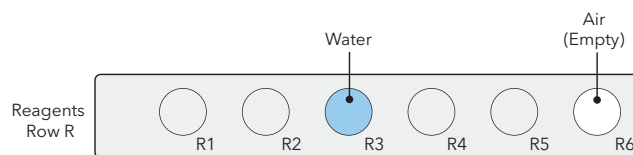


FIGURE 20. cIEF Fractionation Cartridge Post-run cleanup vial placement.

11. MauriceFlexにカートリッジを挿入します。
12. Compassのメインメニューで、**Instrument** を選択し、**Cartridge Post-Run Cleanup** をクリックします。所要時間はわずか5分です。
13. cleanupが完了したら、カートリッジと試薬バイアルを取り出します。
14. タンクを自然乾燥させるため、ゴム栓を外したままにしておきます。
15. カートリッジとゴム栓を保護パッケージに入れ、室温で保存します。