



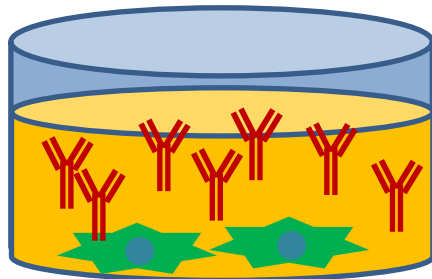
Anti-body Purification STARlet Using MonoSpin 96Plate (GL Sciences made)

Hamilton社 分注装置STARシリーズによる
抗体精製アプリケーションのご紹介

抗体精製の需要

近年、バイオ医薬品の需要が高まっており製薬会社や国の研究機関において盛んに研究がなされています。特にがん細胞に特異的に作用する分子標的薬として抗体をベースとした医薬品が普及しており、今後も研究が盛んになる分野です。

抗体精製の用途



- アッセイ用（ELISA等）として用いるため
- 構造解析を行うため
- 機能解析を行うため
- 血中の濃度測定のため（バイオアナリシス）**

抗体医薬品の生体試料中薬物濃度測定（バイオアナリシス）において抗体精製ならびにその自動化に関して需要が見込まれています。




1: 抗体精製ツール（GLサイエンス製）

2: 抗体精製の自動化ワークフロー

3: 抗体精製向け装置の構成

4: スループット

5: データ





抗体精製ツール（GLサイエンス製）

**Ultra fast antibody purification kit
using monolithic silica**

MonoSpin ProA、ProG、ProL



Monolithic Technology "Based on monolithic technology, Merck KGaA, Darmstadt, Germany"

MonoSpin ProA/ProG/ProL

シリカモノリスの表面に抗体精製用のアフィニティリガンドが修飾されており抗体試料の高速精製を可能にします。硬質のゲルを使用しているため、通液速度が上げられ、短時間での精製が可能です。



Spin column



96 Well Plate

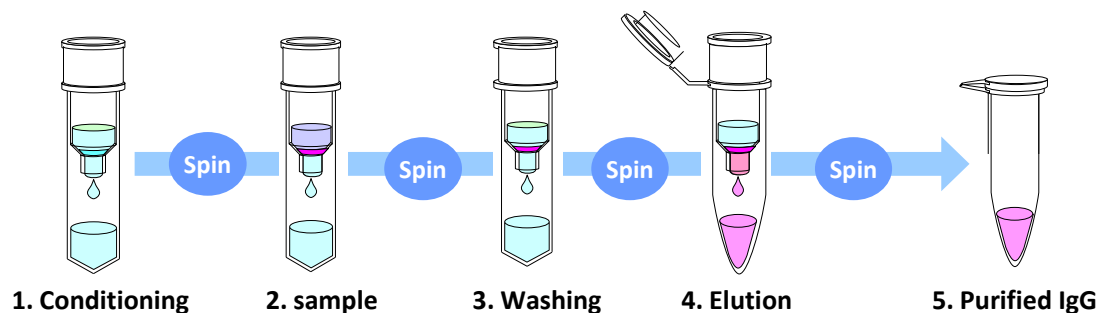
* 3 type of ligand (ProteinA, ProteinG, ProteinL)

* Total operation time **10 min**

- Spin column, 96 Well Plate format

(*ProteinLはスピncラムのみ)

抗体精製の処理は10分程度で完了

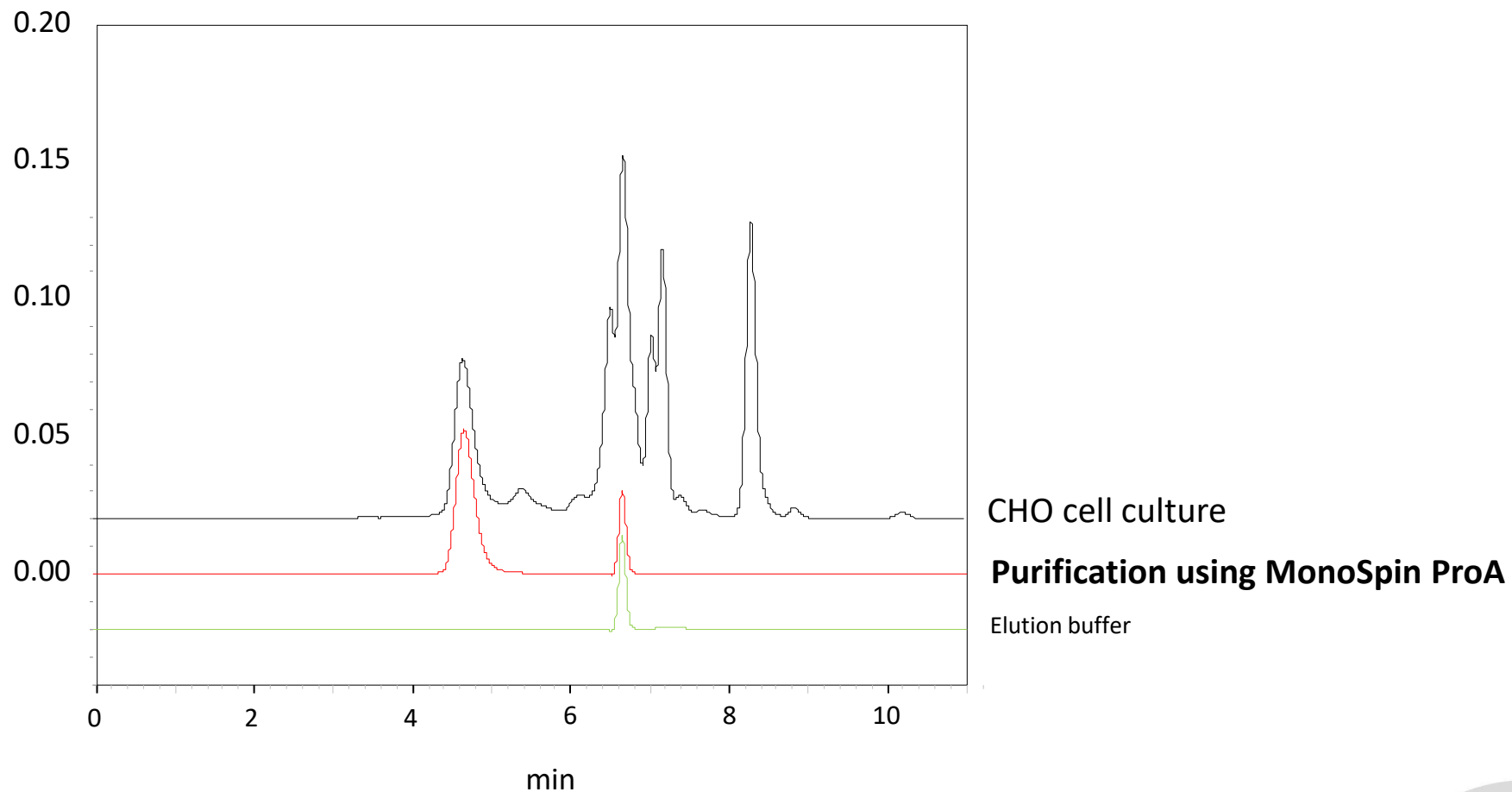


MonoSpin[®] ProA/ProG/ProL仕様

項目	仕様
結合基	ProteinA もしくは ProteinGもしくは、ProteinL
スルーポア径	2 μ m
メソポア径	60 nm
ディスクサイズ	ϕ 4.6 \times 1.5 mm
試料溶液量	50~500 μ L
回収量	MonoSpin ProA : IgG 400 ug
	MonoSpin ProG : IgG 300 ug
	MonoSpin ProL : IgG 200 ug
最少溶出液量	50 μ L
使用時遠心力	2,300 \times <i>g</i>



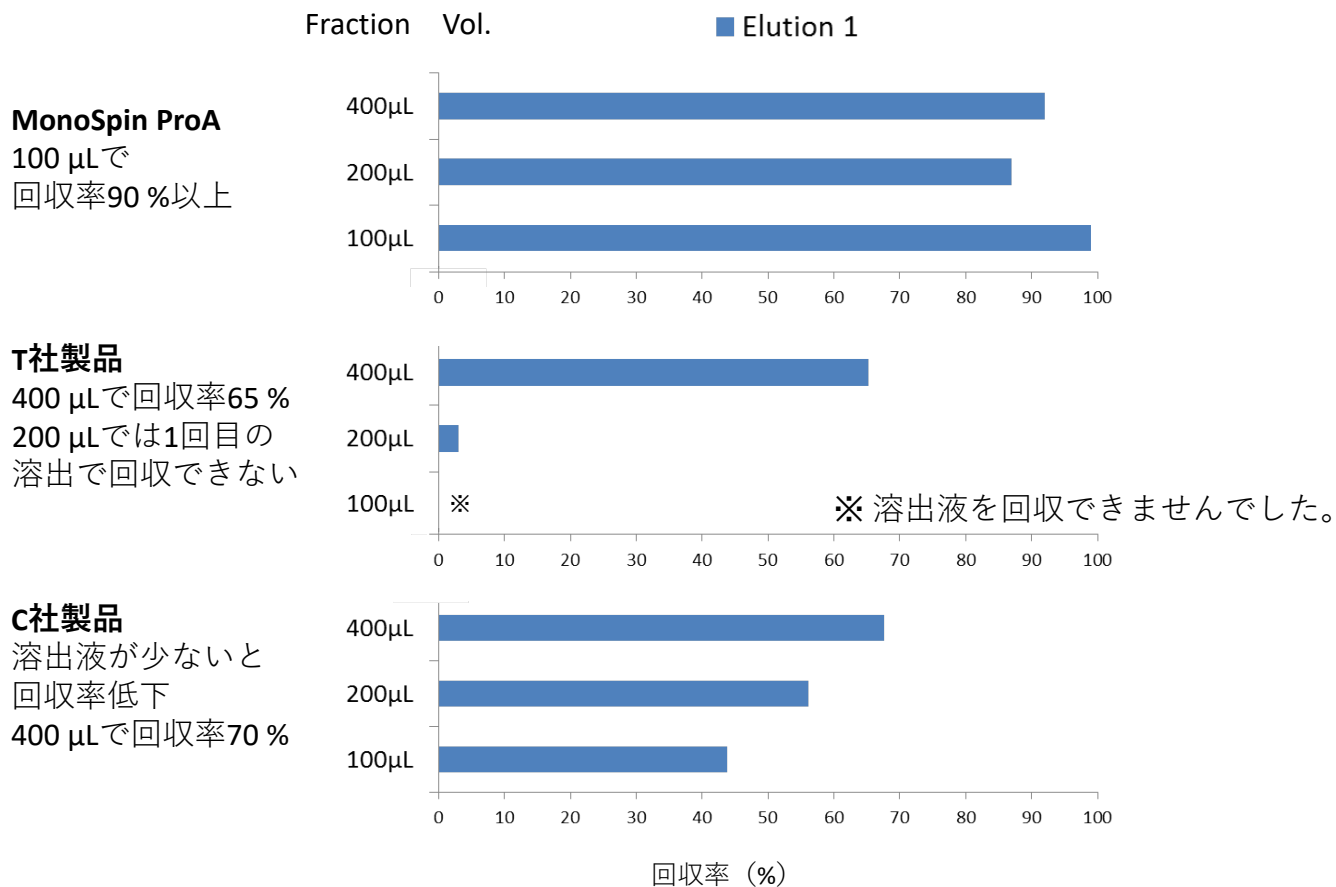
MonoSpin ProAを用いた抗体精製



微量サンプルに対してもロスが少なく迅速に回収可能です。

高い抗体回収率

MonoSpin ProAでは100 μL の微量溶出液量で90 %以上の回収率を示します。
T社・G社製品では回収液量を400 μL 程度必要で抗体濃度が希薄になり回収率も70 %程度となっています。

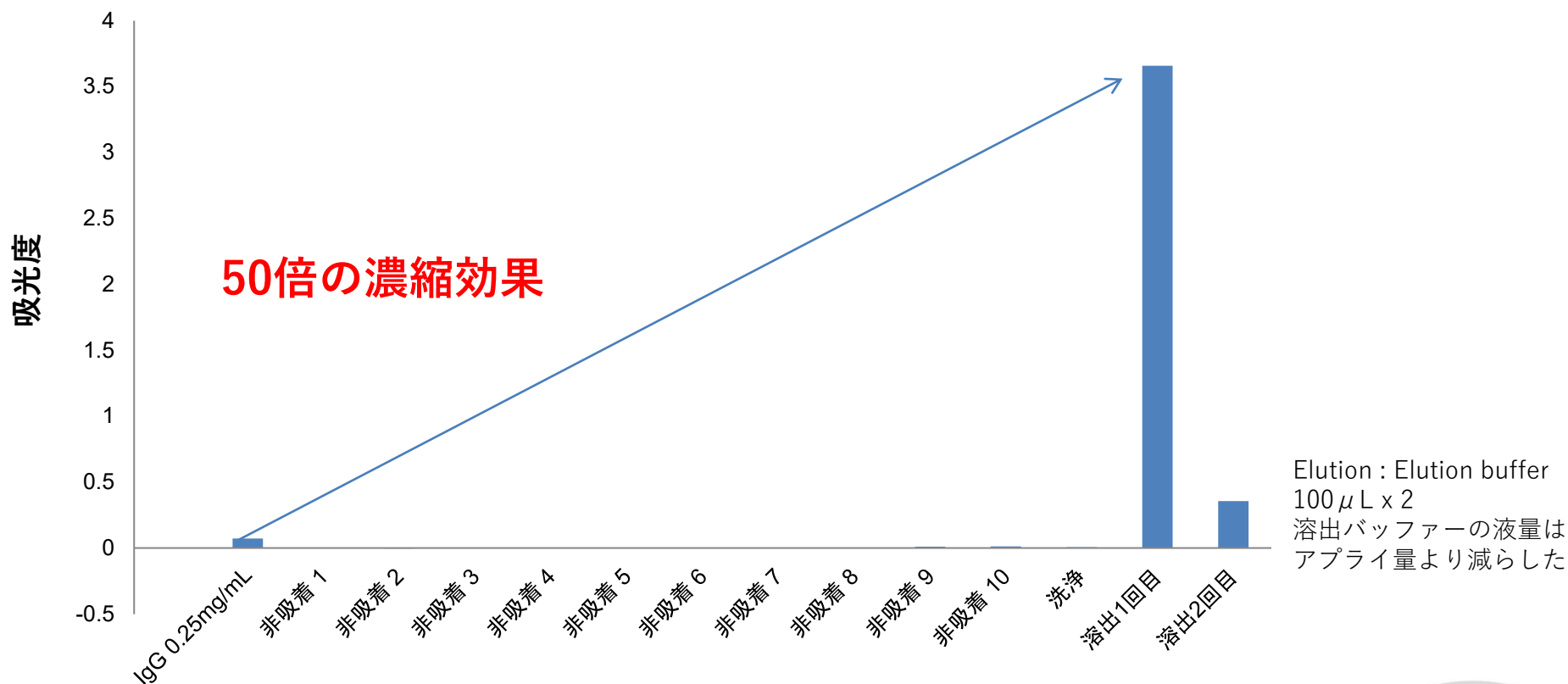


溶出液の量に依存せず安定して抗体を回収可能です。

MonoSpin ProAによる抗体溶液の濃縮

Sample : 0.025 mg/mL IgG solution 500 μ L x 10

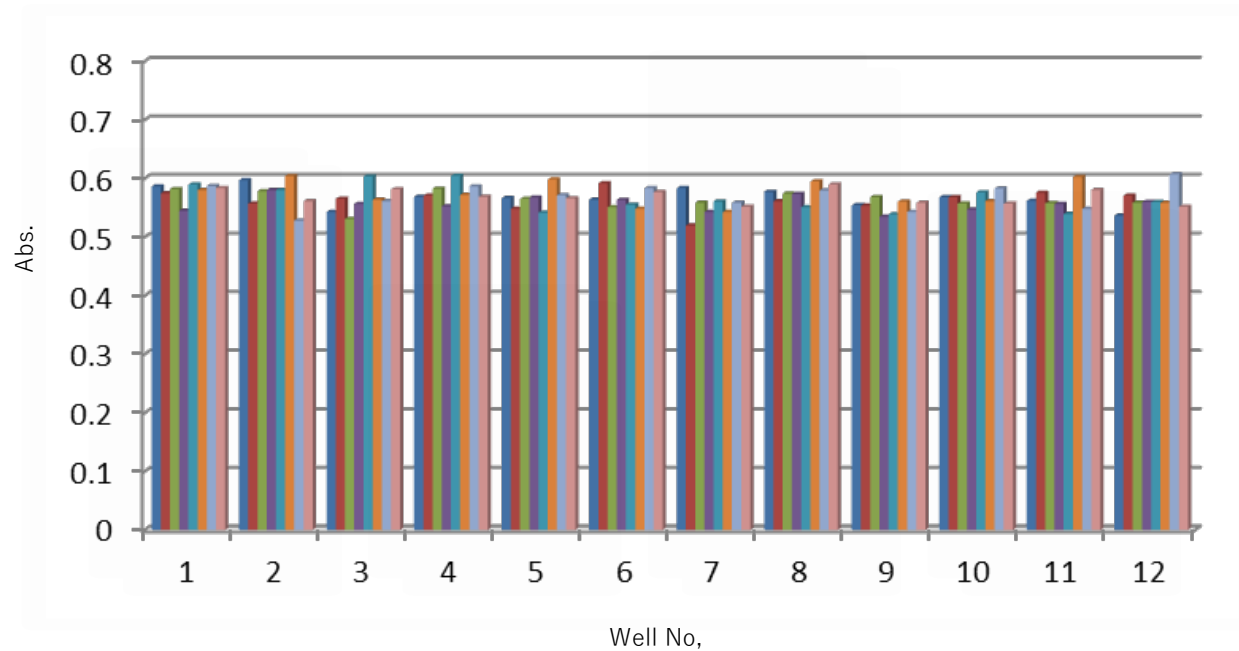
Elution : 100 μ L elution buffer



非吸着画分、洗浄液画分には抗体がほとんど見られず、
抗体を確実に回収するので濃縮目的にも適用可能です。

高い再現性

MonoSpin ProA の96プレートタイプを使用し同一サンプルを同時に処理



Sample volume : 150 μ L
Elution volume : 150 μ L

Recovery : 90 % (CV 3.1 %)
IgG conc. : 1.3 mg/mL

各ウェルのばらつきは少なく、MonoSpin ProAは高い再現性を示しました。

MonoSpin L ProA

1本で16mg抗体が回収可能です。

操作方法

1. 平衡化バッファを 5mLカラムにアプライする



2. サンプルを最大8mL添加する
* 0.2 μ m フィルターで処理後のサンプルを用いてください



3. 洗浄バッファを5mLカラムにアプライする。



4. 溶出バッファを5mLカラムにアプライする。

各工程における遠心処理 : 1500 xg, 2分

* 各種バッファは準備もしくはMonoSpin ProA/G buffer kitを使用

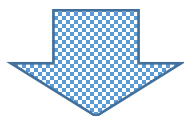


通常のMonoSpin Lとは
異なり遠心アダプタを使用します。

多量培養液からの迅速抗体精製

中圧クロマト装置 + アガロース担体による精製

50mL 処理： サンプルフィード所要時間 50分 (1mL/min)



吸引マニホールド + MonoSpinによる精製

50mL 処理： サンプルフィード所要時間 10分

* 並列処理も可能



吸引マニホールド



MonoSpin L ProA 4本

**培養液 50mL x 4本の処理が
10分で可能です。**

MonoSpin L ProAを用いた培養液50mLからの抗体の精製

平衡化

Binding buffer 3mL

サンプルフィード

サンプル溶液 50mL : 10分以内に終了

洗浄

Wash buffer 5mL 吸引、
1,500xg、1mLで遠心処理

溶出

Elution buffer 4mL、遠心 1,500xg 2min

高額なクロマト装置よりも迅速処理が可能



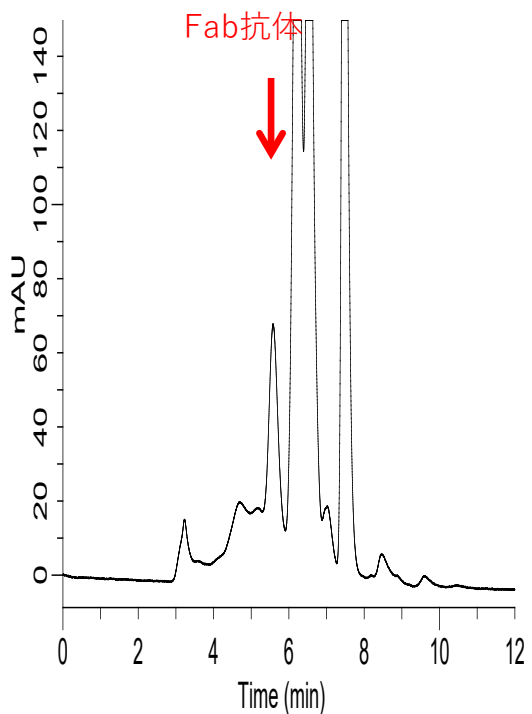
吸引マニホールドによる
並列処理



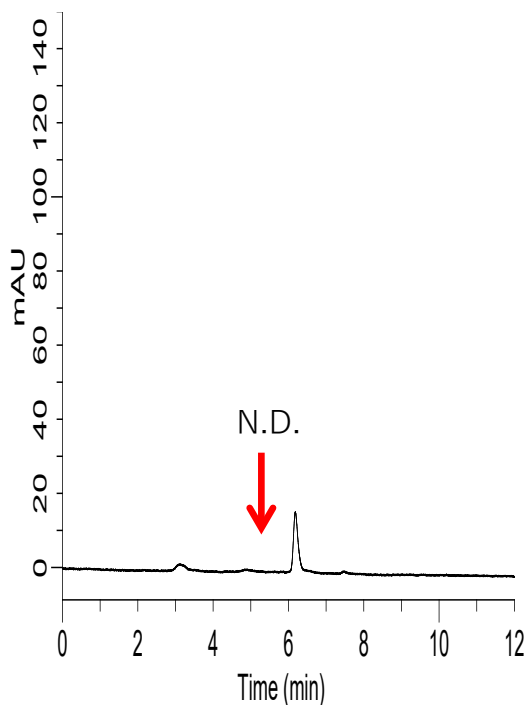
MonoSpin L ProA 4本

新製品 MonoSpin ProL : 低分子抗体精製用

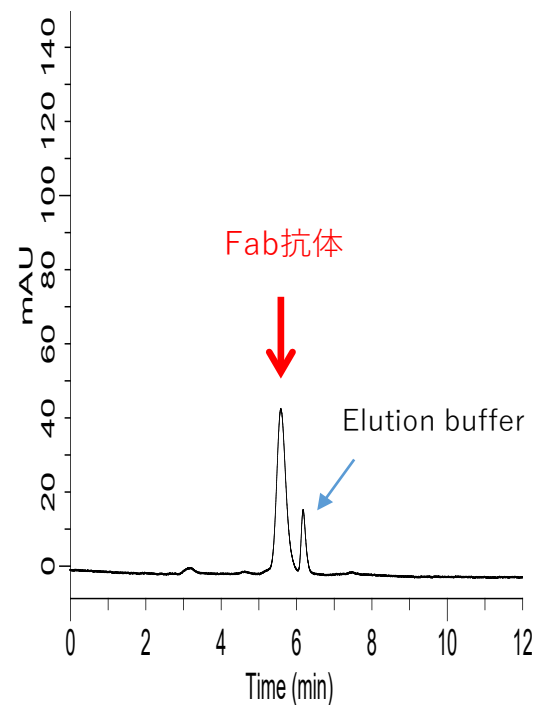
培養液遠心上清



MonoSpin ProA : 回収不可

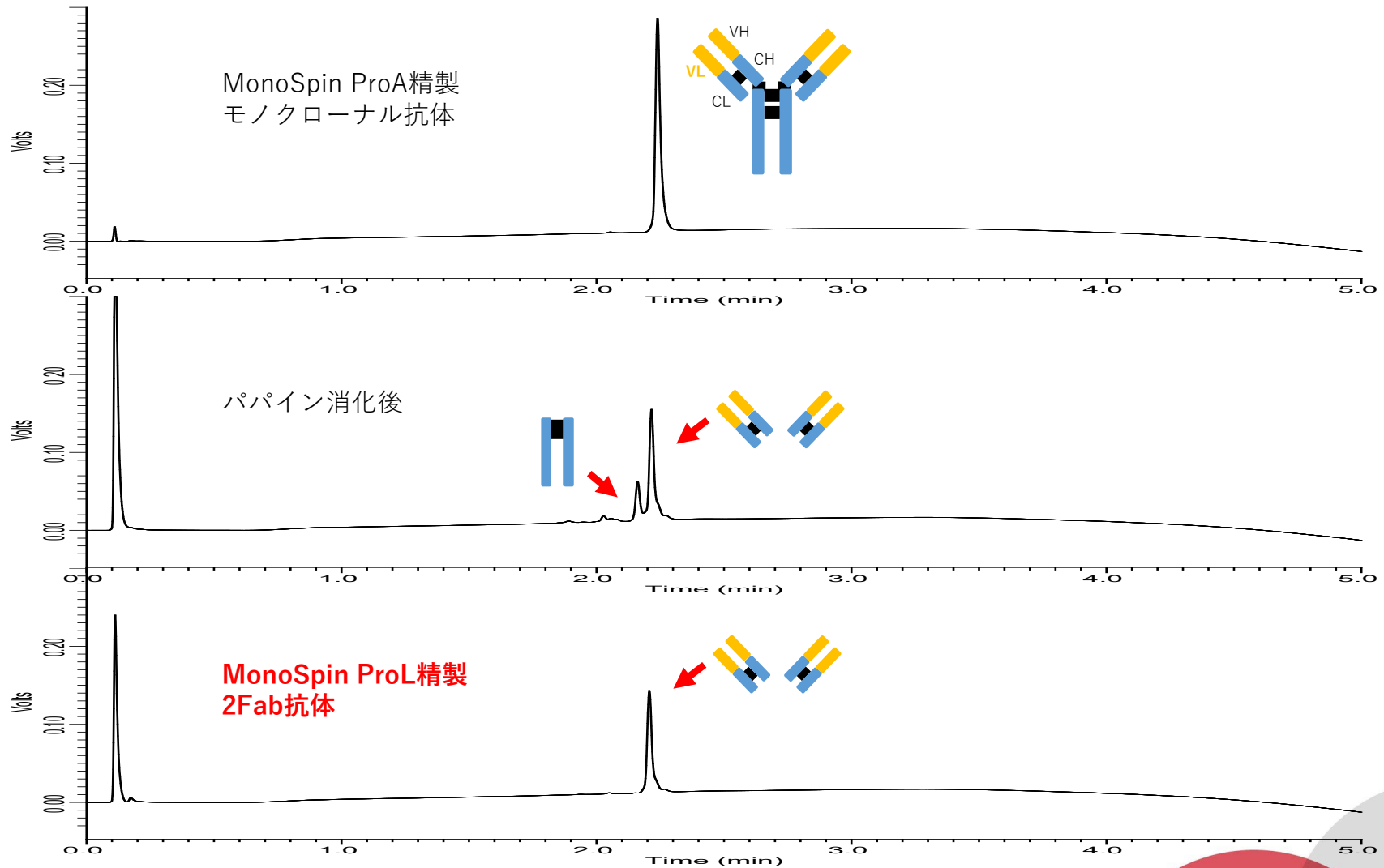


MonoSpin ProL : 回収可能



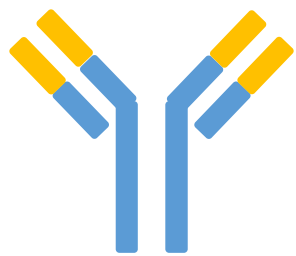
MonoSpin ProLはMonoSpin ProAでは回収ができない**Fab抗体**の回収が可能です。

MonoSpin ProLによるパパイソ消化サンプルの前処理

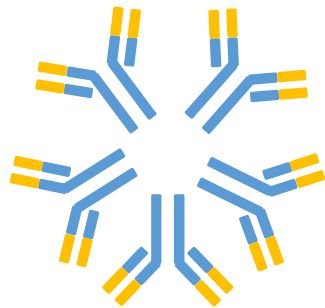


MonoSpin ProLによりFabのみを回収することが可能です。

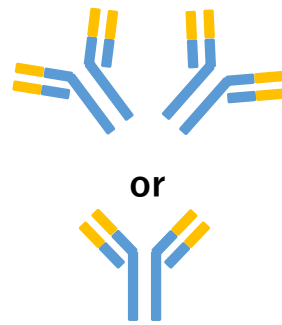
ProteinLが吸着可能な抗体種



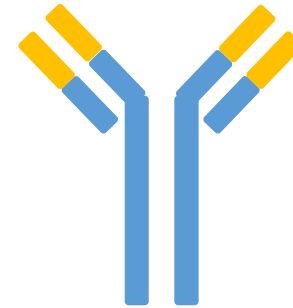
IgG



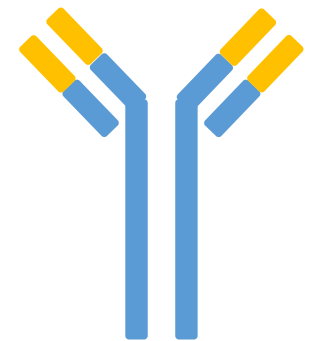
IgM



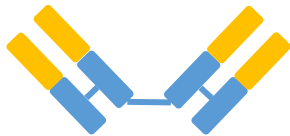
IgA



IgD



IgE



F(ab')₂



Fab



scFV

ProteinL担体は、FabやscFVなどの低分子抗体以外に、IgAやIgMに対しても吸着することが可能です。

抗体精製ツールまとめ

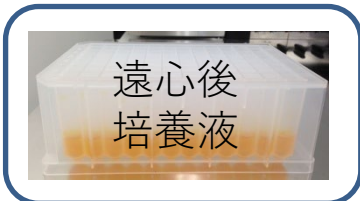
- **迅速処理** : 10分程度で処理を終えることが可能
- **簡便処理** : 処理作業は簡単、カラムに液を入れ通液させるだけ
- **サンプル処理** : 少ない溶出量でも安定的な回収
微量サンプルも確実に保持し、濃縮も可能
- **再現性** : 高い再現性



抗体精製の自動化ワークフロー

自動化ワークフロー

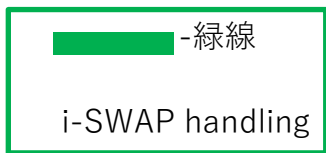
サンプル準備 (手動)



抗体精製 (STARletによる自動処理)



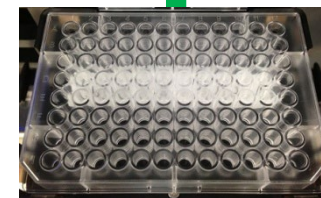
抗体精製に必要な作業をSTAR letで全て行うことが可能です。



[i-SWAP]



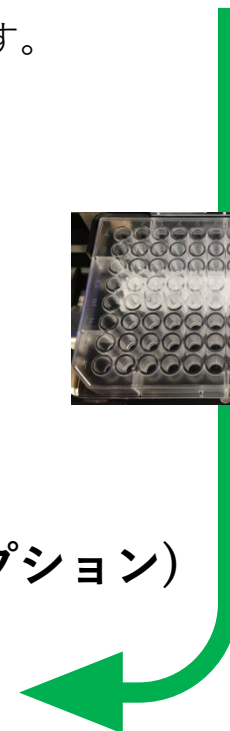
[MonoSpin™ ProA 96Plate]

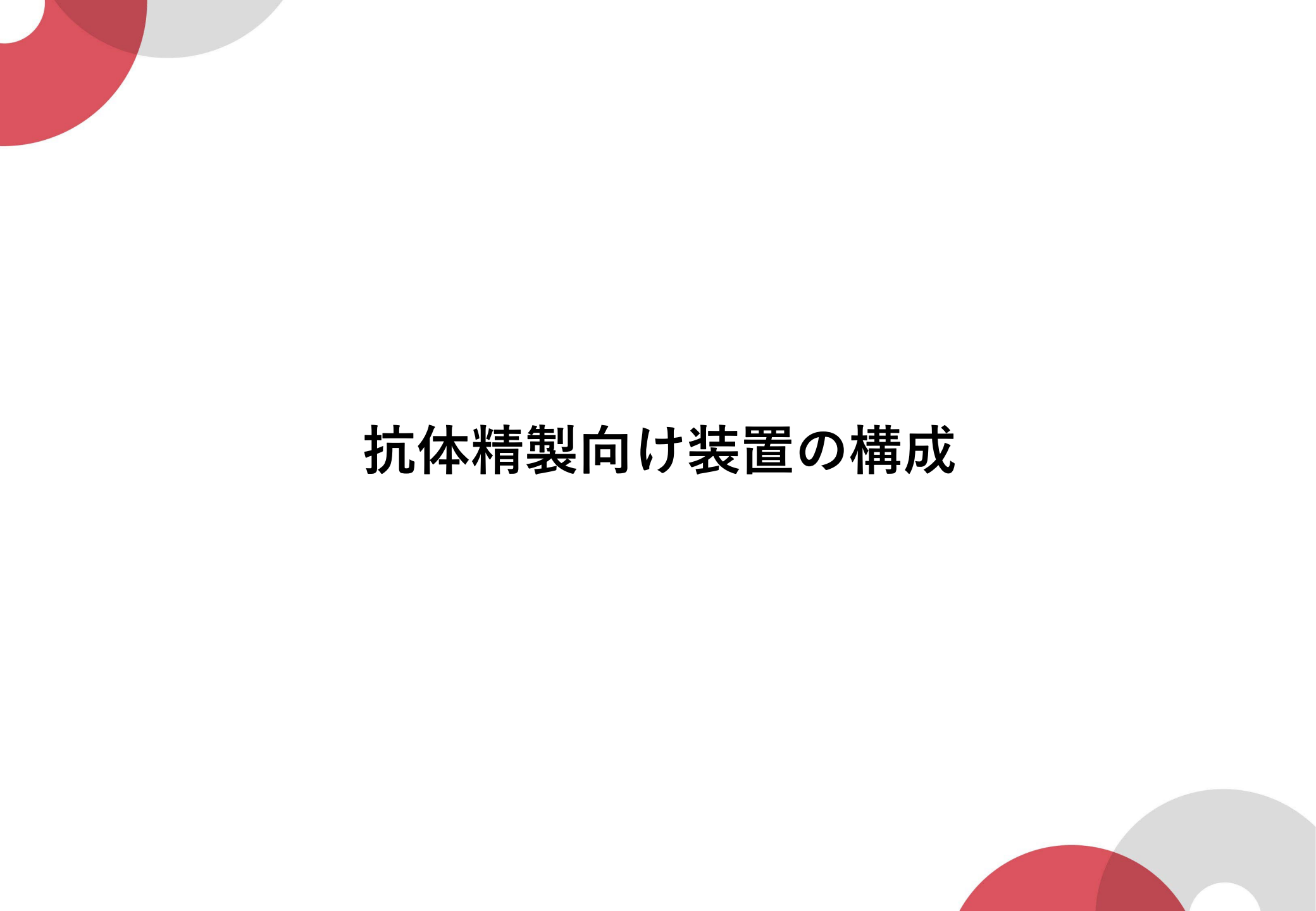


溶出後サンプル測定(オプション)



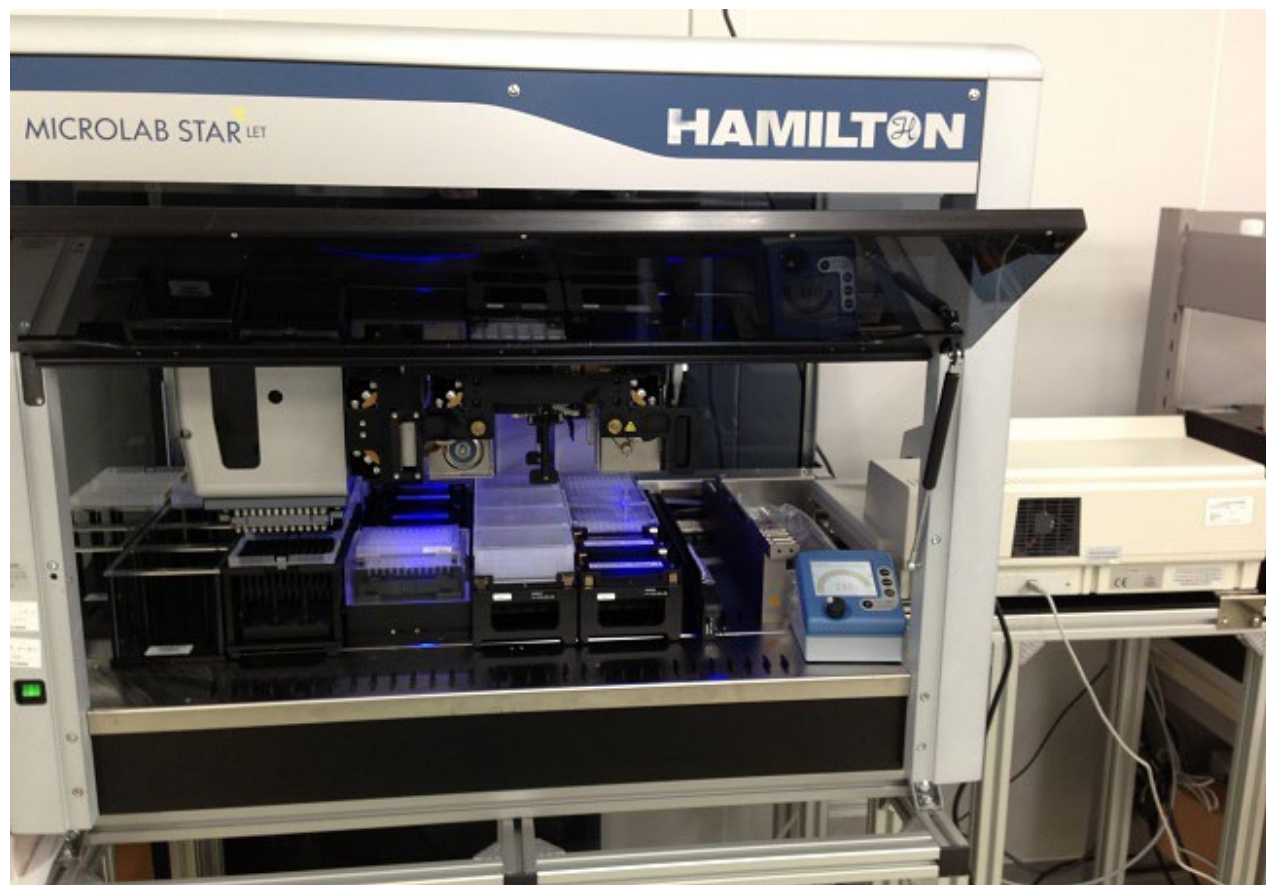
Plate Reader





抗体精製向け装置の構成

Anti-body purification STARlet system



自動化に適しているMonoSpin ProA 96プレート
Hamilton社のMicrolabSTARは最大限に能力を引き出せます。

抗体精製装置仕様

8 Independent Channel



プレートから単一のチューブまで柔軟に対応
8本すべてのチャンネルが独立して
液面検知可能
主にサンプルの分注

96Head

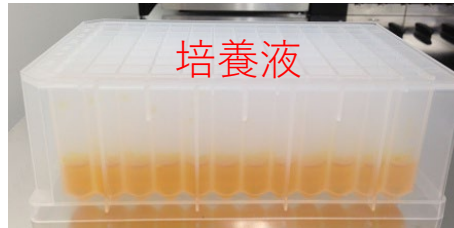


一度に96プレートの溶液を分注可能
プレートのA1,B2,G11,H12のポジションで
液面検知可能
主に試薬の分注

異なる液面の高さ



[独立チャンネル使用]



同じ液面の高さ



[96Head使用]



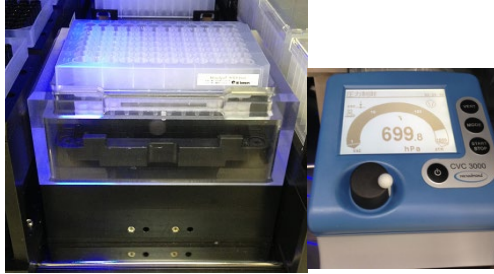
[If liquid surface is flat, using Head96 is recommended]

OK

要望に応じて適した分注ヘッドの選択が可能です。

抗体精製装置仕様

CVS (バキュームシステム)



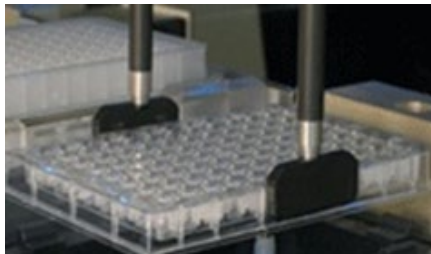
減圧吸引により
抗体精製プレートの通液目的で使用
※自動化対応の遠心機は価格と
設置場所が膨らむのでCVSを採用

Molecular Devices SpectraMax Plus384



プレートリーダーにより、
回収した溶液中の抗体の有無を判別

CORE gripper



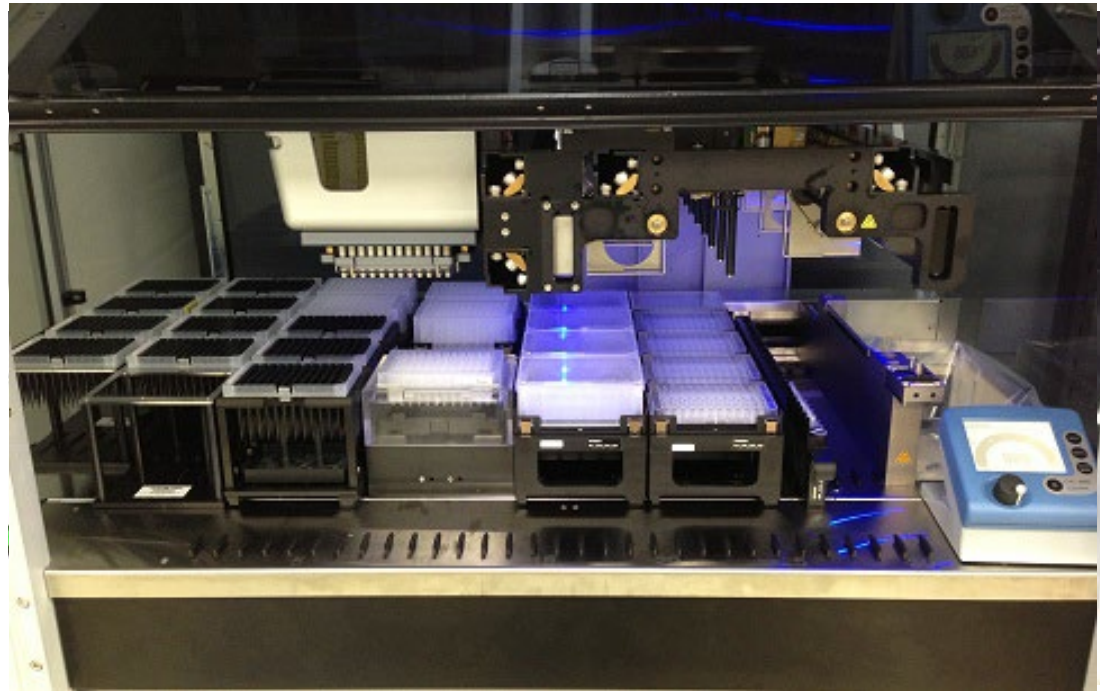
プレートの蓋の開閉や
装置内のプレートの搬送が可能

i-SWAP (外部デバイス用搬送アーム)

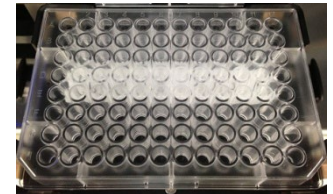


回収したプレートを外付けした
プレートリーダーに搬送可能

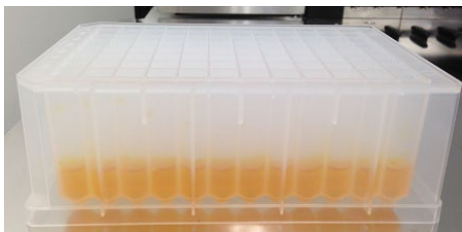
抗体精製システム 準備（ラボウェア）



[チップ]



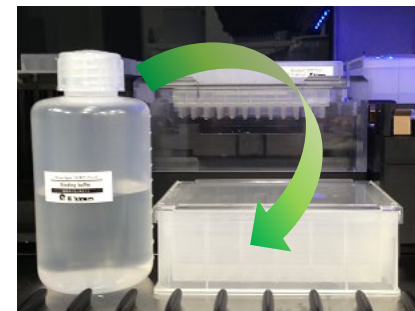
[回収プレート]



[培養液]




[抗体精製プレート]



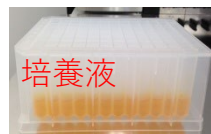
[試薬リザーバー]

電源を入れて必要なラボウェアを所定の位置に置くだけで準備は完了します。



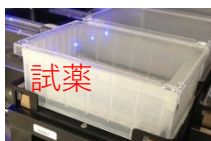
スループット

抗体精製 スループット

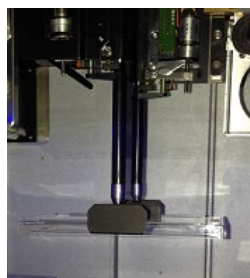


培養液

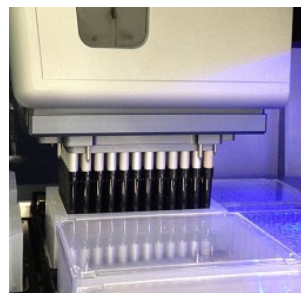
Or



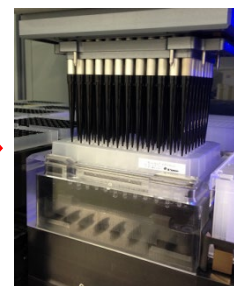
試薬



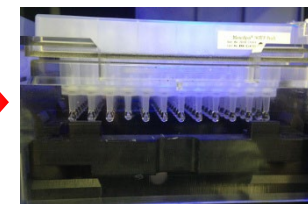
蓋の開閉



吸引

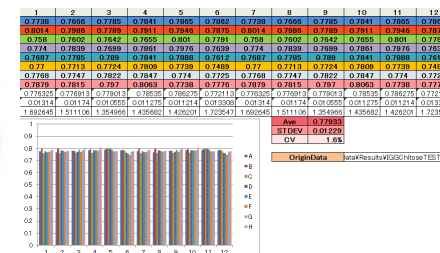
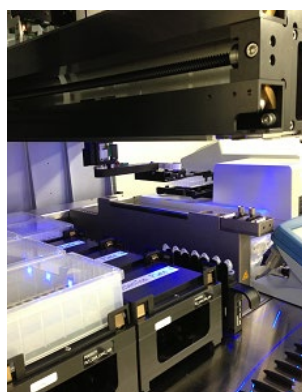
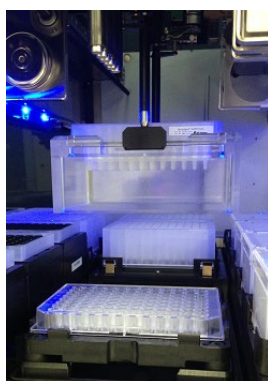


吐出



バキューム


一連の動作を行った後、精製した抗体溶液を96プレートに回収



プレートリーダーで測定し、結果ファイルを出力

i-SWAPを使いプレートリーダーへ搬送

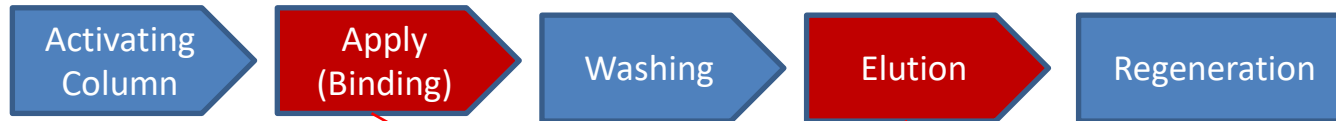
- ・ 全ての分注作業を96ヘッドで行った場合
18 min/plate [プレートリーダー測定の3分を含みます]
- ・ サンプルアプライのみ独立チャンネルを使用した場合
25 min/plate [プレートリーダー測定の3分を含みます]



データ

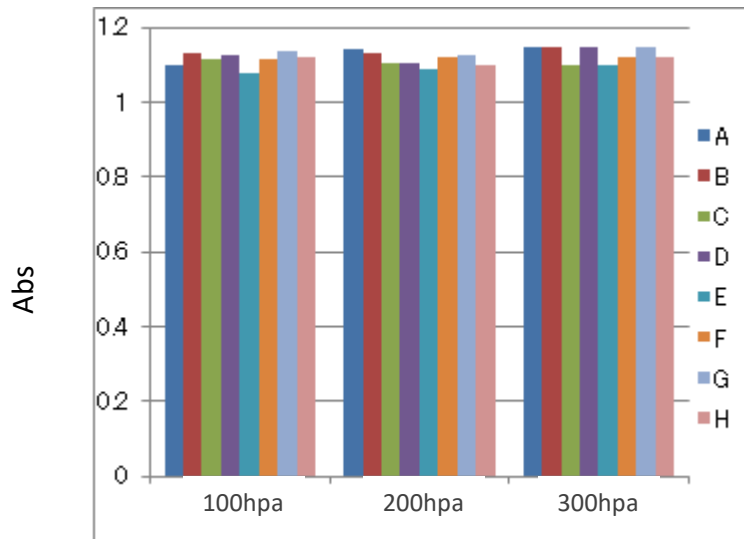
抗体精製装置 検証試験 2

通液条件による結果への影響



100hpa, 200hpa or 300hpa

サンプルアプライと溶出作業に関してバキュームの強さを変更し得られた結果の違いを比較



	100hpa	200hpa	300hpa	Ave	STDEV	CV
A	1.0962	1.1434	1.1491	1.1296	0.0290	2.6%
B	1.132	1.1299	1.1478	1.1366	0.0098	0.9%
C	1.1121	1.1067	1.099	1.1059	0.0066	0.6%
D	1.1254	1.1056	1.1484	1.1265	0.0214	1.9%
E	1.0789	1.0856	1.098	1.0875	0.0097	0.9%
F	1.1159	1.1185	1.1191	1.1178	0.0017	0.2%
G	1.1368	1.1239	1.1464	1.1357	0.0113	1.0%
H	1.118	1.0984	1.12	1.1121	0.0119	1.1%
Ave	1.1144	1.1140	1.1285			
STDEV	0.0191	0.0186	0.0223			
CV	1.7%	1.7%	2.0%			

この結果はバキュームの強さによる抗体の回収量への影響が無いことを示しました。

お客様が固相抽出のような細かい条件検討を行う必要はありません。

抗体固定化検証

BSA精製

Activating
Column

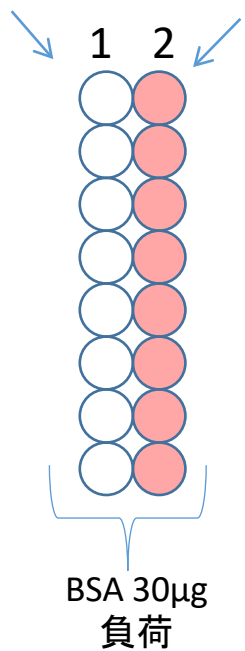
Apply
(Binding)

Washing

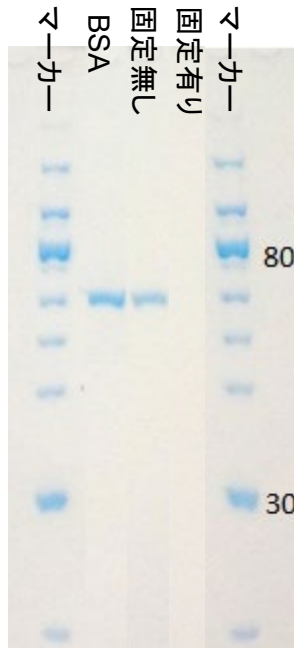
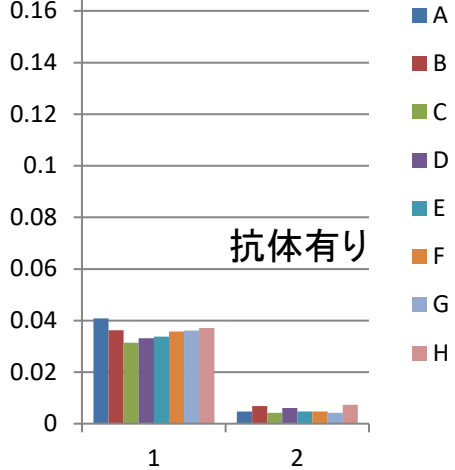
Eluting

Regeneration

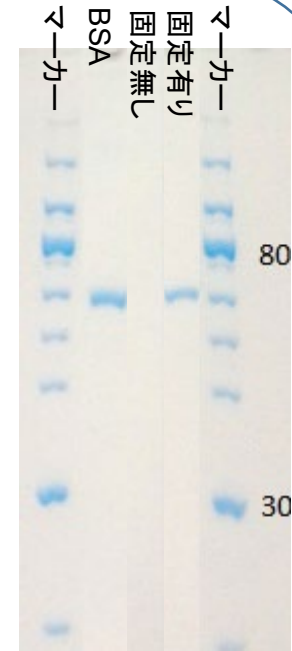
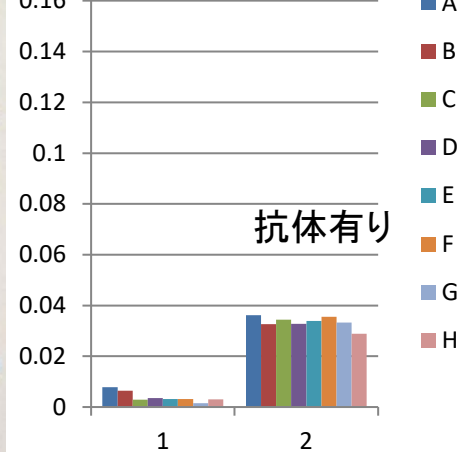
抗体固定 抗体固定有り
無し (Anti-BSA 75 μ g)



BSA Apply後の
通過液



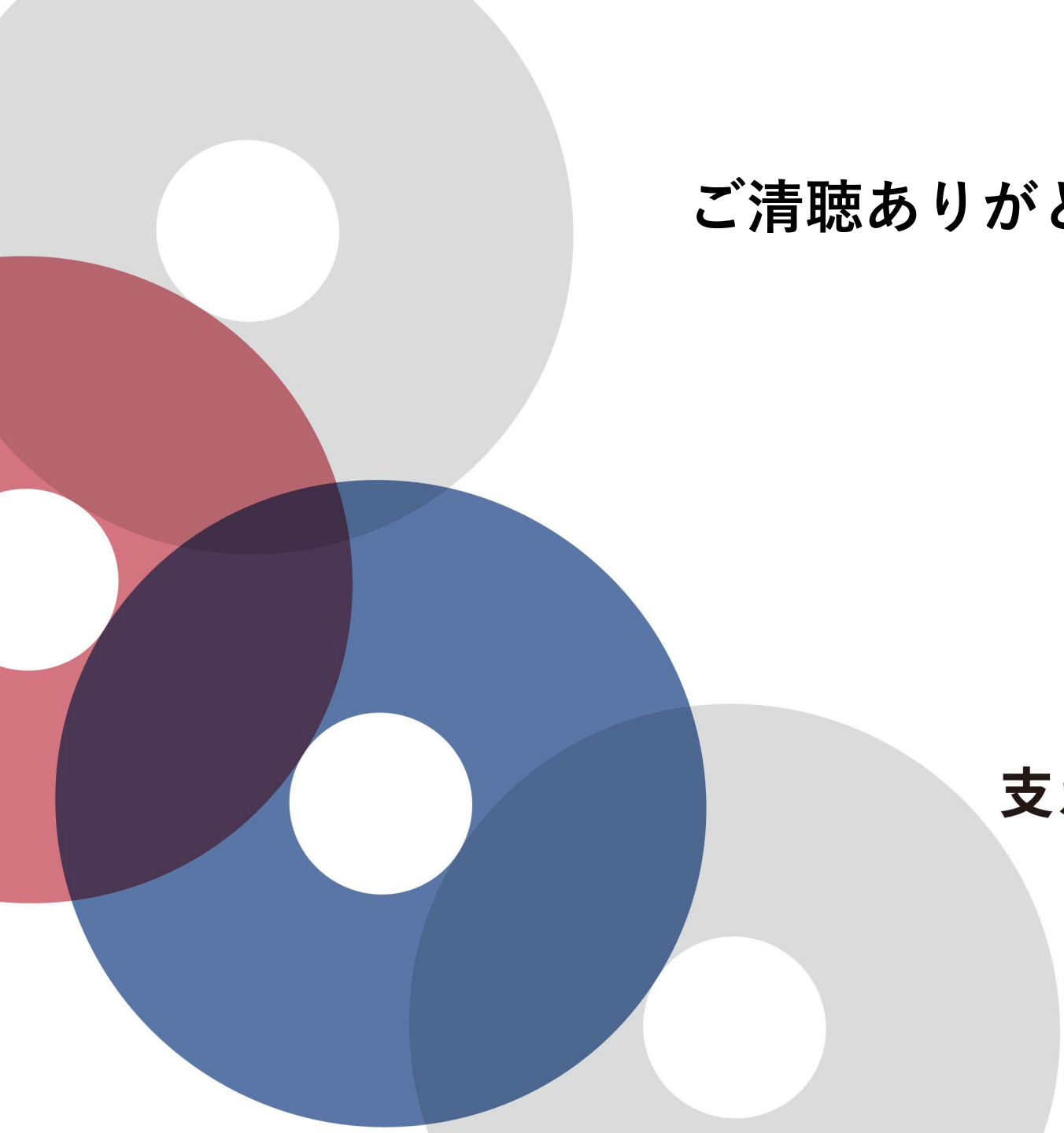
BSA Eluting後の
通過液



微量抗体固定プレートの自動の作製、アッセイが可能です。

抗体精製自動化 まとめ

- ①：簡単な準備
必要なラボウェアを置いて、起動するだけ
- ②：迅速な処理
96ヘッドを搭載し1枚あたり
15分程度で処理
- ③：安定した性能
使用回数や濃度に依存せず常に
安定したデータを再現



ご清聴ありがとうございました。

支える、あらゆる分析を。

Supports all kinds of analysis.

 **GL Sciences**