

電荷非対称フローFFF による ÄKTA-MALSを用いた抗体とタンパク質の絶対分子量測定

一般情報

ID0057

アプリケーション：タンパク質、医薬品

テクノロジー：FPLC-MALS

機器構成：GE Healthcare ÄKTA システム、PN3621 MALS

キーワード：FPLC、MALS、タンパク質、分子量、アグリゲーション

FPLCを使用したタンパク質と抗体の分離

FPLC(高速タンパク質液体クロマトグラフィー)は、タンパク質の混合物の分析または精製によく用いられる液体クロマトグラフィーの一種です。最も広く使用されているFPLCシステムは、GEヘルスケアのÄKTA システムです。ÄKTAシステムは、製薬分野および生体分子研究分野で、タンパク質、抗体、その他の生体分子の精製、分離、評価に使用されます。最新のFPLCシステムはÄKTA pure™システム（図1）で、通常はUV検出器のみが搭載されています。

UV検出器はタンパク質および抗体サンプルに対して非常に高感度の濃度検出器です。UV検出器信号から直接タンパク質または抗体サンプルのモル質量を導き出すことはできません。ÄKTAユーザーがサンプルのモル質量に関心がある場合、モル質量が既知の一連の標準タンパク質を測定し、そこからモル質量と溶出容量の検量線を作成します。ただし、このキャリブレーションではタンパク質のコンフォメーションは考慮されず、推定値のみ表示されます。

MALSを使用したタンパク質と抗体の絶対分子量測定

ÄKTAシステムに容易に接続できるMALSから、タンパク質または抗体サンプルのより信頼性が高い正確な絶対モル質量を測定できます。さらに、RI検出器は、濃度検出器としてUV検出器とともに使用されます。MALSは、タンパク質または抗体サンプルのモル質量に直接反応します。したがって、MALSから得られた分子量は、検量線には依存しません。

測定条件

- サンプル: BSA (ウシ血清アルブミン)
- 溶媒: リン酸バッファー
- カラム: GE Superdex™ 200 10/300 GL
- 溶液流速: 0.5 mL/分
- 検出器: PN3621 MALS
PN3211 UV
PN3150 RI 検出器



図1：GEヘルスケアのÄKTA pure™システム



図2：PN3621 MALS

結果

MALSは、タンパク質凝集体(ダイマーおよびトリマー)の大きなピークを示し、両方の濃度検出器(RIおよびUV)と比較して優れた感度を示します。これは、他の方法では利用できない少量の高分子タンパク質凝集体の検出に役立ちます(図3)。

MALSによりタンパク質のモノマー、ダイマー、トリマーの絶対モル質量が測定できるため(表1)、UVのみでは評価できない貴重な追加情報が得られます(図4)。

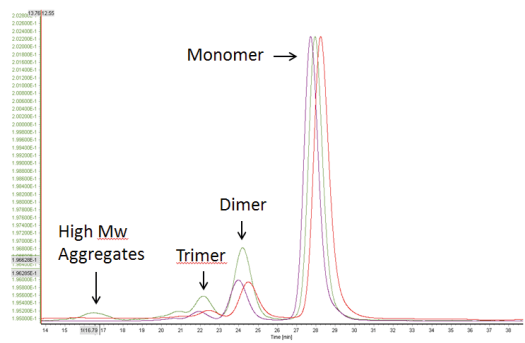


図3：Åkta-UV-MALS-RIを使用したBSAモノマー、ダイマー、トリマーおよび高分子タンパク質凝集体の分離（緑の線：MALS信号、赤の線：RI信号、マゼンタ：UV信号）

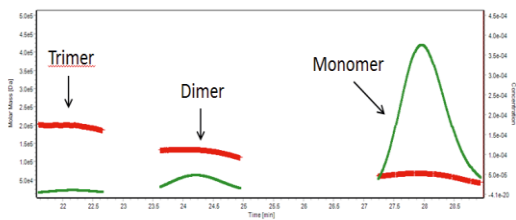


図4：MALSデータから得られたBSAモノマー、ダイマー、トリマーのモル質量（赤い線）（緑の線：濃度検出器信号）

BSA	Molar Mass [g/mol]
Monomer	66000 +/- 500
Dimer	132000 +/- 1000
Trimer	199000 +/- 1000

表1：Åkta-UV-MALS-RI測定から得られたBSAモノマー、ダイマー、トリマーのモル質量

まとめ

ÅKTA pure™などのFPLC分離システムにMALSを接続することでタンパク質および抗体サンプルの絶対分子量の測定が容易になるだけでなく、クロマトグラフィーシステムの分析能力と高分子タンパク質凝集体の検出感度が大幅に向上します。