

テクニカルノート

J.T.Baker® BAKERBOND® PROchievA™
recombinant protein A lab columns



PROchievA™プリパッケージ・ラボカラムの使用法



(a) 1 mL PROchievA™カラム



(b) 5 mL PROchievA™カラム

抗体およびFC融合タンパク質の精製プロトコル

このプロトコルは、明確な細胞培養からの抗体精製のための典型的な動作条件を提供します。これは、少数の代表的な分子の実験データに基づいて開発されており、収率と純度を最適化するためにサンプルのタイプと抗体の特性によって変更できます。最適化は、バッファータイプ、塩濃度、pH、洗浄バッファータイプおよび溶出バッファータイプの変化を伴う場合があります。

カラムの仕様

- カラム構造の材料は、生体適合性ポリプロピレンです。
- カラムのハードウェア圧力限界は5バーです。

測定：

- 1 mL BAKERBOND® PROchievA™カラム: 0.7 x 2.6 cm
- 5 mL BAKERBOND® PROchievA™カラム: 1.6 x 2.6 cm

レジジン

カラムには、モノクローナル抗体、FC融合タンパク質および二重特異性抗体の精製に適した組換えタンパク質Aレジジン™、J.T.Baker® BAKERBOND® PROchievA™が詰め込まれています。BAKERBOND® PROchievA™のタンパク質Aリガンドは組換えタンパク質Aであり、IgG分子のFc領域に結合します。スクロース、エチレングリコール、プロピレングリコールなどの添加剤を含む1M水酸化ナトリウムで構成されるアルカリクレンジングインプレイスソリューションを使用するように設計されています。リガンドの特性は、動的結合能力を最大化するために、二機能性リンカーを使用して70~80µmの平均粒子サイズを有する架橋されたアガロースビーズに最適化され、結合されています。

バッファータイプ

- 平衡バッファータイプ、洗浄バッファータイプ：10 mM リン酸ナトリウム二塩基、2 mM リン酸ナトリウム一塩基、137 mM 塩化ナトリウム、pH 7.4 (1XPBS)
- 溶出緩衝液: 0.1 M酢酸または0.1 Mクエン酸、pH 3.0 - 3.8
- 中和バッファータイプ: 1.0 Mトリス、pH 9.0
- 洗浄液: 0.1 M水酸化ナトリウム
- 貯蔵バッファータイプ：0.2 M酢酸ナトリウム、2%エタノール、2%ベンジルアルコール、pH 5.5で出荷されます。使用后、カラムは貯蔵バッファータイプに保存することをお勧めします。必要に応じて、カラムを20%エタノールで保存することもできます。

カラム操作シーケンス

注: 手順3 - 10の推奨流速は 表 I にすべてあります。

準備

01. 上部のプラグを所定の位置に保ちながら、カラム下部のストッププラグを取り外し、そのカラムを器具のカラムアウトレットに取り付けます。
02. カラムから上部のストッププラグを取り外し、カラムに器具のカラムインレットラインを取り付け、ゆっくりと平衡バッファーを流しながら「ウェット」接続を作成して、カラムに空気が入らないようにします。
03. カラムを初めて使用する場合は、2 - 5カラムボリューム(CV)を流し、続いて2 - 5 CVの洗浄液を平衡流速で洗浄します。

準備

04. カラムを平衡バッファー3 - 10 CVで平衡化します。カラムの出口からのpHが平衡バッファーの+/- 0.1単位に達した場合、カラムは平衡化されていると見なされず。
05. 表IIに示すカラム動的結合容量内での目的の流速でカラムにサンプルを適用します。対応する滞留時間における典型的な動的結合能力は、表IIに記載されています。動的結合容量は分子の種類や結合条件に応じて異なる場合があります(+/- 20%)。
06. 5 - 10 CVの洗浄バッファーで、または溶出液に何もないうまでカラムを洗います。(CV)を流し、続いて2 - 5 CVの洗浄液を平衡流速で洗浄します。

07. 2 - 5 CVの溶出バッファーを用いてカラムからターゲットを溶出します。溶出の1.0 mLあたり1 Mトリス、pH 9.0を100 µL含むチューブに溶出を収集します。
08. 3 - 10 CVの平衡バッファーを利用して平衡化します。

CIPと保管

09. カラムをクリーニングする場合、カラムとアルカリ溶液の15分間の接触時間を確保する流速でカラムの上に最低5CVの洗浄液を流します。このステップは、すべてのサイクルまたは希望する回数の実行できます。- 例えば、サンプルに応じて5回ごとに実行されます。
10. カラムを再度使用する場合は、手順4に進みます。カラムを保存する場合は、手順 11に進みます。
11. 5 - 10CV の貯蔵バッファーをカラムの上に流させます。カラムの出口でのpHが貯蔵バッファーpHの+/- 0.1単位に達することを確認します。その後カラムを精製器具から切り離すことができます。上部と下部のストッププラグをカラムに取り付けます。カラムを次の使用まで2 - 8°Cで保管します。

Table I: Typical protocol conditions

Purification protocol step	Step	Recommend buffer usage column volumes	1 mL column recommended flow rate*	5 mL column recommended flow rate*
4	Equilibration	3 - 10	1.00 mL/min (157cm/h)	5.00 mL/min(157cm/h)
5	Load	TBD by User	TBD by User	TBD by User
			2 min RT - 0.50 mL/min	2 min RT - 2.50 mL/min
			4 min RT - 0.25 mL/min	4 min RT - 1.25 mL/min
			6 min RT - 0.17 mL/min	6 min RT - 0.83 mL/min
			8 min RT - 0.13 mL/min	8 min RT - 0.63 mL/min
			Typical expected dynamic binding capacities mg/mL	
			2 min RT - 35 mg/mL	4 min RT - 50 mg/mL
6 min RT - 60 mg/mL	8 min RT - 65 mg/mL			
6	Wash	5 - 10	1.00 mL/min	5.00 mL/min
7	Elute	2 - 5	1.00 mL/min	5.00 mL/min
8	Equilibration	3 - 10	1.00 mL/min	5.00 mL/min
9	Cleaning	15-min contact time with minimum 5CV	0.5 - 1.0mL/min	1.0 - 5.0mL/min
11	Storage	5 - 10	1.00 mL/min	5.00 mL/min

*mL/min is same as CV/min for these columns

Table II: Alternative buffer and operational pH range of each step

Step	Standard	Alternative buffer	Standard pH	pH range
Equilibration, load	1X PBS	HEPES, Tris buffer	7.4	7.0-9.0
Wash	1X PBS	HEPES, Tris buffer with additives such as arginine, propylene glycol, IPA, Urea, Guanidine HCl or polysorbate 20	7.4	7.0-10.0
Elute	0.1 M Acetic acid or 0.1 M Citric acid	Acid with up to 1 M NaCl	3.4	3.0-3.8
Cleaning	0.1M NaOH	0.5 M or 1.0 M NaOH* or 0.5 M or 1.0 M NaOH with either 1M sucrose, 20 % ethylene glycol, or 20% propylene glycol**	-	-

* 0.5 and 1.0 M NaOH can be used to effectively clean the resin at 2-8°C.

**The addition of sucrose, ethylene glycol, or propylene glycol to these solutions can be used to help preserve column lifetime when cleaning is performed at ambient conditions.

Table III: Recommended buffers, salt and cleaning solutions

Recommended product	Avantor Part Number	VWR Part Number – North America	VWR Part Number – Europe & Asia	Grade*	Manufacturing quality standard
Sodium phosphate dibasic anhydrous	3826	JT3826	3826	USP, Endotoxin tested	GMP
Sodium phosphate monobasic monohydrate	3802	JT3802	3802	Multicompendial	GMP
Sodium chloride	3625	JT3625	3625	Multicompendial	GMP
Acetic acid	9526	JT9526	9526	Multicompendial	GMP
Citric acid	127	JT0127	127	Multicompendial	GMP
Tris (base)	4102	JT4102	4102	Multicompendial	GMP
Trishcl	4106	JT4106	4106	Biotech Reagent	GMP
Sodium acetate	3474	JT3474	3474	USP, FCC	GMP
Ethanol denatured 70%	P004	JTP004	P004	BAKER	GMP
Benzyl alcohol	9039	JT9039	9039	Multicompendial	GMP
1.0N NaOH	328	JT0328	328	Biotech Reagent	GMP
0.5N NaOH	329	JT0329	329	Biotech Reagent	GMP
0.1N NaOH	5636	JT5636	5636	BAKER-ANALYZED	-
Hepes sodium salt	4153	JT4153	4153	Ultrapur Bioreagent Molecular biology grade	-
L-arginine	2066	JT 2066	2066	Multicompendial	-
Propylene glycol	9403	JT9403	9403	Multicompendial	GMP
Urea	4203	JT4203	4203	Multicompendial	GMP
Guanidine hcl	510	JT0510	510	Biotech Reagent	GMP
Polysorbate 20	4116	JT4116	4116	Multicompendial	GMP
D-(+)-Sucrose, crystals	4074	JT4074	4074	Multicompendial	GMP
Ethylene glycol, 99%	5387	JT5387	5387	Baker	-
(±)-1,2 Propanediol ≥ 99.5%	9403	JT9403	9403	Multicompendial	GMP

*Multicompendial - meets USP, EP, BP, JP and ChP compendia as applicable.

* 製品の詳細については、www.avantorsciences.comおよびjp.vwr.comまたはAvantorのアカウントマネージャーにお問い合わせください。