

超微量分子量分布測定装置

Two MP



完全溶液系の分子量分布を算出します

Mass Photometry法を搭載した 分解能の高い分子量分布

1 nMを切る濃度での検出

- SECのマイナーフラクション（数mAU程度）の濃度でも検出できる高感度
- 微量のコンストラクション評価に最適
- 分子形状に依存しない解析結果

超シンプルなオペレーション

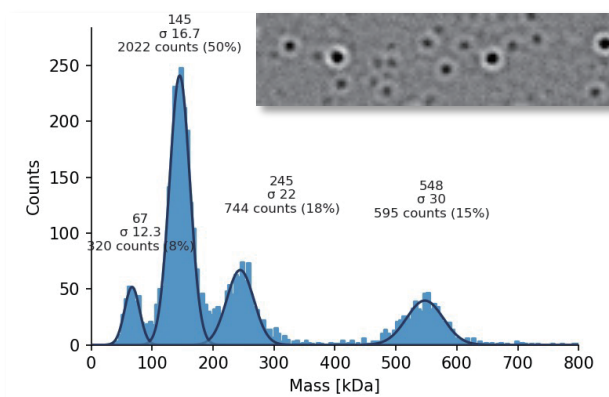
- 完全溶液系のバッチ式
- 完全非接触
- サンプル投入から結果算出まで2分間

豊富なアプリケーション

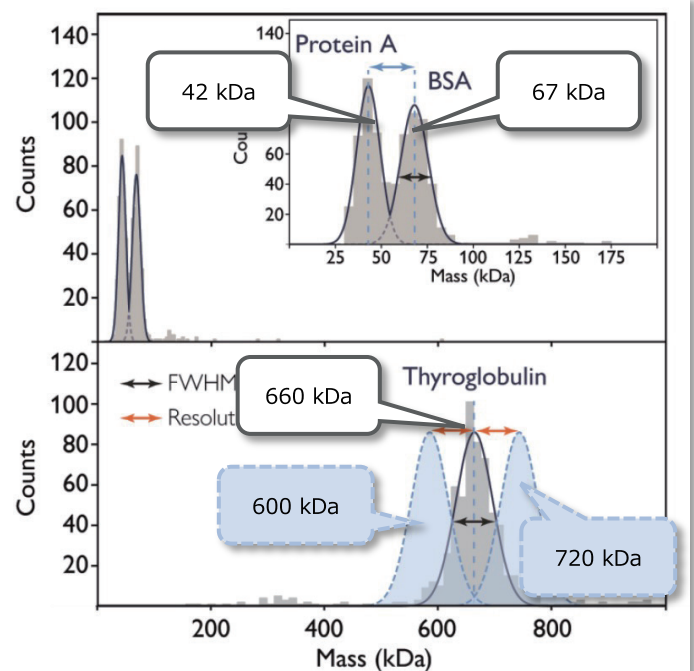
- タンパク質など高分子の複合体形成評価
- アデノ随伴ウイルス（AAV）のFull/Empty比率
- プラスミドDNA、Aptomerなど核酸化合物の分布
- 相互作用解析（抗原-抗体反応など）
など多数



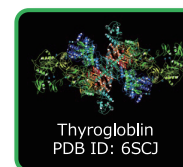
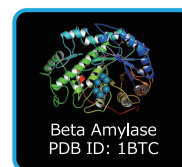
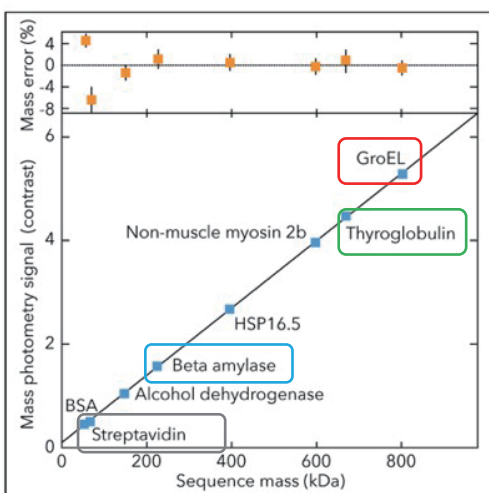
マイクロピペットでガラスプレートに置くだけ



BSA (67 kDa), h-IgG (150 kDa), Catalase (240 kDa), Urease (550 kDa)の混合物の測定結果およびiSCAT画像



隣接する分子量分布（42 kDa, 67 kDa）と、理論的に分解可能なサイズ差

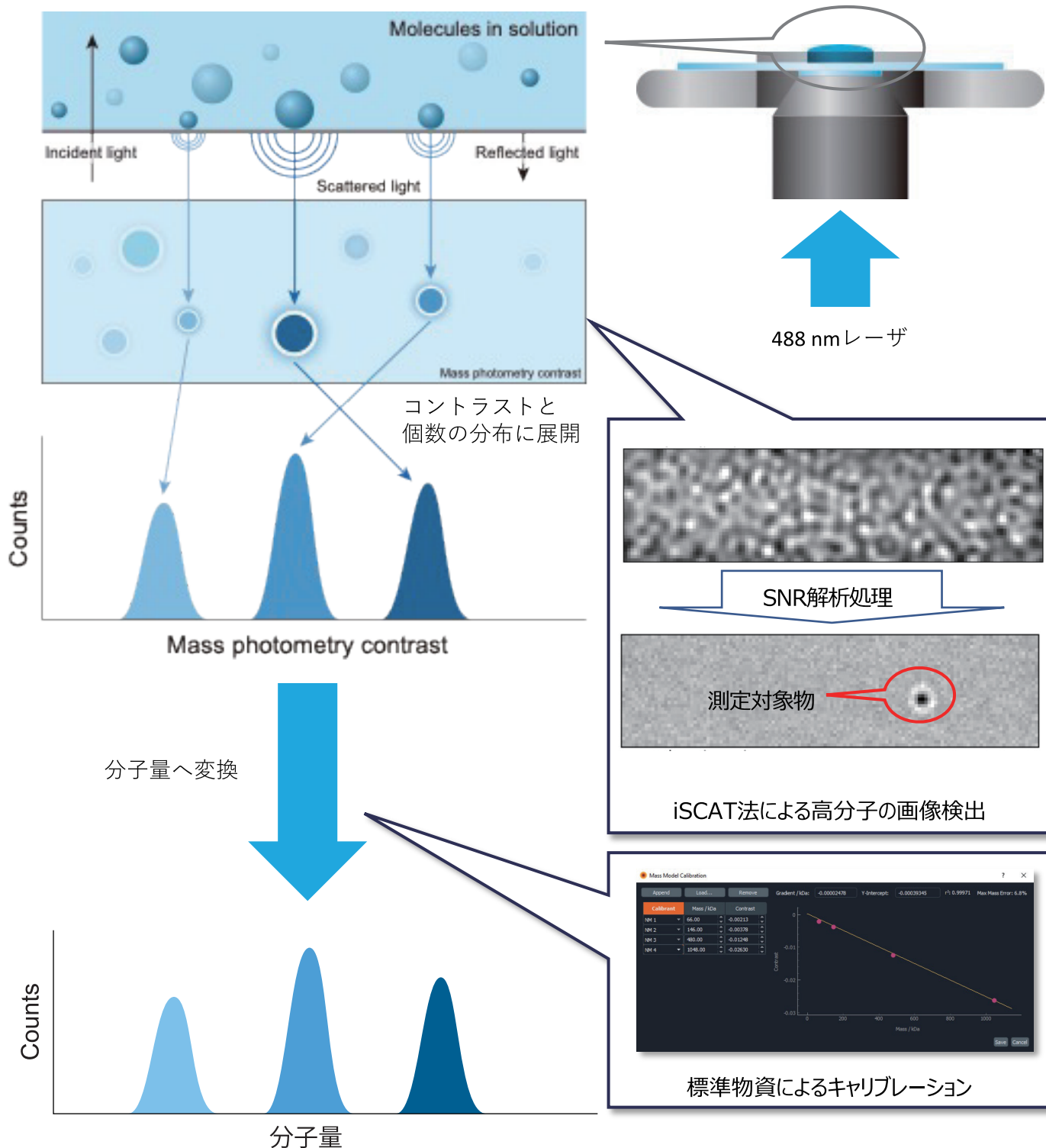


様々なタンパク質の配列から計算された分子量（横軸）とMP法による平均コントラスト（縦軸）の相関およびMP方による分子量換算に対するエラー（上部）
Young et al., Science 360, 423-427 (2018)

原理：MP (Mass Photometry)法

MP法は高分子画像検出（iSCAT法）と画像解析法を融合した、全く新しい分子量分布解析手法です。

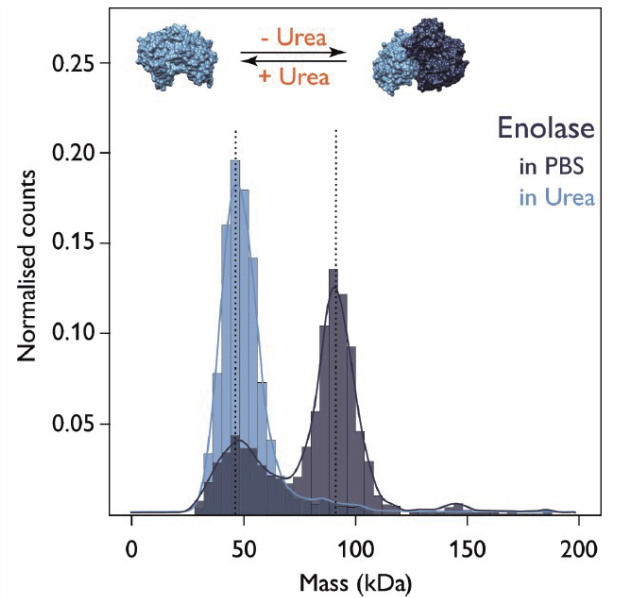
- ①レーザー光を試料にあて、予めフォーカスされた領域における高分子から発生する散乱光を、スライドガラス全体から発生する反射光との干渉波解析を実施することで獲得する。
- ②SNR(Short-noise limited signal-to-noise ratio)解析法によって、①で獲得したシグナルを測定対象物の画像として獲得する。
- ③②で得られた画像を収集し、コントラスト解析を実施する（iSCAT法）。
- ④③で得られたコントラスト情報および画像解析による多量高分子画像解析から、コントラスト—個数分布を得る。
- ⑤物性の同じ既知の分子量標準試料のコントラスト値を用いて検量し、④の分布を分子量—個数分布に変換する。



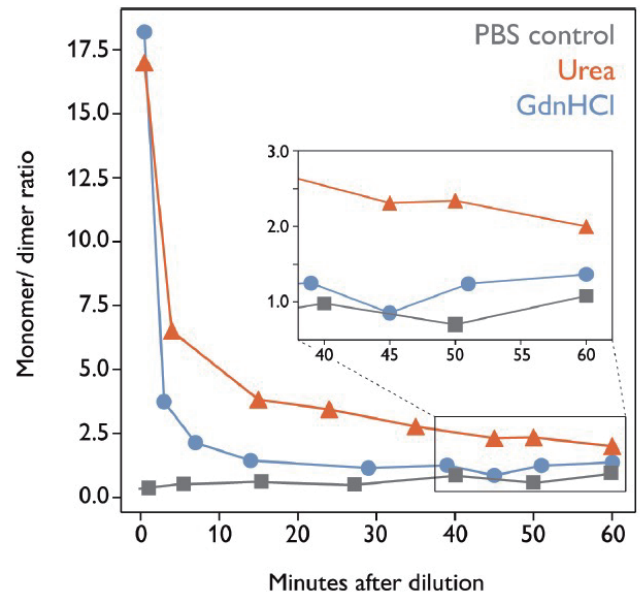
Mass Photometry法によるアプリケーション

複合体解析

Enolaseの変性剤による四次構造変化



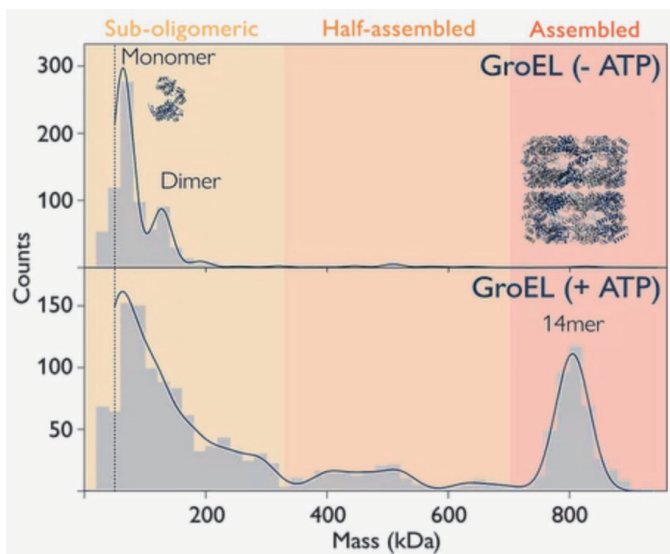
MP法によるEnolaseの変性剤存在/非存在下での分子量分布比較 (変性剤存在下でも計測ができていていることが示されている)



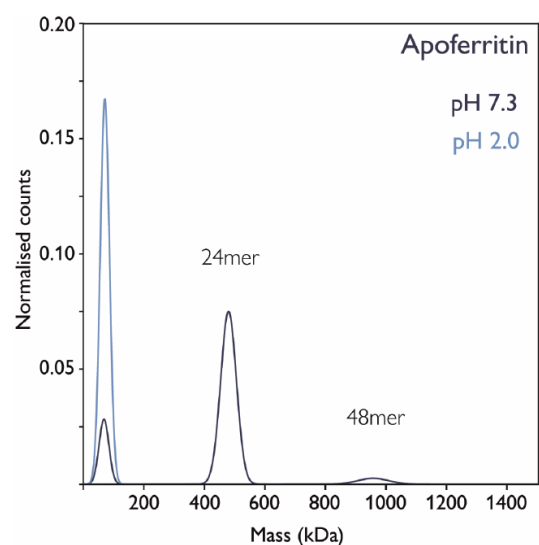
MP法から求めた、各種変性剤存在下サンプルをPBSに希釈した際の平衡戻り速度の解析結果

変性剤添加による四次構造変化の観察が可能 (単量体の分子量は一致している)

さまざまなタンパク質の四次構造変化



MP法によるGroELのATP存在下におけるオリゴマー化評価



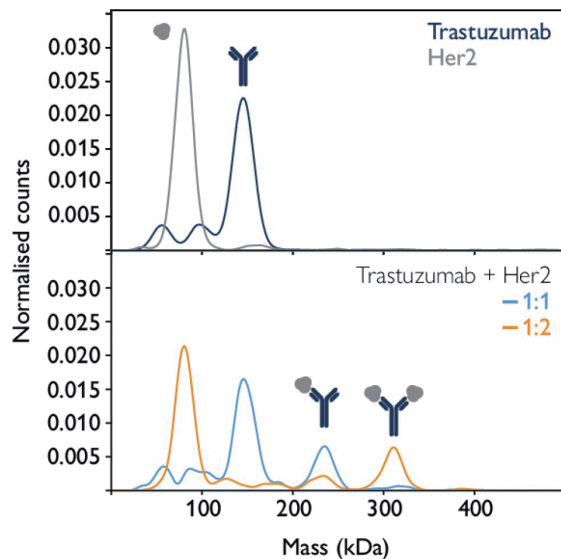
MP法によるApo FerritinのpH変化におけるAssembly評価

MP法は溶液中におけるさまざまな環境下での高次構造変化評価に適している

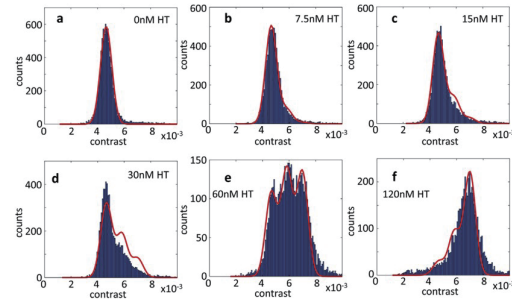
Mass Photometry法によるアプリケーション

相互作用解析

抗原-抗体反応



MP法によるTrastuzumabとHer2の相互作用



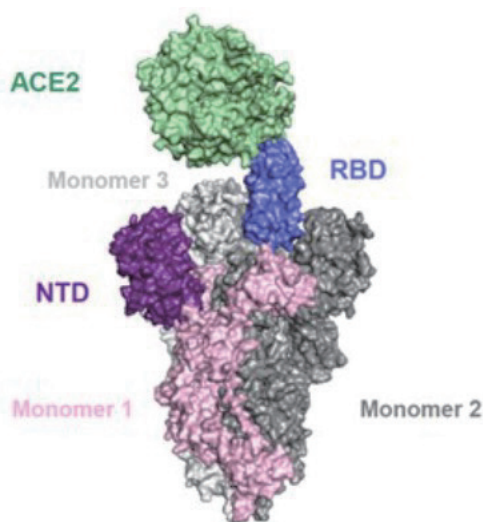
	AHT-HT	CD16-IgG
MP	$\log K_{a1} = 7.59 (7.50, 7.66)$ $\log K_{a2} = 7.47 (7.41, 7.55)$	$\log K_a = 6.49 (5.81, 6.78)$
ITC	$\log K_{a1} = 8.04 (7.76, 8.37)$ $^*\log K_{a2} = 7.44$	—
BLI	—	$\log K_a = 6.67$

* For ITC $\log K_{a1}$ is a fitting parameter and $\log K_{a2}$ is linked to $\log K_{a1}$ by the relationship: $\log K_{a2} = \log(K_{a1}/4) = \log K_{a1} - 0.6$.

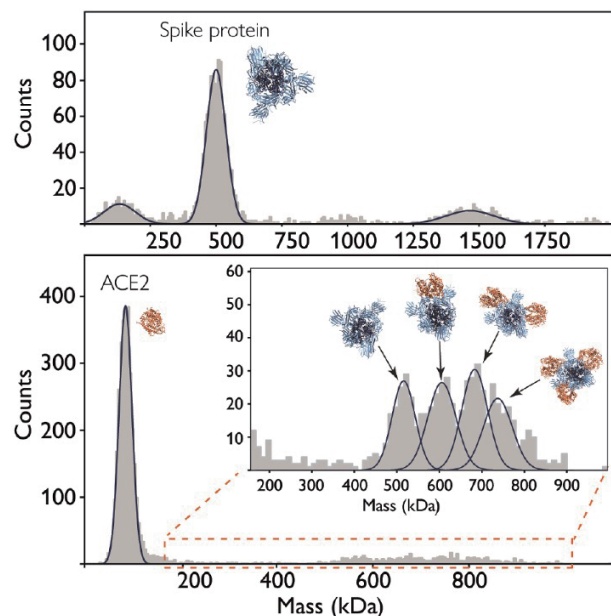
MP法によるCD16および抗CD16の相互作用および各原理によるKaの比較
ITC, BLIと相関があることが示されている
(Di Wu and Grzegorz Piszczek, Anal. Biochem. (2020))

極微量サンプルによる抗原-抗体反応の観察が可能

SARS-CoV2スパイクタンパク質とレセプタータンパク質 (ACE2) の相互作用



SARS-CoV2のスパイクタンパク質および
レセプタータンパク質 (ACE2) の複合体構造



MP法によるスパイクタンパク質の分子量分布 (上) と、ACE2-SARS-CoV-2スパイクタンパク質との相互作用の様子 (下)

微量な試料量で、ワクチン開発や抗ウイルス剤の開発に必要な相互作用解析が可能

英国AstraZeneca社との共同研究

Mass Photometry法によるアプリケーション

遺伝子治療分野 (AAV)

AAVのLoaded/Empty比率解析

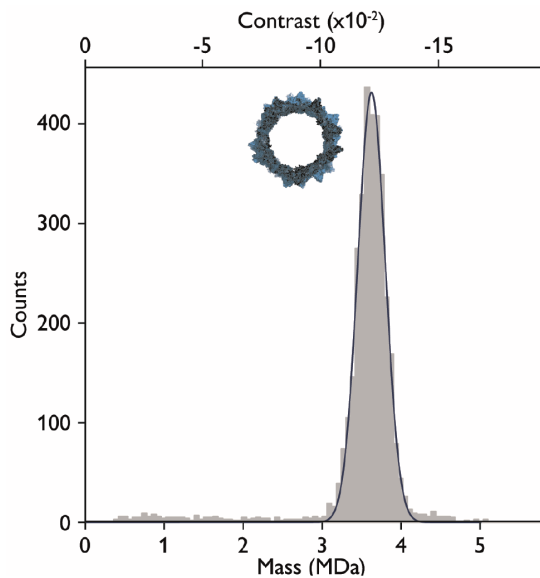


図1 : Empty AAVの分子量分布

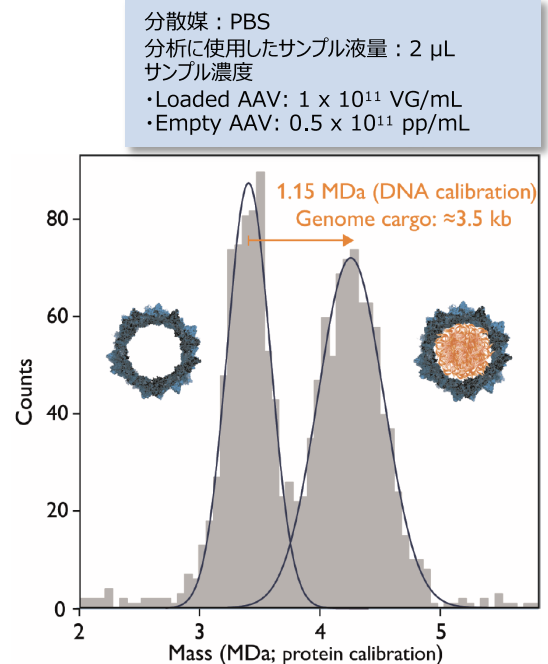
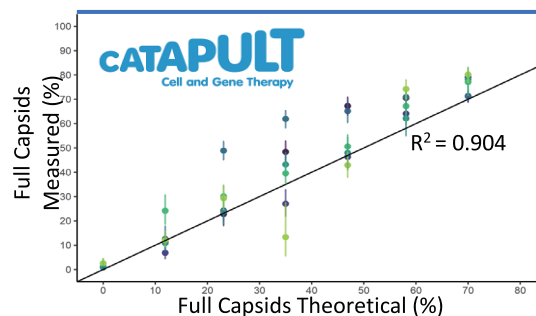
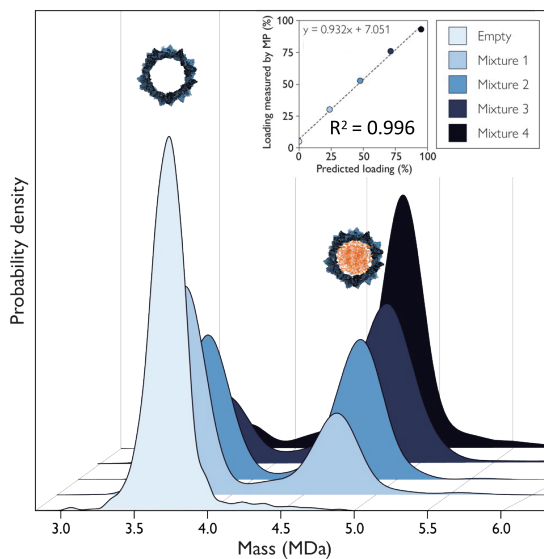


図2 : Loaded AAVの分子量分布
実際Full AAVは52%存在していた

極微量サンプルによるAAVのLoaded/Empty比率解析が可能

独国SirionBiotech社との共同研究

AAVのFull/Empty比率のタイトレーション



Linearity

- Samux^{MP} measures the E:F ratio reliably from 0% to 95% full
- CGT-Catapult performed the measurements on an early Samux^{MP} prototype
- Sample mixing of empty and full particles coming from different preps introduced variability in the measurements around 50% full capsids

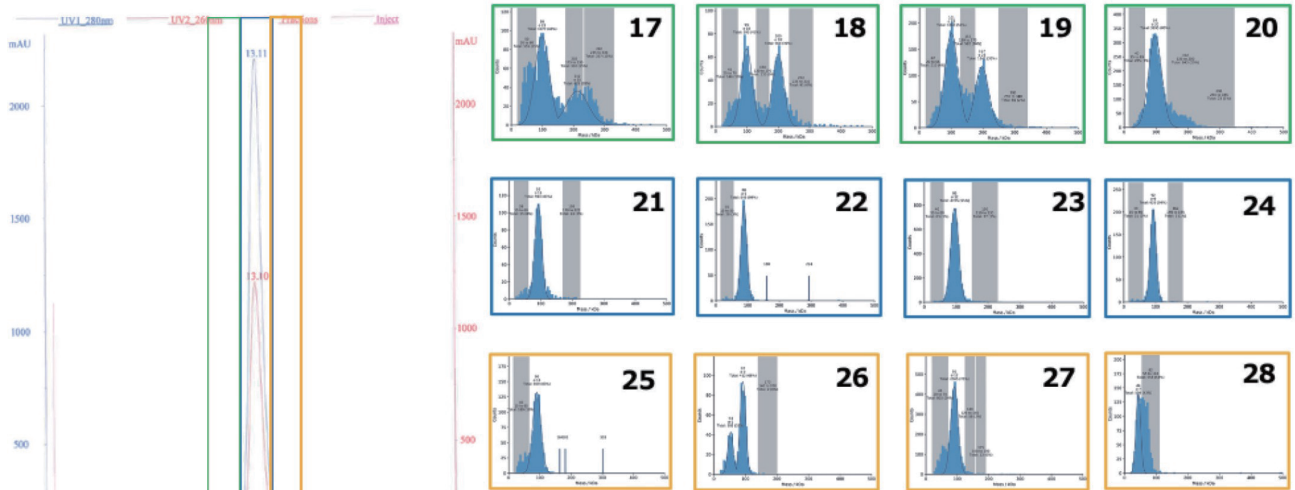
近接する分子量(Empty AAV)存在下やコンタミナント (Urease) 存在下において定量評価が可能

独国SirionBiotech社との共同研究

Mass Photometry法によるアプリケーション

他解析結果のサポート

SEC解析におけるマイナーフラクションの検出



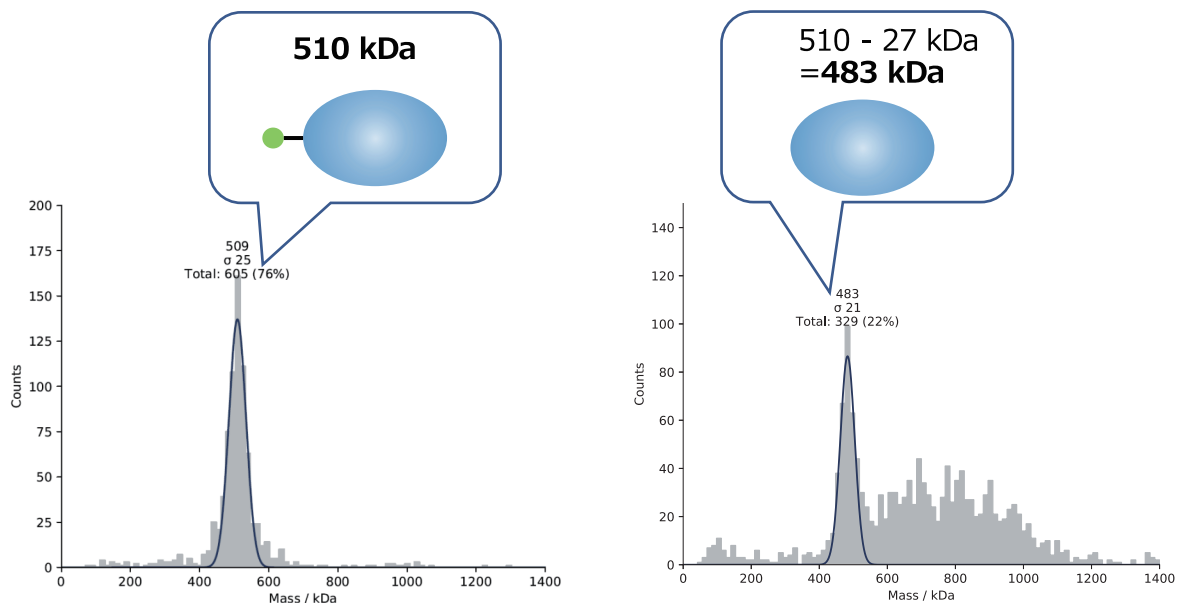
LipoxxygenaseのSEC結果
メインピーク（青）に対し双方（緑、黄）に肩が生じている

MP法によるSECフラクションの#17 - #28の各分子量分布結果
・メインフラクション（青；#21-24）はほぼ単量体であることが示された
・メインピークより高分子側（緑；#17-20）には2量体を多く含むフラクションが検出された
・メインピークより低分子側（黄；#25-28）にはフラグメントを多く含むフラクションが検出された

数mAU程度のフラクションでも分子量分布の検出が可能

丸和栄養食品社との共同研究

CryoEMスタンダード試料の品質確認

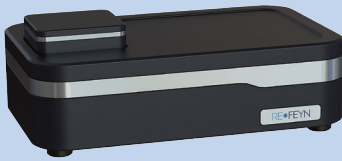


MP法によるcryoEMスタンダード試料（510 kDa）の分子量分布（左）および27 kDa tag配列切断後の分子量分布（右）
切断後は会合体が多く検出されており、ちょうど切断した大きさだけ小さくなったピークが観察されている

MP法は凝集の影響をほとんど受けずに計測することが可能

Refeyn シリーズラインアップ

Two^{MP}



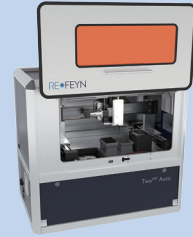
スタンダードモデル。
30 kDa からのタンパク質、核酸、多糖
類など幅広いアプリケーションに対応

Samux^{MP}



AAV など数 100 kDa を超える超分子
計測に特化した専用機

Two^{MP} Auto



Two^{MP} をさらにハイスループットにした
オートメーションシステム

仕様

原理	Mass photometry 法
測定項目	分子量分布、検出粒子（分子）数、濃度
レーザ波長	488 nm
撮像視野	4 × 11 μm (@500 Hz) 12 × 17 μm (@135 Hz)
画像 Pixel サイズ	12 nm
分布解析基準	個数基準分布
測定範囲	30 – 5,000 kDa
測定正確性	5% 以内
測定精度	2% 以内
分解能	25 kDa @66kDa 60 kDa @660kDa
濃度範囲	100 pM – 100 nM (0.01 - 10 μg/mL ; 100 kDa タンパク質)

諸元

装置サイズ	本体：504 × 314 × 135 mm (W × D × H) コントロールユニット：430 × 330 × 133 mm (W × D × H)
装置重量	本体：約 30 kg コントロールユニット：約 10 kg
必要電源口	100 V、4 口
設置環境	20℃±5℃、エアコンなどの風が直接当たらない 70% 以下の湿度

RE•FEYN
WEIGHING MOLECULES WITH LIGHT

レフェイン・ジャパン株式会社

〒657-0036 神戸市灘区桜口町 1-1-14 1F

TEL.078-600-2380

sales.japan@refeyn.com

<https://refeyn.co.jp>