

Colonne Bio-Monolith Protein G - Plus d'options pour mesurer le titre d'AcM

Note d'application

Produits biologiques et biosimilaires

Auteur

Phu T. Duong
Agilent Technologies, Inc.

Introduction

Ces dernières années, les anticorps monoclonaux (AcM) sont devenus l'un des produits majeurs du secteur biopharmaceutique, face aux besoins thérapeutiques pour le traitement de diverses maladies. Ces anticorps ont été conçus de manière à avoir une spécificité génétique leur permettant de mieux cibler les agents pathologiques. Au cours du développement de ces anticorps, des colonnes analytiques d'affinité à protéine A ou G sont utilisées pour mesurer leur titre ou leur concentration à partir de différents surnageants de cultures cellulaires afin de sélectionner le clone produisant le meilleur rendement. Un monolithe polymérique inerte est utilisé comme support pour les colonnes à protéine A ou G. Ces deux colonnes ont une forte affinité pour les anticorps et ne retiennent par conséquent que les anticorps dans les surnageants de cultures cellulaires. Cependant, comme l'indique le tableau 1, elles n'ont pas la même sélectivité.

Cette note d'application présente la colonne Agilent Bio-Monolith Protein G. La colonne est conçue pour être ultra-rapide et offrir une haute capacité de chargement. Les données présentées montrent sa linéarité et sa haute spécificité. L'analyse de la linéarité montre que la colonne permet une analyse quantitative précise des AcM présents dans le surnageant de cultures cellulaires. En outre, les données d'analyse de durée de vie indiquent que la colonne est capable d'une grande reproductibilité, a une longue durée de vie et présente une contrepression faible et stable. La colonne Bio-Monolith Protein G est complémentaire de la colonne Bio-Monolith Protein A et permet de disposer de plus d'options pour mesurer le titre d'anticorps monoclonaux.



Agilent Technologies

Tableau 1. Affinité de liaison d'Agilent Bio-Monolith Protein A et Protein G pour les différentes sous-classes d'IgG [1,2].

Anticorps	Protéine A	Protéine G
Humain		
IgG1 humaine	++++	++++
IgG2 humaine	++++	++++
IgG3 humaine	–	++++
IgG4 humaine	++++	++++
IgA humaine	++	–
IgD humaine	++	–
IgE humaine	++	–
IgM humaine	++	–
Souris		
IgG1 de souris	+	++
IgG2a de souris	++++	++++
IgG2b de souris	++++	+++
IgG3 de souris	+	+++
IgM de souris	+/-	–
Fragments d'anticorps		
Fab humain	+	+
F(ab') ₂ humain	+	+
scFv humain	+	+
Fc humain	+	+
K humain	+	+
I humain	+	+

++++ = Forte affinité
 +++ = Affinité modérée
 ++ = Faible affinité
 + = Très faible affinité
 – = Pas d'affinité

Matériaux et méthodes

- Phosphate de sodium monobasique monohydraté (Sigma-Aldrich, Corp., réf. S3522) (PM 137,99)
- Phosphate de sodium dibasique dihydraté (Sigma, réf. 71643) (PM 177,99)
- Acide citrique monohydraté (Sigma, réf. C7129) (PM 210,14)
- Chlorure de sodium (Sigma, réf. S5886) (PM 58,44)
- Acide phosphorique, 85 % par poids dans H₂O, 99,99 % base avec traces de métaux (Aldrich, réf. 345245)
- Solution d'hydroxyde de sodium, 50 à 52 % dans de l'eau, éluant pour IC (FLUKA 72064) (PM 40)
- Glycine, pour électrophorèse, ≥99 % (Sigma, réf. G8898) (PM 75,07)
- Acide acétique glacial (Sigma, réf. A9967) (PM 60,05)
- Acide chlorhydrique 36,5 à 38,0 %, BioReagent, pour biologie moléculaire (Sigma, réf. H1758)
- Kit de lyse cellulaire pour *Escherichia coli* (Sigma réf. CB0500).

- Surnageant et lysat de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO), anticorps monoclonal humanisé dérivé de cellules CHO (IgG2 et IgG3) de CreativeBio Labs.

Méthode

La phase mobile A est le tampon de liaison et de lavage, contenant un tampon de phosphate de sodium 50 mM, pH 7,4. Deux solutions mères (0,2 M) sont préparées à partir de 27,6 g de phosphate de sodium monobasique monohydraté dans 1 L d'eau déionisée et 35,6 g de sodium dibasique dihydraté, également dans 1 L d'eau déionisée.

Pour faire 2 L de phosphate de sodium contenant un tampon de phosphate de sodium 50 mM et de chlorure de sodium 50 mM, pH 7,0 :

1. Mélanger 195 mL de solution mère de phosphate de sodium monobasique monohydraté et 305 mL de solution mère de phosphate de sodium dibasique dihydraté. Mélanger par agitation magnétique.
2. Ajouter 5,8 g de chlorure de sodium et continuer à mélanger.
3. Ajouter 1 L d'eau déionisée.
4. Mesurer le pH de la solution et ajuster à pH 7,0 avec NaOH ou de l'acide phosphorique 3 M.
5. Verser la solution dans une fiole jaugée de 2 L, puis ajouter de l'eau jusqu'à la marque.

La phase mobile B est un tampon d'éluion contenant de l'acide citrique 0,1 M, pH 2,0, préparé par dissolution de 21 g d'acide citrique monohydraté dans environ 600 mL d'eau en mélangeant doucement. Ajuster le pH à 2,0 avec HCl 1 M, puis diluer la solution avec de l'eau jusqu'à 1 L dans une fiole jaugée.

Le surnageant et le lysat de cellules CHO, le lysat de cellules d'insectes (tous les échantillons ont été centrifugés), et les IgG1, IgG2 et IgG3 monoclonaux humanisés ont été achetés auprès de Creative BioLabs, New York. Le lysat d'*Escherichia coli* a été préparé selon la méthode recommandée par Sigma-Aldrich, Corp [3]. Le kit contient CelLytic B, un réactif de lyse bactérienne (500 mL), une solution de lysozyme (10 × 1 mL), de la benzonase (25 000 unités) et un cocktail d'inhibiteur de protéase (5 mL). Le lysat est préparé par l'addition de 1,0 g de pâte de cellules à 10 mL de réactif CelLytic B, 0,2 mL de lysozyme, 0,1 mL d'inhibiteurs de protéases et 500 unités de benzonase. Le mélange est agité brièvement par vortex, puis mélangé pendant 10 minutes (à la main ou sur agitateur) pour assurer une meilleure extraction des protéines solubles. Le mélange est alors centrifugé à 5 000 g pendant 10 minutes pour faire sédimenter les matériaux insolubles. La fraction de protéines solubles (surnageant) est retirée avec précaution des débris cellulaires (sédimentés au fond du tube). La concentration de protéines dans le surnageant peut être estimée par la méthode de Bradford, en l'occurrence 40 mg/mL.

Une partie du surnageant est alors dopée avec des IgG1, IgG2 ou IgG3 comme décrit. Les surnageants sont dilués avec du tampon de liaison (ou tampon A) jusqu'à une concentration finale de 10 mg/mL, puis dopés avec 2 mg/mL d'un seul anticorps monoclonal humanisé purifié de type IgG1, IgG2 ou IgG3.

Conditions

Colonne : Agilent Bio-Monolith Protein G, 5,2 mm de diamètre, 4,95 mm de long (réf. 5190-6900)

Tampon de liaison : A : phosphate de sodium 50 mM, pH 7,4

Tampon d'élué : B : acide citrique 0,1 M, pH 2,0

Échantillon : voir les chromatogrammes

Volume d'injection : voir les chromatogrammes

Débit : 1,0 mL/min (voir les chromatogrammes)

Gradient :	Temps (min)	% A
	0	100
	0,4	100
	0,5	0
	2,0	0
	2,1	100
	4,2	100

Temp. : 25 °C

Détecteur : UV, 280 nm

Système : LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity

Résultats et discussion

Spécificité et sélectivité

Comme indiqué dans le tableau 1, la colonne à protéine G possède une plus grande affinité de liaison pour différentes sous-classes d'anticorps monoclonaux que la colonne à protéine A, et seule la protéine G possède une affinité pour la sous-classe IgG3. Les données de la figure 1A démontrent la spécificité de la colonne Bio-Monolith Protein G ainsi que sa capacité à mesurer le titre, c'est-à-dire la présence et la concentration d'anticorps dans le surnageant. L'échantillon de surnageant de cellules CHO a été dopé avec un AcM recombinant humanisé purifié de type IgG3 puis injecté sur la colonne. Cet AcM était exprimé dans la lignée de cellules CHO. Les données montrent qu'IgG3 était la seule protéine retenue par la colonne, puis éluée à environ 1,6 minute à un débit de 1,0 mL/min, alors que toutes les protéines de la cellule-hôte n'ont pas été retenues par la colonne et ont été éluées avec le pic de fraction non retenue.

Afin de montrer la différence de sélectivité entre les colonnes à protéine A et à protéine G, des anticorps monoclonaux de types IgG1, IgG2 et IgG3 ont été injectés sur l'une et l'autre colonne. IgG1 ainsi qu'IgG2 ont été retenues par les deux colonnes (données non présentées) mais IgG3 n'a pas été retenue par la colonne Bio-Monolith Protein A. IgG3 a été éluée dans le pic de fraction non retenue et IgG3 a été retenue puis éluée uniquement sur la colonne Bio-Monolith Protein G (comparer les figures 1A et 1B).

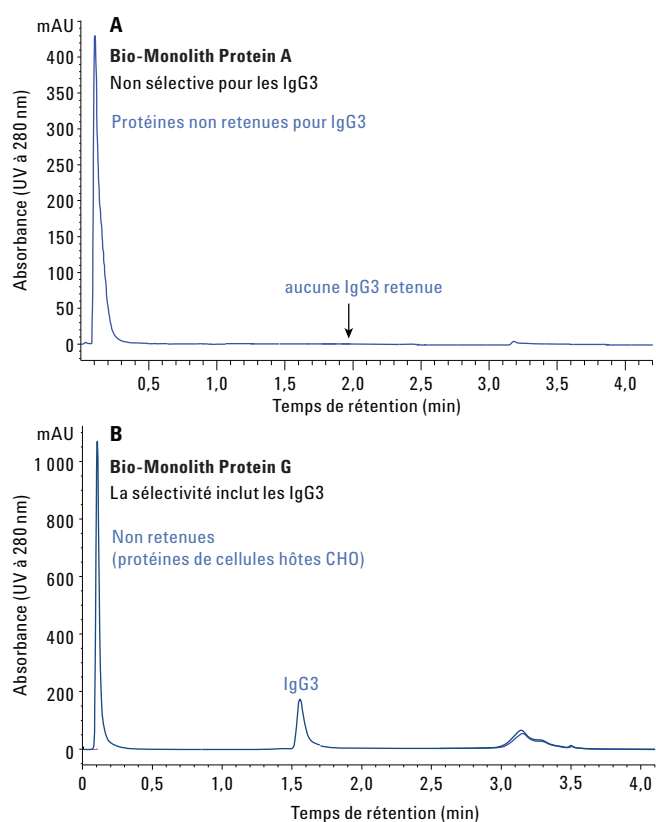


Figure 1. A) Pas de liaison d'IgG3 sur la colonne Bio-Monolith Protein A. Les IgG3 ont été éluées dans le pic de fraction non retenue. 2 mg/mL d'IgG3 humanisées mélangées avec du tampon de liaison (3 µL ont été injectés sur la colonne). B) La colonne Agilent Bio-Monolith Protein G a rapidement retenu les IgG3 de la récolte d'une culture cellulaire dopée avec des IgG3 (5 µL d'IgG3 2,0 mg/mL mélangés avec 10 mg/mL de surnageant de cellules CHO ont été injectés sur la colonne).

Un test plus rigoureux a été effectué pour confirmer que la spécificité de la colonne Bio-Monolith Protein G était telle qu'elle n'avait pas d'affinité de liaison pour les protéines des cellules hôtes. Des échantillons de protéines de cellules hôtes de lysat cellulaire d'*E. coli*, de lysat de cellules CHO, de surnageant et de lysat de cellules d'insectes ont été utilisés. Ces lysats contenaient des protéines de cellules-hôtes extraites avec des tampons de lyse contenant du dodécylsulfate de sodium, un composé qui affecte les liaisons non spécifiques sur la colonne. Ces échantillons contenaient uniquement des protéines de cellules hôtes mais pas d'anticorps. Ce test a été réalisé car les échantillons difficiles donnent des résultats non spécifiques lorsque la colonne est mal conçue. La figure 2 montre que les protéines du surnageant de cellules hôtes ne sont pas absorbées par la colonne. Toutes les protéines de cellules hôtes ont été éluées dans les pics de fraction non-retenu. Les données indiquent que la colonne Bio-Monolith Protein G n'avait pas d'affinité pour les protéines des cellules hôtes.

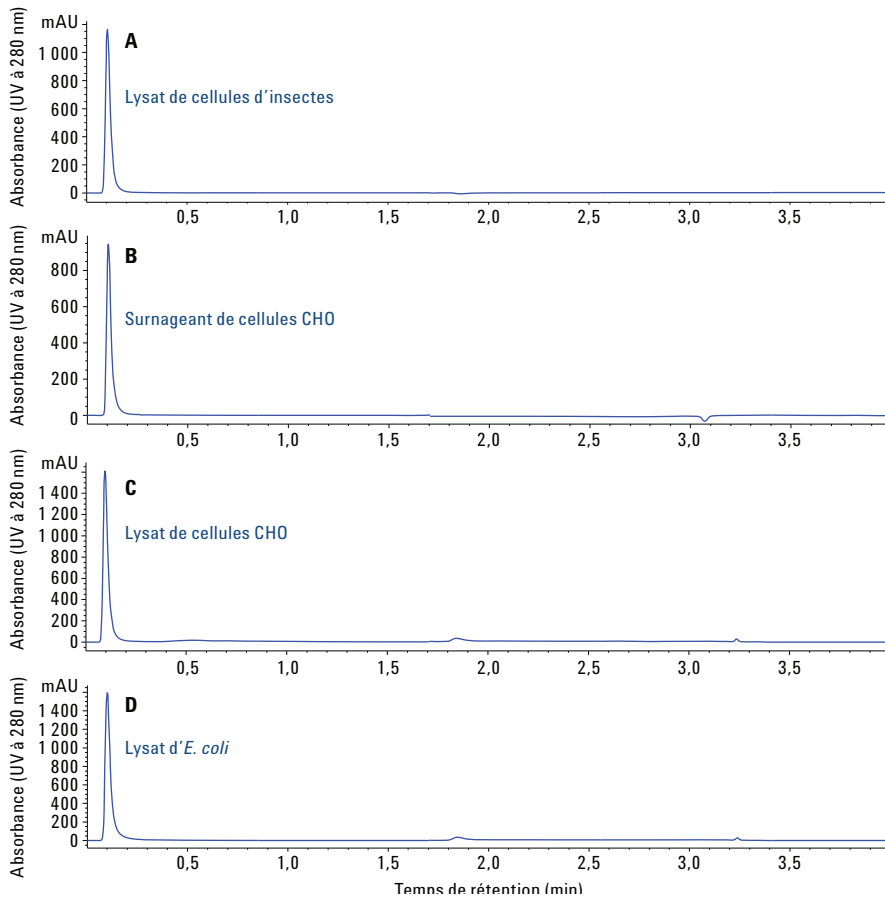


Figure 2. Analyse de spécificité sur la colonne Agilent Bio-Monolith Protein G avec 10 mg/mL de protéines de cellules hôtes diluées avec du tampon de liaison. Le volume d'injection était de 5 μ L pour tous les échantillons. A) Lysat de cellules d'insectes, B) Surnageant de cellules CHO, C) Lysat de cellules CHO, D) Lysat d'*E. coli*.

Quantification précise

La mesure précise du titre d'AcM est essentielle dans les stades précoces de développement lorsque la lignée cellulaire est sélectionnée, et également en phase de production quand la quantité d'AcM dans le surnageant de culture cellulaire détermine le moment optimal de la récolte. Afin de démontrer la capacité de la colonne Bio-Monolith Protein G à quantifier de manière précise les AcM, différentes quantités (μ g) d'IgG purifiées ont été injectées sur la colonne. Les données d'aires de pics par rapport aux quantités d'IgG générées ont été utilisées pour construire les courbes de linéarité et établir la précision de l'analyse. La figure 3 montre la linéarité des aires de pics de la colonne à protéine G, mettant en évidence que la colonne peut être utilisée pour la quantification des AcM dans le milieu de culture cellulaire récolté pour différentes concentrations. Des quantités allant jusqu'à 2 μ g d'IgG ont été injectées sur la colonne. Pour 2 μ g, le rapport signal/bruit n'était pas supérieur à 1:1 (données non présentées). La capacité de chargement maximale de cette colonne est d'environ 400 à 500 μ g d'IgG (données non présentées), ce qui couvre la plage de concentrations obtenues durant la sélection de lignées cellulaires et en production.

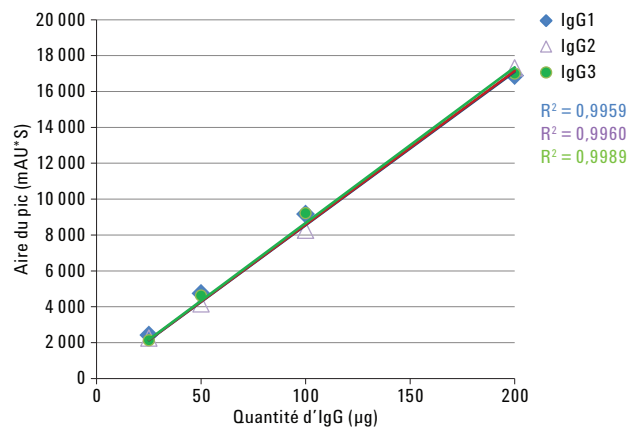


Figure 3. La colonne Agilent Bio-Monolith Protein G permet de quantifier les anticorps monoclonaux. Les courbes de linéarité comprennent des données d'aire de pic pour 25 à 200 μ g d'IgG.

Une plus vaste plage de chargement qu'une autre colonne à protéine G d'un autre fabricant

La figure 4A montre une comparaison de la linéarité pour une plage étendue de chargement d'IgG3 entre la colonne Bio-Monolith Protein G et une colonne à protéine G de 2,1×30 mm, 4 000Å d'un autre fabricant. La colonne Agilent présente une plage de chargement linéaire de 25 à 200 µg d'IgG3, alors que l'autre colonne ne présente des données

linéaires qu'entre 25 et 100 µg d'IgG3, selon les recommandations de la documentation de l'autre fabricant. La raison pour laquelle la courbe n'était pas linéaire pour la plage de chargement plus élevée était que la colonne ne pouvait pas retenir tout le matériau dans la plage supérieure de chargement. En fait, pour un chargement de 200 µg, la colonne à protéine G de l'autre fabricant avait un pic de volume mort pour les AcM (une partie des IgG3 n'était pas retenue sur la colonne et était éluée dans la fraction non retenue), comme le montre la figure 4B.

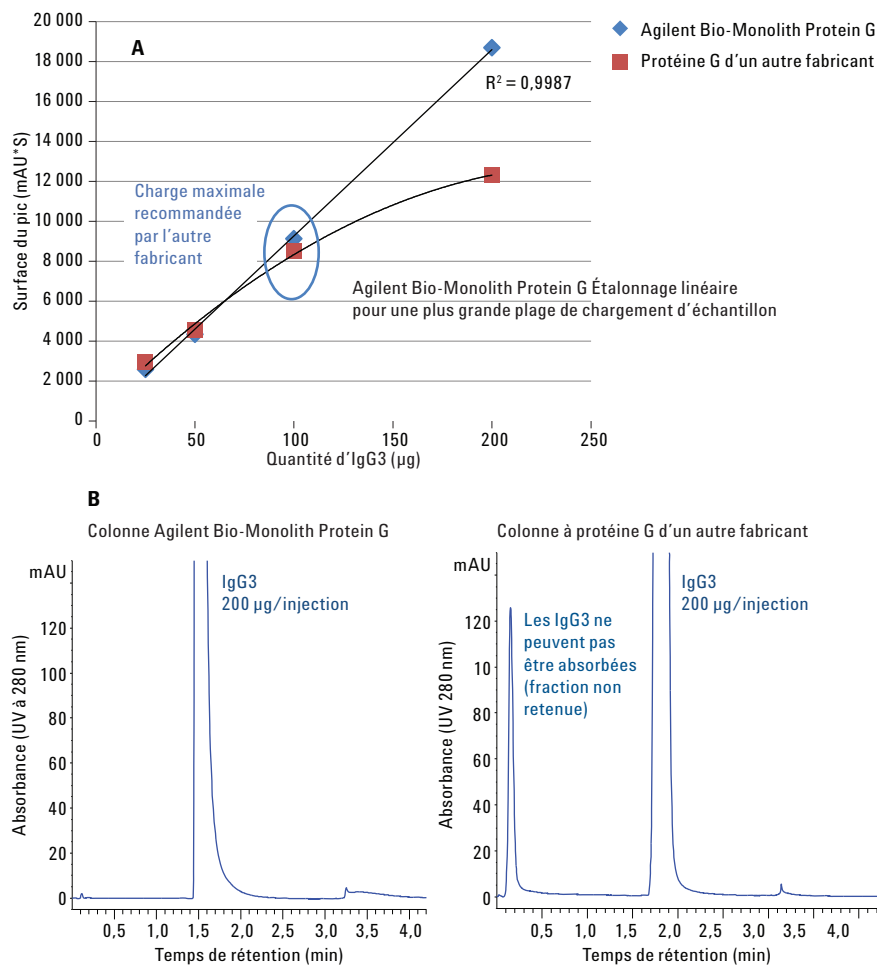


Figure 4. A) Comparaison de la linéarité de la plage de chargement entre la colonne Agilent Bio-Monolith Protein G et une colonne à protéine G d'un autre fabricant. B) Pour un chargement de 200 µL, la colonne de l'autre fabricant présente une fraction non retenue qui n'est pas observée avec la colonne Bio-Monolith Protein G. La colonne Bio-Monolith Protein G a par conséquent une plus grande capacité de chargement.

Séparations rapides

La Bio-Monolith Protein G est conçue pour des séparations rapides. Sa capacité de rétention et d'éluion rapides des AcM à différents débits est démontrée avec des IgG3 sur la figure 5, pour des débits de 1,0, 1,5, 2,0 et 2,5 mL/min (la colonne peut fonctionner à un débit allant jusqu'à 3,0 mL/min, données non

présentées). Le tableau 2 montre les débits et les gradients opérationnels. L'augmentation du débit a réduit le temps de rétention du pic d'IgG3. Cependant, les surfaces de pic relatives étaient semblables pour les différents débits. Ceci indique que la colonne permet d'avoir un recouvrement similaire pour les différents débits (Tableau 3).

Tableau 2. Débits et gradients opérationnels utilisés pour évaluer la capacité de rétention de la colonne Agilent Bio-Monolith Protein G.

Temps (min)	%A	%B
1,0 mL/min		
0	100	0
0,4	100	0
0,5	0	100
1,7	0	100
1,8	100	0
4,2	100	0
1,5 mL/min		
0	100	0
0,3	100	0
0,4	0	100
1,3	0	100
1,4	100	0
3,0	100	0
2,0 mL/min		
0	100	0
0,2	100	0
0,3	0	110
0,9	0	100
1,0	100	0
2,1	100	0
2,5 mL/min		
0	100	0
0,1	100	0
0,3	0	100
0,7	0	100
0,8	100	0
1,7	100	0

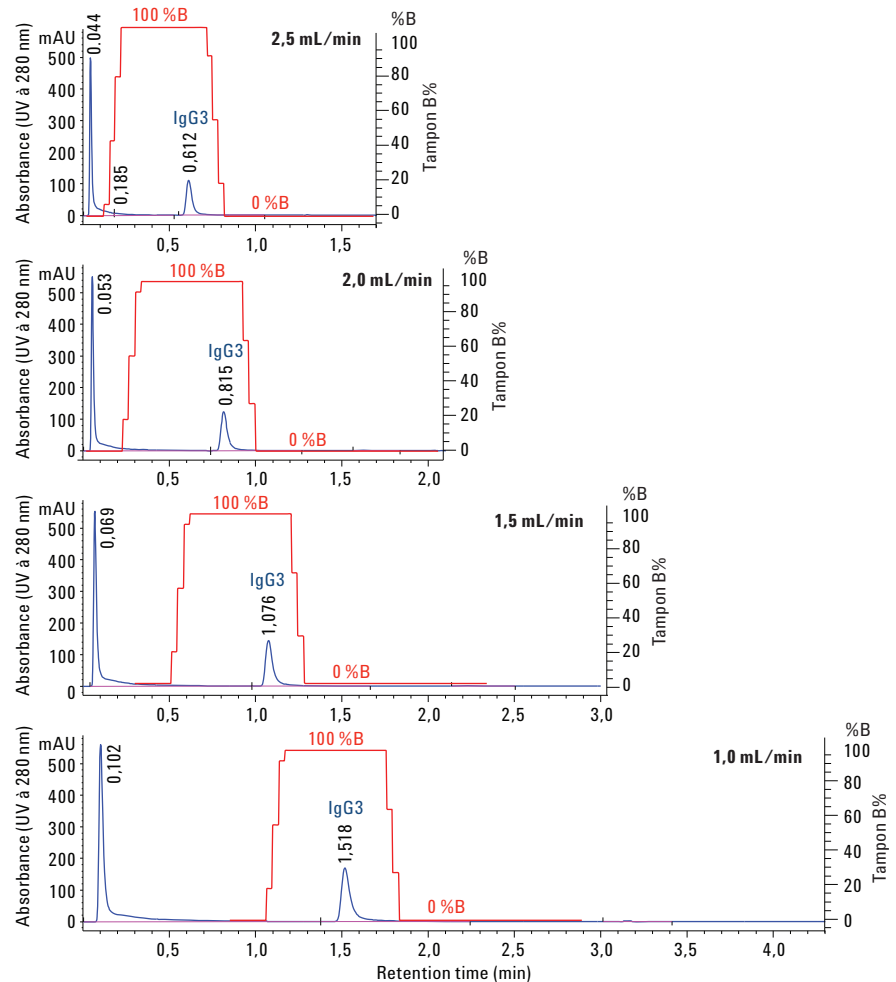


Figure 5. Liaison d'IgG3 sur la colonne Agilent Bio-Monolith Protein G évaluée pour différents débits. Injection de 5 μ L (2,0 mg/mL d'IgG3 mélangés avec 5 mg/mL de protéines de cellules hôtes CHO-).

Tableau 3 : La colonne Agilent Bio-Monolith Protein G donne des pourcentages relatifs de protéines non retenues et des pics d'IgG3 semblables pour les différents débits.

Débit (mL/min)	Surface totale non retenues (mAU*S)	Surface du pic de protéines (mAU*S)	Surface relative du pic de protéines non retenues (%)	Surface du pic d'IgG3 (mAU*S)	Surface relative du pic d'IgG3 (%)
2,5	798	521	65,3	277	34,7
2,0	1 056	709	67,1	347	32,9
1,5	1 390	932	67,1	458	32,9
1,0	2 069	1 392	67,3	677	32,7

La figure 6 montre la courbe de linéarité pour la contrepression de la colonne. Lorsque la colonne a été testée à intervalles de 0,5 mL/min, en augmentant de 1 à 2,5 mL/min, la contrepression a augmenté de manière linéaire. La colonne présente une contrepression maximale de 150 bar. 1,0 mL/min est un débit de séparation type sur la colonne Bio-Monolith Protein G. Lorsque le débit de l'instrument a été ajusté sur 1,0 mL/min, la contrepression de la colonne était de ~24 bar. Lorsque le débit a été augmenté à 2,5 mL/min, la contrepression de la colonne est montée à ~60 bar. L'effet sur la liaison des IgG sur la colonne était minime à la contrepression maximale, comme indiqué plus tôt.

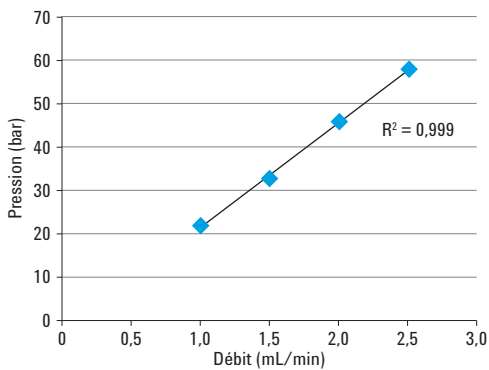


Figure 6. Débit par rapport à la contrepression. La contrepression de la colonne Agilent Bio-Monolith Protein G augmente de manière linéaire lorsque le débit augmente aussi de manière linéaire.

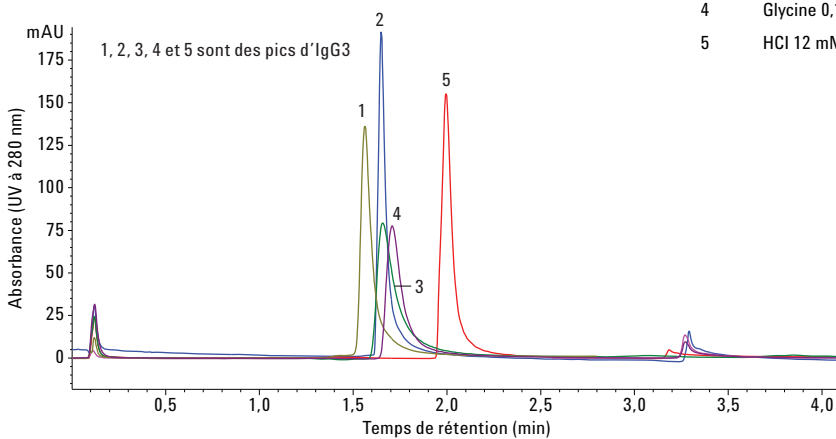


Figure 7. Pic d'IgG3 humanisées éluées de la colonne Agilent Bio-Monolith Protein G par différents éluants acides.

Compatibilité de différents tampons d'éluion

La figure 7 montre la compatibilité avec plusieurs tampons d'éluion pour la colonne Bio-Monolith Protein G. Le pic d'IgG3 peut être élué par différents éluants acides. Le tableau 4 présente la puissance et le pH des éluants acides. Ces éluants étaient capables d'éluier les IgG3 de la colonne avec des temps de rétention similaires (des données semblables ont été observées pour d'autres IgG), excepté dans le cas de HCl 12 mM. La rétention du pic d'IgG3 était plus longue, comparée au temps de rétention du pic d'IgG3 élué avec d'autres tampons d'éluion. Lorsque la concentration de ce tampon d'éluion a été augmentée à 0,1 M, il a acquis suffisamment de puissance pour éluier les IgG3 avec des temps de rétention similaires à ceux des autres tampons d'éluion.

Il est également bon de noter que chaque éluant acide a généré un pic d'IgG3 de largeur quelque peu différente avec un facteur de traînée légèrement différent. Ceci indiquerait que selon l'IgG, les éluants acides et leur puissance auront un effet différent sur le temps de rétention, la largeur de pic et le facteur de traînée. Par conséquent, selon l'IgG et ce qui est attendu des données, les éluants acides et leur concentration doivent être établis de manière expérimentale.

Tableau 4 : Compatibilité et effet de différents éluants acides sur les IgG.

Pic no.	Acide	PW	5 % TF	Pression (bar) à 1 mL/min
1	Acide citrique 0,1 M, pH 2,0	0,058	1,68	24
2	HCl 0,1 M	0,053	1,58	24
3	Acide acétique à 5 %	0,071	1,85	24
4	Glycine 0,1 M	0,075	1,82	24
5	HCl 12 mM	0,068	1,69	24

Récupération de la performance de la colonne après nettoyage in situ

La figure 8 montre que la colonne Bio-Monolith Protein G peut retrouver sa performance optimale après un nettoyage in situ (clean-in-place ou CIP). Des IgG3 ont été injectées sur la colonne après plus de 1 000 injections de surnageants et de lysats de cellules CHO dopées avec des IgG3. Les données montrent que lorsque la colonne était sale, la largeur du pic d'IgG3 augmentait et sa hauteur diminuait (comparez les figures 8A et 8B avant et après le nettoyage in situ). Les

données montrent également qu'une partie des IgG3 n'a pas été retenue sur la colonne et a été éluée dans le pic de fraction non retenue (Figure 8, Panneau A). Une fois que la colonne a été nettoyée, elle a retrouvé sa performance optimale et les IgG3 ont été complètement retenues (voir la figure 8B). La figure 9 montre les données de comparaison de la linéarité d'une large plage dynamique de chargement avant et après un nettoyage adéquat de la colonne. Les aires de pics d'IgG3 avant et après le nettoyage in situ étaient tout à fait comparables et très linéaires. Les données indiquaient que la colonne était effectivement nettoyée et compatible avec le protocole de nettoyage décrit dans le tableau 5.

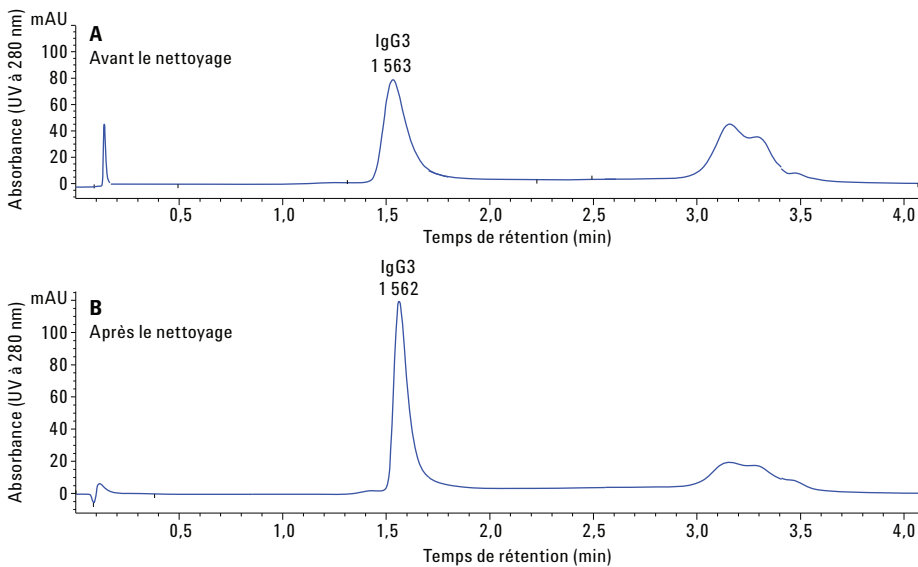


Figure 8. A) Colonne Agilent Bio-Monolith Protein G avec injection d'IgG3 après plus de 1 000 injections. La colonne était sale. B) La colonne a été nettoyée et a retrouvé sa performance optimale.

Tableau 5. Protocole de nettoyage in situ pour la colonne Agilent Bio-Monolith Protein G. Afin d'éviter la pénétration de contaminants dans le reste de la colonne, la première étape du protocole doit se faire en inversant le sens du flux- à un débit de 0,2 à 0,5 mL/min.

Étape	Solution	Volume de nettoyage de la colonne (CV)
1	0,1 M NaOH	10 à 20
2	Eau déionisée	10 à 20
3	Tampon de phosphate de sodium 0,5 mM, pH 7,4	10 à 20
4	Ré-équilibrer la colonne avec du tampon de liaison	50

Dans certains cas, la simple régénération de la colonne monolithique ne suffit pas. Certaines molécules d'échantillons peuvent ne pas être éluées complètement de la colonne ou peuvent précipiter dans la colonne. Cette accumulation de contaminants dans la colonne peut causer une perte de résolution et de capacité de liaison, une augmentation de la contrepression ou un blocage complet. Un protocole spécifique de nettoyage in situ doit être élaboré en fonction du type de contaminants présents dans l'échantillon. D'autres suggestions de régénération sont présentées dans le guide de l'utilisateur.

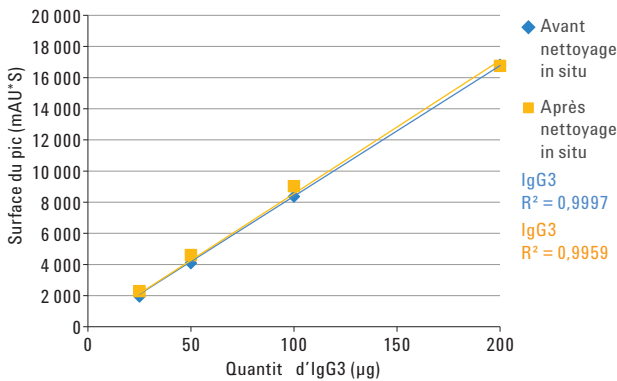


Figure 9. Comparaison de la linéarité que présente la colonne Agilent Bio-Monolith Protein G pour une grande plage de chargement dynamique avant et après nettoyage in situ.

Durée de vie et reproductibilité

Les figures 10 et 11 présentent les résultats de 1 000 injections consécutives d'IgG3 et de surnageant plus lysat de cellules CHO sur une colonne Bio-Monolith Protein G. La colonne a fait l'objet de 40 injections de surnageant plus lysat de cellules CHO, puis de 10 injections d'IgG3. Cette séquence a été effectuée pour 1 000 injections en continu sans arrêt pour nettoyage. L'intégrité du temps de rétention des pics et de l'aire des pics (Figure 9) ainsi que le facteur de traînée des pics et la largeur des pics d'IgG3 (Figure 10) n'a pratiquement pas changé sans compromettre la performance de la colonne en termes de liaison, de séparation et de capacité d'éluion.

La figure 11 montre que la largeur et le facteur de traînée des pics ont eu un impact minime au cours de l'étude sur les 1 000 injections.

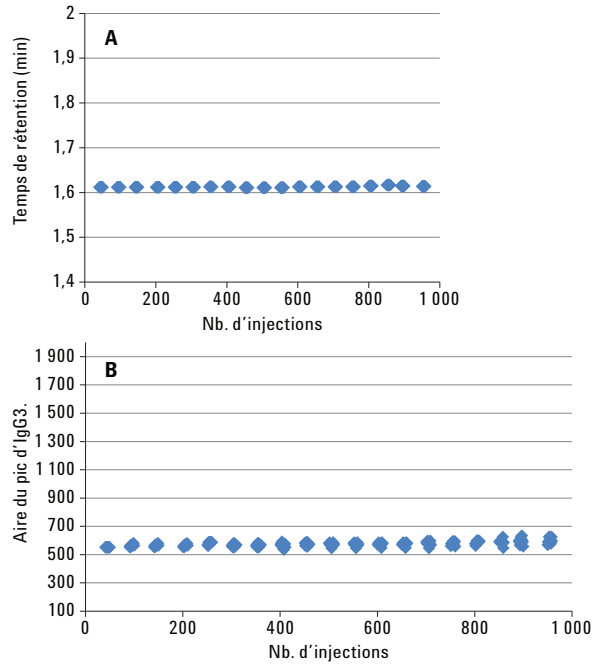


Figure 10. Reproductibilité de la colonne Agilent Bio-Monolith Protein G sur 1 000 injections sans nettoyage in situ. A) Temps de rétention. B) Aire de pic d'IgG3. Dix injections ont été enregistrées après 40 injections, et plus de 1 000 injections ont été effectuées. Le temps de rétention et la largeur de pic des IgG3 n'ont pas changé (écart type = 2,5, n = 100).

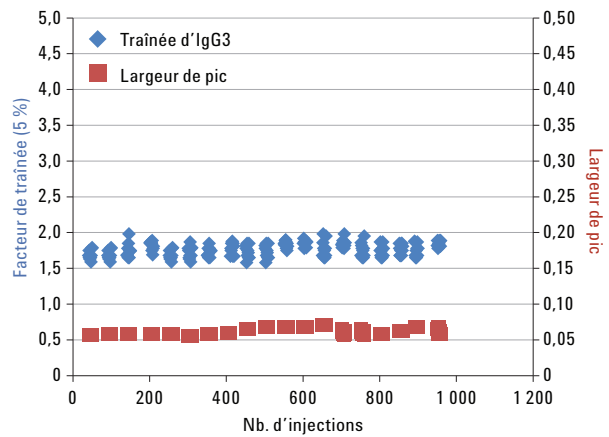


Figure 11. Régularité de la largeur des pics et du facteur de traînée des pics d'IgG3 pour 1 000 injections sur la colonne Agilent Bio-Monolith Protein G.

Conclusions

La colonne Agilent Bio-Monolith Protein G présente une forte affinité pour les sous-classes d'anticorps monoclonaux. Il est évident que la colonne peut retenir et mesurer de manière quantitative les AcM de surnageants sur une large plage linéaire de chargement. Les colonnes peuvent être utilisées efficacement pour mesurer la quantité d'anticorps monoclonaux en utilisant des débits différents sans sacrifier les données. La contrepression opérationnelle était significativement faible, ce qui montre que la colonne Bio-Monolith Protein G peut fonctionner avec des instruments de <HPLC opérant à 600 bar. La flexibilité de la colonne avec les différents éluants acides permet une conception expérimentale simple et facile. Les colonnes Agilent Bio-Monolith Protein A et Protein G sont donc complémentaires, la protéine G ayant une affinité pour les AcM qui ne se lient pas à la protéine A et *vice versa*. Ces colonnes offrent plus d'options de mesure rapide du titre d'anticorps et ce, pour un plus grand éventail de variants d'AcM.

Références

1. Richman, D. D.; Cleveland, P. H.; Oxman, M. N.; Johnson, K. M. The binding of 1. Staphylococci protein A by the sera of different animal species. *J. Immunol.* **1982**, *128*, 2300-2305.
2. Frank, M. B. Antibody Binding to Protein A and Protein G beads; 5. In *Molecular Biology Protocols*; Frank, M. B., Ed.; Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA, **1997**.
3. Anon. Kit Cellytic B Plus. Références catalogue CB0500 et CB0050. Bulletin technique. Sigma-Aldrich, Corp. St. Louis, MO, USA.

Pour plus d'informations

Ces données représentent des résultats types. Pour plus d'informations sur nos produits et services, consultez notre site Internet sur www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Destiné à la recherche uniquement. Ne pas utiliser à des fins diagnostiques.

Agilent décline toute responsabilité en cas d'erreurs dans le présent document, ainsi qu'en cas de dommages fortuits ou consécutifs à la fourniture, aux performances ou à l'utilisation de ce matériel.

Les informations, descriptions et spécifications de cette publication peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2015, 2017, 2018
Imprimé aux États-Unis, le 6 juillet 2018
5991-6094FR



Agilent Technologies