

P-7 抗 E tag 抗体カラムとキャピラリー等電点電気泳動のオンライン結合

○長井俊彦、志村清仁

福島医大・医・化学

【目的】我々はすでに金属キレートアフィニティーと等電点分離のオンライン結合キャピラリーを開発し、報告した。今回、さらに高い特異性が期待できる抗体アフィニティーと等電点電気泳動のオンライン結合を目指した。

【方法】内径 50 μm 、長さ 50 cm の熔融シリカキャピラリーの入口側 20 cm の内壁にビオチンを結合し、出口側 30 cm の内壁に等電点電気泳動に適した中性ポリマーであるポリジメチルアクリルアミド(PDMA)を結合させた。ストレプトアビジンを介してビオチン化抗 E tag 抗体を結合させることにより入口側内壁に抗体カラムを構築し、オンライン結合キャピラリーとした。

試料としては、テトラメチルローダミン標識抗インスリン組換え Fab (E tag 付) を用いた。

分析には BECKMAN/ COULTER 社製 P/ACE システム MDQ を使用し、532 nm レーザーで励起してローダミン用フィルターセットで蛍光を検出した。

【結果と考察】作製したオンライン結合キャピラリーを PBS で平衡化し、E tag 付 Fab 0.2 fmol を注入すると、

Fab はキャピラリーに結合した。PBS で洗浄後、100 mM リン酸を送液すると Fab の溶出が観察された。今のところ結合容量は金属キレートキャピラリーに比べて高くなく、結合容量の向上が望まれる。またアフィニティークロマトグラフィーの繰り返しにより結合容量の低下が認められたが、ビオチン化抗 E tag 抗体の再添加により結合容量の回復が見られた。これらの結果より、ストレプトアビジン固定化量の増大が望まれた。

Fab を結合した抗体カラム部分に 100 mM リン酸を満たして、そのまま等電点電気泳動を実施したところ、蛍光標識 Fab を等電点分離ピークとして検出できた。等電点マーカーとの相対位置から、検出ピークが試料として用いた Fab であることを確認した。

【結論】抗 E tag 抗体カラムクロマトグラフィーとキャピラリー等電点電気泳動のオンライン結合が可能なが明らかとなった。本法の性能をさらに高めることにより、生体試料に含まれる特定のタンパク質の翻訳後修飾パターンを容易に知ることができるようになるだろう。