

シームレスなタンパク質精製と評価

鈴木 里沙

ユーザーベネフィット

- ◆ 分取後の目的ピークを選ぶだけで自動的に再注入され分析できます。
- ◆ 搭載したカラムスイッチングバルブにより、精製や分析に合わせたカラムを自動切換できます。
- ◆ 培養条件の最適化など、多数のサンプルを比較したい時などにもとても便利です。

■はじめに

タンパク質の多量体形成確認など分子量分布解析の方法の1つに、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) があります。SECでは、サイズの小さな分子がカラムの充てん剤の細孔内に入り込みながら流れ、サイズの大きな分子は細孔内に入り込めずにそのまま流れていきます。そのため、サイズが大きな分子から小さな分子の順に溶出されます。従って、異なるタンパク質でも、大きさが似たものは溶出速度が同程度となり、同一ピーク内に含まれ識別できません。分析目的タンパク質が血中や細胞培養上清中にある場合は、SEC分析の前に目的タンパク質を精製する必要があります。本稿では、目的タンパク質を精製後、そこで得られたピークのフラクションをSECで分析する二つの段階を、リキッドハンドラーを用いてシームレスに分析する手法をご紹介します。

■リキッドハンドラーを用いたシームレス化

リキッドハンドラーLH-40は、オートサンプラーおよびフラクションコレクターが一体化したユニットです。先の精製で分取したフラクションを、フラクションコレクターからオートサンプラーに移す作業が不要で、そのまま次の分析サンプルとして再注入することが可能です。図1, 2の流路を組み、メソッドとフラクションを指定するだけで、アフィニティー精製で得られたフラクションをSECでタンパク質のおおまかなサイズを評価するという工程が実現できます。今回はProminence™ イナート LCシステムに組み込み、血漿中のIgGを分析しました。

■測定試料と測定条件

移動相Aで5倍に希釈した、市販の正常ヒト血漿EDTA-2Na 5 mLを15 mLチューブに用意し、リキッドハンドラーのラックにセットしました。これを表1の条件でIgG精製用カラムを用いてアフィニティー精製を行い、リキッドハンドラーにセットした96ディープウェルプレートに分取しました。ここで得られたピークトップ部分のフラクション100 μLを表2の条件でSEC分析を行いました。

表1 アフィニティーカラム分析条件

Column	: HiTrap™ rProtein A FF (1 mL, Cytiva社製)
Mobile phase A	: 10 mmol/L (sodium) phosphate buffer pH 6.9
Mobile phase B	: 100 mmol/L (sodium) citrate buffer pH 4.0
Time Program (B. Conc.)	: 0% (0 - 10 min) → 100% (10.01 - 20 min) → 0% (20.01 - 35 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 15 °C
Injection Volume	: 5 mL
Detection	: SPD-20A (280 nm)
Flow Cell	: Inert flow cell

表2 SEC分析条件

Column	: Shim-Pack™ Bio Diol-300 ^{*1} (300 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Guard Column	: Shim-Pack Bio Diol-300 (G) ^{*2} (30 mm × 8.0 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase A	: 10 mmol/L (sodium) phosphate buffer pH 6.9
Flow rate	: 0.5 mL/min
Column Temp.	: 15 °C
Injection Volume	: 100 μL
Detection	: SPD-20A (280 nm)
Flow Cell	: Inert flow cell

*1 : P/N 227-31010-04, *2 : P/N 227-31010-06

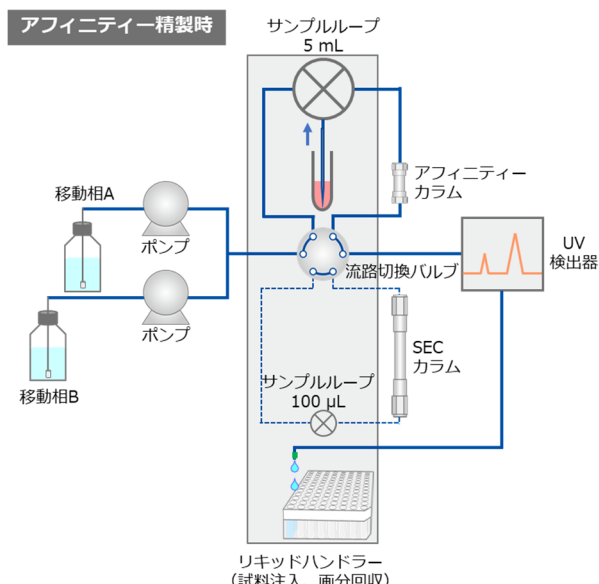


図1 アフィニティー精製時の流路図

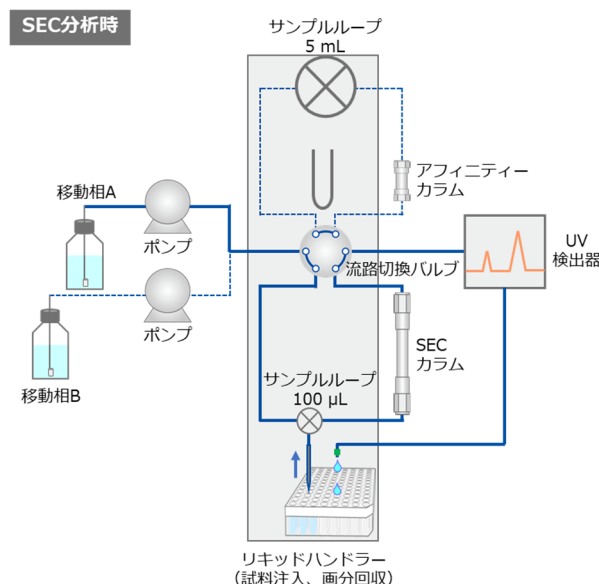


図2 SEC分析時の流路図

■ アフィニティー精製の結果

IgG精製用カラムを移動相Aで平衡化した後、希釈したヒト血漿試料を5 mLロードし、カラムに吸着させました。その後移動相Aを流すことで非特異的に吸着した成分を洗い流しました(図3)。次に移動相Bを流し、IgGを溶出させました(図4)。

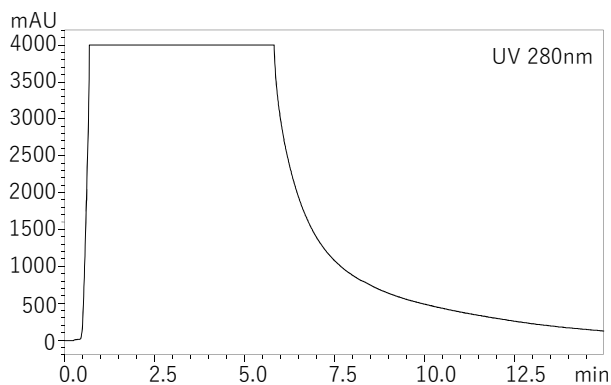


図3 アフィニティー精製時Bindingのクロマトグラム

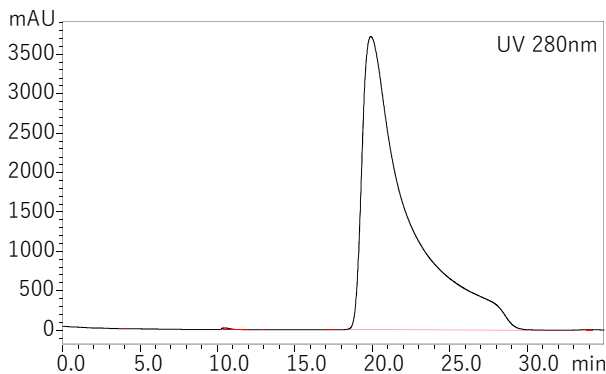


図4 アフィニティー精製時Elutionのクロマトグラム

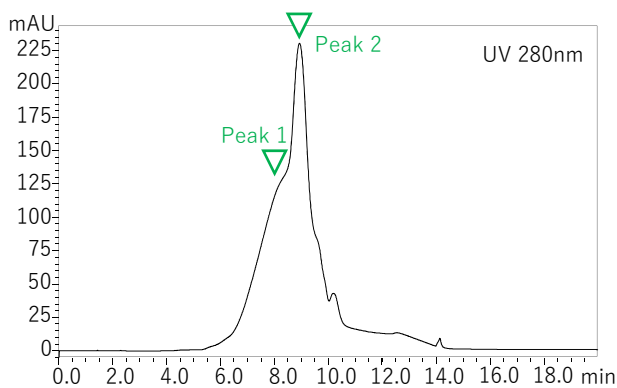


図5 SEC分析のクロマトグラム

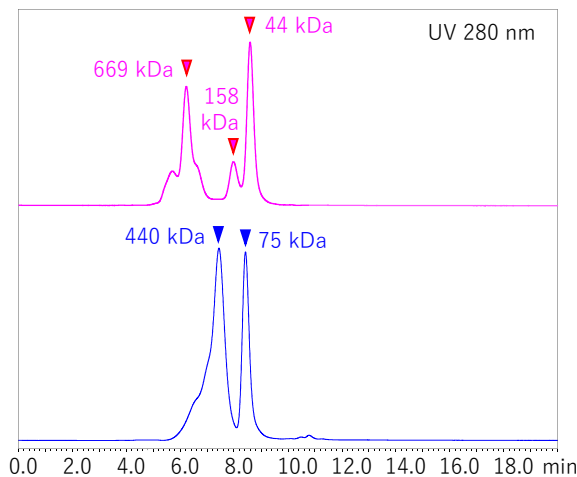


図6 SEC分析タンパク質標準品のクロマトグラム

■ SEC分析の結果

1段階目のアフィニティー精製で溶出されたピークトップ部分の溶液を100 μ L再注入し、2段階目のSEC分析を行いました。SEC分析では、メインのピーク (Peak 2) の前にブロードなピーク (Peak 1) が得られました(図5)。SEC分析で得られたピークからタンパク質分子量をおおまかに見積もるために、Thyroglobulin (669 kDa)、Aldolase (158 kDa)、Ovalbumin (44 kDa) の混合液と、Ferritin (440 kDa) とConalbumin (75 kDa) 混合液をSEC分析しました(図6)。これらのタンパク質標準溶液の溶出時間から、ヒト血漿中から精製したIgGは、ほとんどが単量体を形成していたと考えられます。

■ SDS-PAGE解析結果

アフィニティー精製およびSEC分析ではすべてのフラクションを96ディープウェルプレートに分取しました。これらの得られたピークについて、該当するウェルのサンプルをSDS-PAGE (非還元/還元) 解析に用いました。アフィニティー精製で得られたピークからも、SEC分析のPeak 1およびPeak 2からも、ヒトIgG標品と同等の位置にバンドが検出されました(図7)。SEC分析にて得られたPeak 1とPeak 2はどちらもIgGであり、血中には構造の類似したIgGの4つのサブクラスが存在しているため、それらの微妙な大きさや構造の違いによりブロードなピークになったと考えられます。

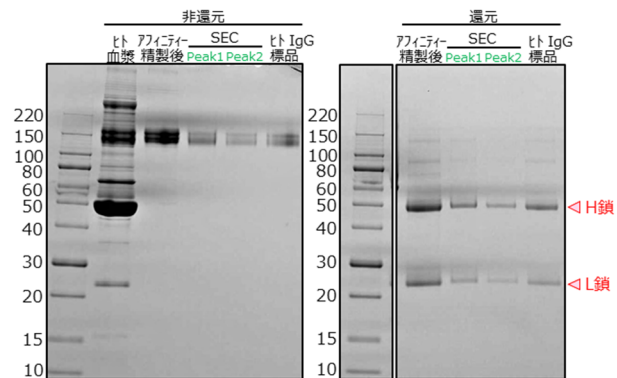


図7 SDS-PAGE 解析結果

■ まとめ

LCシステムにリキッドハンドラーを組み込むことで、サンプル溶液をセットするだけで精製のみならず、分取したフラクションの再分析までシームレスに行う系を確立しました。ターゲットが決まっているルーチンワークの場合、目的フラクションだけを再分析することも可能です。さらにカラムスイッチングバルブの追加により、カラムを増やして精製条件の検討や多段階精製を行うこともできます。また、96ウェルプレートに分取することで、SDS-PAGEやELISA等その後の様々な分析にそのままお使いいただけます。

ProminenceおよびShim-packは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。HiTrapは、Cytiva Bioprocess R&D AB Corporationの商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00118-JP 初版発行：2021年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691