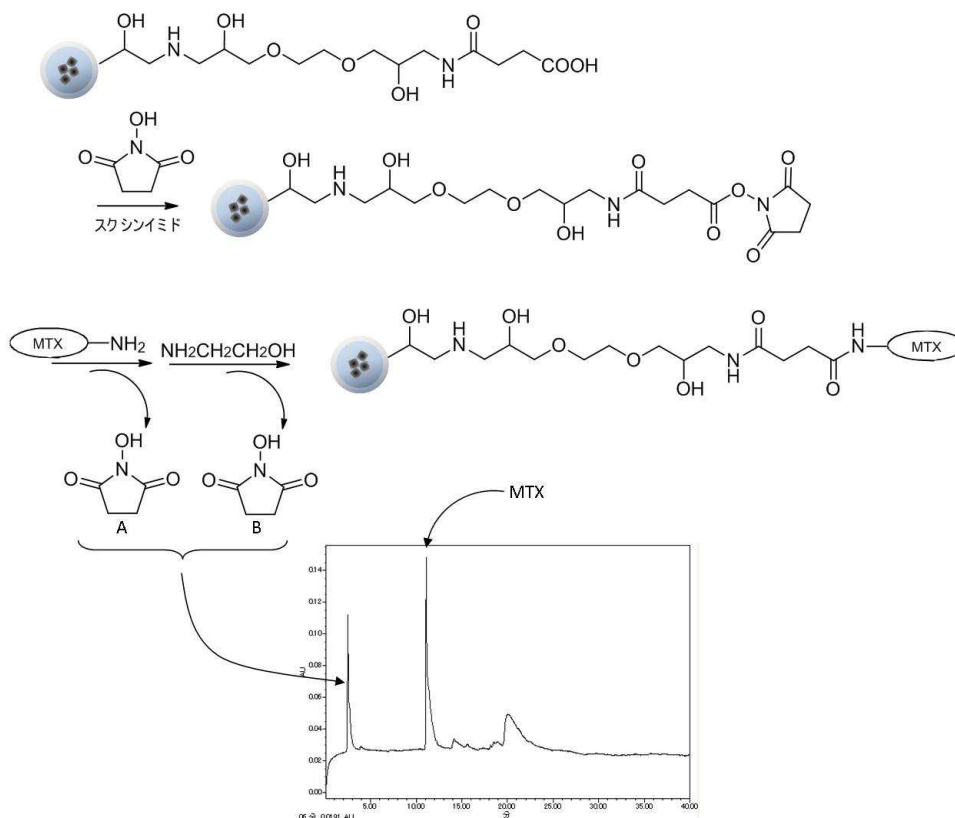


HPLC(高速液体クロマトグラフィー)によるリガンド固定化量の定量

薬剤(リガンド)の標的スタンパク質のスクリーニングにおいて、ビーズへのリガンドの固定化量を定量することが必要となる場合があります。そこで、本実験プロトコールでは、プロトコール008のCOOHビーズ、014のNHSビーズへのNH₂基を有するリガンドの固定化量の定量方法を示します。



1. 準備するもの

1.1NHSビーズへの固定化上清A、B(プロトコール008、014参照)

- ・上清A(リガンド固定化時に外れたNHS含有溶液)
- ・上清B(マスキング時に外れたNHS含有溶液)

1.2試薬

- ・N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS) 分子量 115.09
- ・N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)
- ・酢酸アンモニウム 分子量 77.08
- ・酢酸 分子量 60.05
- ・アセトニトリル(高速液体クロマトグラフィー用)

1.3機器等

- ・フィルターユニットSteritop (MILLIPORE SCGPT05RE)
- ・マイクロチューブフィルターUltrafree-MC (MILLIPORE UFC30LG00)
- ・高速液体クロマトグラフィー装置(HPLC)(Waters 2695, 2998)
- ・Symmetry カラム 5 μ m C18 4.6 \times 250mm ステンレス (Waters WAT054275)
- ・微量高速冷却遠心分離機

実験プロトコール 201

2. 方法

2.1 溶液調製

- 0.2M 酢酸アンモニウム溶液調製
 - 50mlチューブへ酢酸0.605gをとり、超純水で50mlまでメスアップする。(0.2M酢酸)
 - 500mlビーカーへ酢酸アンモニウムを7.708gとり、超純水を加えて約400mlまでメスアップする。
 - pHが5.70になるように0.2M 酢酸を加え調整する。(40ml位)
 - 500mlメスシリンダーへ移し、超純水で500mlまでメスアップする。
 - フィルターろ過(フィルターユニット使用)後、4°C保存する。
- 10mM 酢酸アンモニウム溶液作製:移動相
0.2M酢酸アンモニウム溶液を50mlとり、メスシリンダーで1lまでメスアップする。

3) スクシンイミド(NHS)検量線作製

100mM : HOSuの固定化に使用した1M品 100 μ l + DMF 900 μ l
10mM : 100mM 100 μ l + DMF 900 μ l
1mM : 10mM 100 μ l + DMF 900 μ l
100 μ M : 1mM 100 μ l + DMF 900 μ l
10 μ M : 100 μ M 100 μ l + DMF 900 μ l
0M : DMFのみ

※ 検量線としては10mM以下のみを使用する。

4) サンプル希釈バッファー作製

グラジエントのスタート時のバッファー組成で溶液を作製する。
バッファー : 10mM酢酸アンモニウム(47ml)(全体の94%)
+ アセトニトリル (3ml)(全体の6%)

2.2 サンプル調製

- サンプル(検量線、上清A、B)20 μ lとサンプル希釈バッファー180 μ lを混合する。
- HPLCへのビーズの混入を防ぐためにフィルターろ過を行う。(200 μ lずつ:マイクロチューブフィルター使用、遠心分離 5000 \times g、1min)
- ろ液をバイアルへ150 μ lずつ入れ、フタをしてHPLCのオートサンプラーへセットする。

2.3 装置の準備とプログラムの作成

- 装置(本体、カラムオープン、パソコン)の電源を入れ、流路を洗浄する。
- カラムをセットする。(溶媒を流しながら行う、矢印の方向に気をつける、液が出てくるのを確認する。)
- 10mM 酢酸アンモニウム 94%、アセトニトリル 6%の条件でカラム内のバッファー置換を行う。(圧が安定化するまで待つ:1350psi前後)
- プログラムを作成する。
↓ HPLC制御ソフト(Empower)起動
↓ ウィザード設定(分析するサンプルの容量50 μ l、サンプル数等)
↓ メソッド設定(グラジエント条件:図1、カラム40°C)

メソッド:グラジエント40min(洗浄工程含む)

時間(分)	流速(ml/min)	10mM酢酸アンモニウム(%)	アセトニトリル(%)	曲線
-	1	94	6	-
10	1	60	40	6
12	1	20	80	6
20	1	20	80	6
22	1	94	6	6
40	1	94	6	6

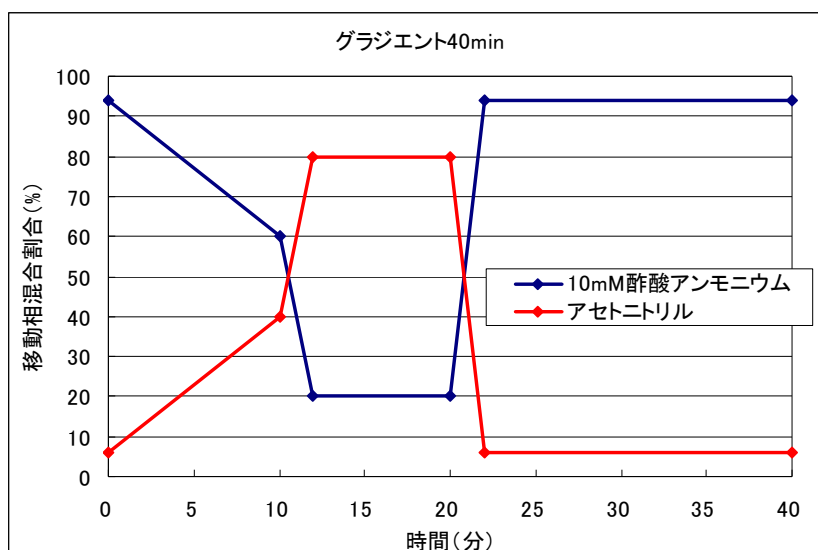


図1. グラジエント40分の酢酸アンモニウム溶液混合割合の推移

2.4 分析

- 1) 設定したウィザード、メソッドを選択し、測定をスタートさせる。
- 2) 終了後、260nmにて解析、ピークの面積から定量値へ変換する。
- 3) アセトニトリル100%にて1時間カラム洗浄(1ml/min)を行う。

2.5 データ解析

- 1) 上清Aのサンプルのピーク面積からリガンド固定化時に遊離したスクシンイミド量を算出する。
- 2) 1からリガンド仕込み量0mM(リガンド未固定)時のスクシンイミド量をバックグラウンドとして差し引きし、実際のリガンド固定化量(μM)とする。(mol/mgへ変換)
- 3) 上清Bのサンプルピーク面積からマスキング時に遊離したスクシンイミド量を算出する。
- 4) 3からマスキングなしの上清Bサンプルのスクシンイミド量をバックグラウンドとして差し引きし、リガンドが固定化されなかったカルボキシル基量(μM)とする。(mol/mgへ変換)
- 5) 2のリガンド固定化量(A)と4のリガンドが固定化されなかったカルボキシル基量(B)を足してカルボキシル化ビーズの表面カルボキシル基量とする。(mol/mgへ変換)

実験プロトコール 201

3. 補足(実際の測定データ:例 MTX)

3.1 HPLCピーク

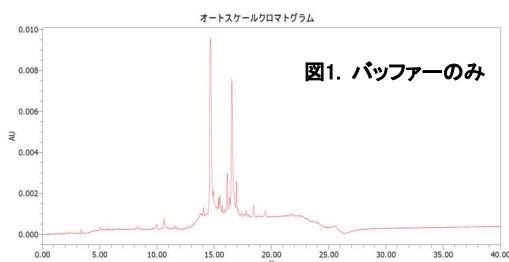


図1. バッファーのみ

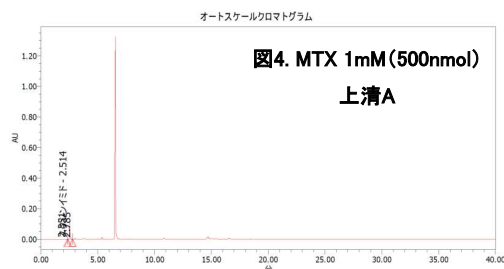


図4. MTX 1mM (500nmol)
上清A

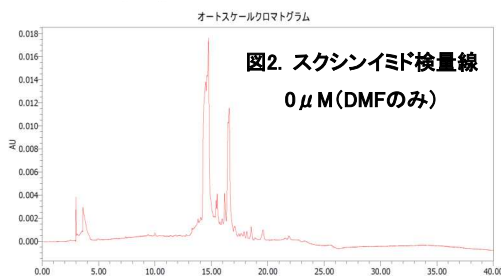


図2. スクシンイミド検量線
0 μ M (DMFのみ)



図5. MTX 0nmol 上清B
(マスキングなし)

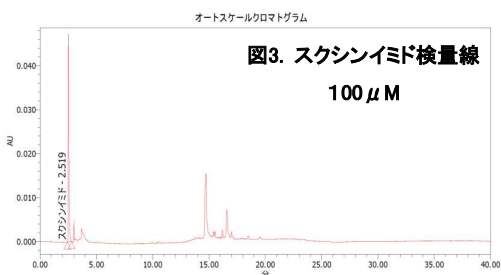


図3. スクシンイミド検量線
100 μ M

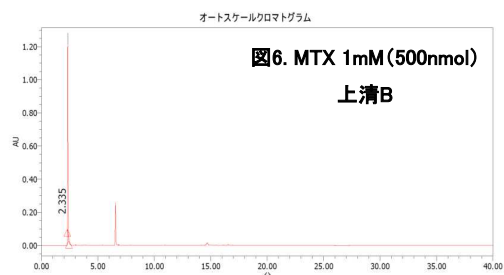


図6. MTX 1mM (500nmol)
上清B

[HPLC分析: サンプル20 μ l + バッファー180 μ l]

図1. サンプル=バッファー

10mM 酢酸アンモニウム: アセトニトリル = 94:6 で混合したバッファーのみを分析

図2. サンプル=スクシンイミド検量線 0 μ M

MTX固定化時、マスキング時に遊離するスクシンイミドはDMFへ溶けているために検量線もDMFで作製する。スクシンイミド0 μ MはDMFのみとなる。DMFのみを分析。3分以前はピークが無い。

図3. サンプル=スクシンイミド検量線 100 μ M

スクシンイミド100 μ Mを分析。2.519分にスクシンイミドのピークが見られる。

図4. サンプル= MTX 1mM 上清A

MTX-NH₂仕込み量1mM時の上清。スクシンイミドのピークが2.514分に見られる。6.5分付近のピークはMTXのもの。スクシンイミドのピーク面積よりMTX-NH₂固定化量を算出する。

図5. サンプル= MTX 0mM 上清B (マスキングなし)

MTX-NH₂仕込み量0mM時かつマスキングをしない(アミノエタノールの代わりにDMF)場合の上清(B)。バックグラウンドのスクシンイミドのピークが2.514分に見られる。

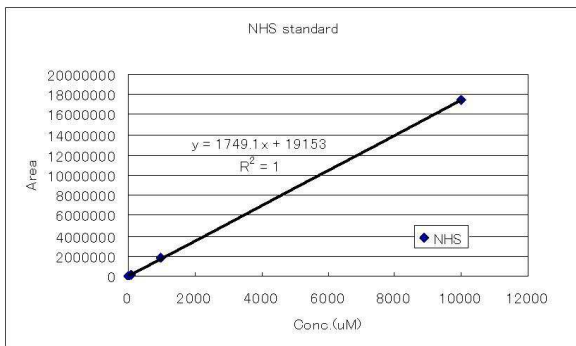
図6. サンプル= MTX 1mM 上清B

MTX-NH₂仕込み量1mMでマスキング時の上清(B)。2.335分にスクシンイミドのピークが見られる。検量線、上清A、上清B(マスキングなし)のスクシンイミドのピークに比べ、ピーク位置が少し前にシフトしている。原因は、マスキング剤として使用しているアミノエタノールによるものである。このピークの面積をスクシンイミドの検量線へ当てはめ、マスキング時に遊離したスクシンイミド量を算出する。

実験プロトコール 201

3.2 HPLC定量値

	スクシニミド濃度	面積	ピーク位置(分)
検量線標準液	0 μ M	0	-
	10 μ M	19368	2.523
	100 μ M	180527	2.519
	1000 μ M	1823563	2.515
	10000 μ M	17504457	2.513



[参考]
 検量線: $y=1800x$ 位

(注)
 スクシニミドピーク位置
 検量線、上清A : 2.510~2.540
 上清B : 2.330~2.340 (シフトする)

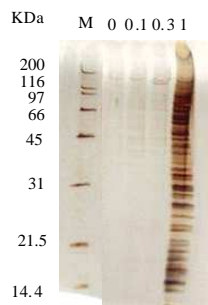
	Conc. of chemical compound at immobilization (mM)	MTX-NH2 (nmol/500ul)	NHS sup quantitative conc. with HPLC (uM)	Succinimide value of 200ul (nmol)	Background removal (nmol)	Immobilized MTX-NH2 at 1mg of beads (nmol/mg)	COOH or NHS value (nmol/mg)	Average (nmol/mg)
259NHS Sup A	0	0	79	15.9	0.0	0.0	201.5	211.7
	0.1	50	83	16.6	0.8	0.8	216.8	
	0.3	150	99	19.9	4.0	4.0	212.7	
	1	500	136	27.2	11.3	11.3	215.9	
259NHS Sup B	0		1008	201.5				
	0.1		1080	216.0				
	0.3		1044	208.7				
	1		1023	204.6				



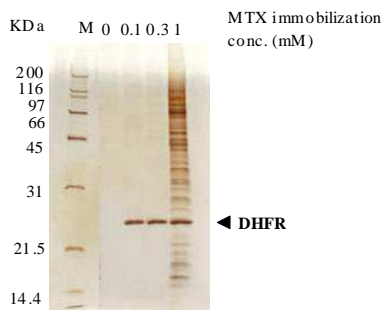
200ul = 1mg of beads

3.3 MTX固定化ビーズによるアフィニティ精製

Salt Elution



Boil Elution



Condition	
Beads	: COOH beads(S259PSSNENCOOH)
Amount of beads	: 0.5mg
Binding, Washing buffer	: 150 mM KCl(200 μ l)
Elution buffer	: 1M KCl(30 μ l)
Protein extract	: HeLa cytoplasmic compartment
Protein Conc.	: 3mg/ml(200 μ l)
Reaction time	: 2h

実験プロトコール 201

4. 注意事項

- ・マイクロチューブフィルターは有機溶媒耐性がありませんので必ずバッファーに希釈してから使用してください。
- ・上清A+Bの値がCOOHビーズ(またはNHSビーズ)の全体のCOOH(NHS)量を表しています。この値が200 nmol/mgを大幅に下回るようだとマスキングがうまくできていないか、水分のコンタミによるNHSの遊離が考えられます。この場合は新しいNHSビーズを使用して再度固定化を行ってください。

以上