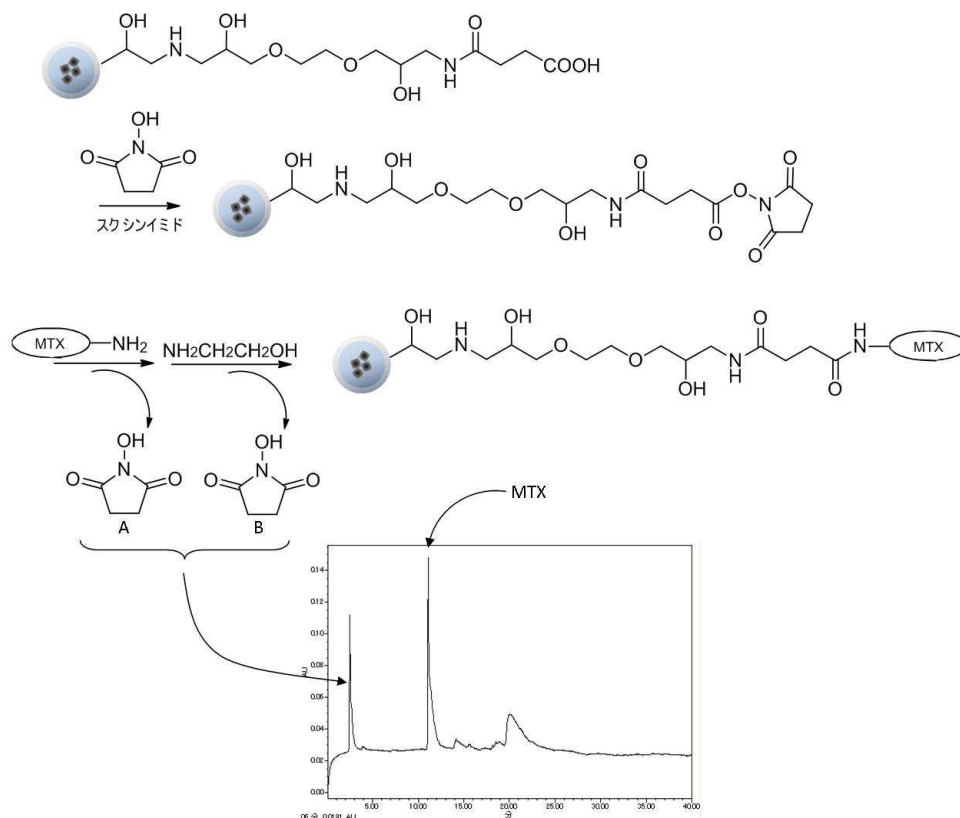


HPLC (高速液体クロマトグラフィー) によるリガンド固定化量の定量

スクリーニング (リガンド結合タンパク質のアフィニティ精製) 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 beads、014のNHS beads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

1.1 NHS beads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

- 1) 50 mLチューブへ酢酸0.605 gをとり、超純水で50 mLまでメスアップする。(0.2M酢酸)
- 2) 500 mLビーカーへ酢酸アンモニウムを7.708 gとり、超純水を加えて約400 mLまでメスアップする。
- 3) pHが5.70になるように0.2 M 酢酸を加え調整する。(40 mL位)
- 4) 500 mLメスシリンダーへ移し、超純水で500 mLまでメスアップする。
- 5) 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。

10 mM 酢酸アンモニウム溶液作製：移動相

- ・0.2 M酢酸アンモニウム溶液を50 mLとり、メスシリンダーで1 Lまでメスアップする。

スクシンイミド (NHS) 検量線作製

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

※ 検量線としては10 mM以下のみを使用する。

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。

10 mM酢酸アンモニウム (47 mL) (全体の94%) + アセトニトリル (3ml) (全体の6%)

2.2 サンプル調製

- 1) 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。
- 2) 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)
- 3) 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

- 1) 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。
- 2) 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。)
- 3) 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)
- 4) 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

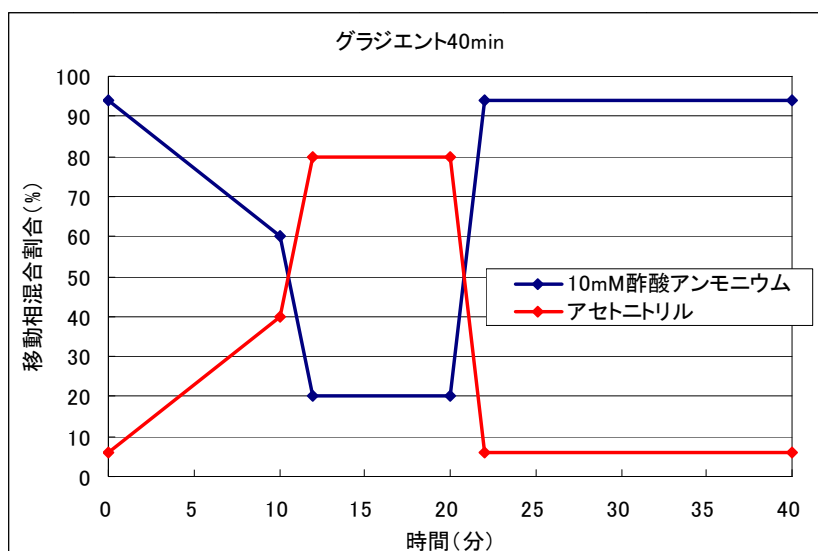


図1. グラジエント40分の酢酸アンモニウム溶液混合割合の推移

2.4 分析

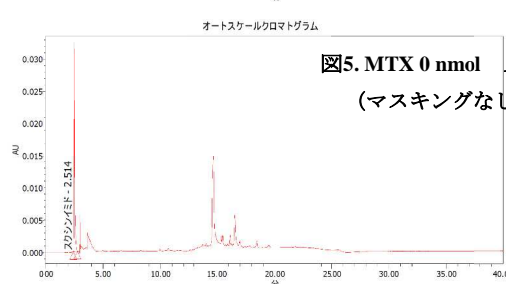
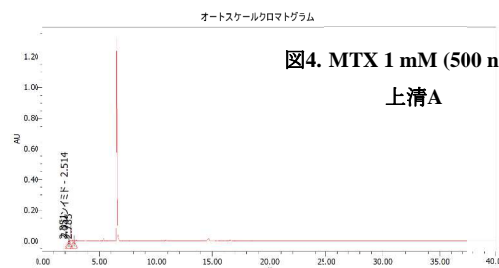
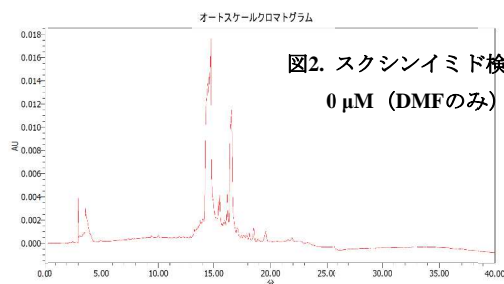
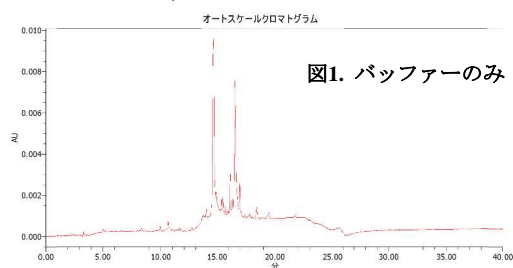
- 1) 設定したウィザード、メソッドを選択し、測定をスタートさせる。
- 2) 終了後、260 nmにて解析、ピークの面積から定量値へ変換する。
- 3) アセトニトリル100%にて1時間カラム洗浄 (1 mL/min) を行う。

2.5 データ解析

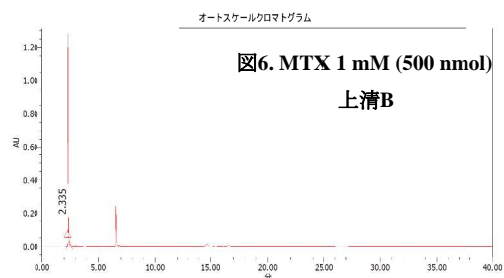
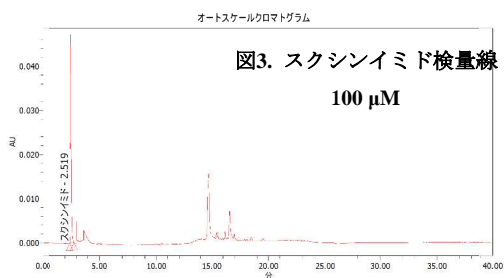
- 1) 上清Aのサンプルのピーク面積からリガンド固定化時に遊離したNHS量を算出する。
- 2) 工程1) からリガンド仕込み量0 mM (リガンド未固定) 時のNHS量をバックグラウンドとして差し引きし、実際のリガンド固定化量 (μM) とする。(mol/mgへ変換)
- 3) 上清Bのサンプルピーク面積からマスキング時に遊離したNHS量を算出する。
- 4) 工程3) からマスキングなしの上清BサンプルのNHS量をバックグラウンドとして差し引きし、リガンドが固定化されなかったカルボキシル基 (またはNHS基) 量 (μM) とする。(mol/mgへ変換)
- 5) 工程2) のリガンド固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

3. 補足 (実際の測定データ : 例 MTX)

3.1 HPLCピーク



実験プロトコール 201



[HPLC分析: サンプル20 μL+バッファー180 μL]

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=スクシイミド検量線 0 μM

MTX固定化時、マスクング時に遊離するスクシイミドはDMFへ溶けているために検量線もDMFで作製する。スクシイミド0 μM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=スクシイミド検量線 100 μM

スクシイミド100 μMを分析。2.519分にスクシ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(マスクングなし)

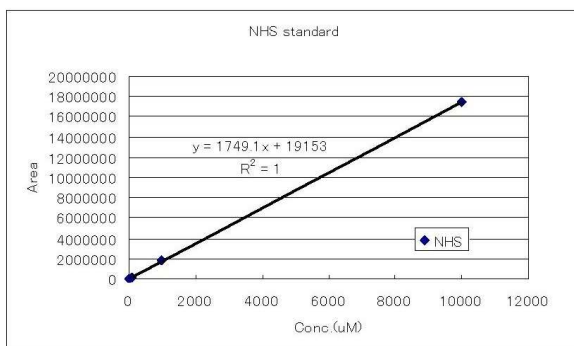
MTX-NH₂仕込み量0mM時かつマスクングをしない(アミノエタノールの代わりにDMF)場合の上清(B)。バックグラウンドのスクシイミドのピークが2.514分に見られる。

図6. サンプル= MTX 1mM 上清B

MTX-NH₂仕込み量1mMでマスクング時の上清(B)。2.335分にスクシイミドのピークが見られる。検量線、上清A、上清B(マスクングなし)のスクシ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、マスク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イミドの検量線へ当てはめ、マスクング時に遊離したスクシイミド量を算出する。

3.2 HPLC定量値

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



[参考]
検量線: $y=1800x$ 位

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

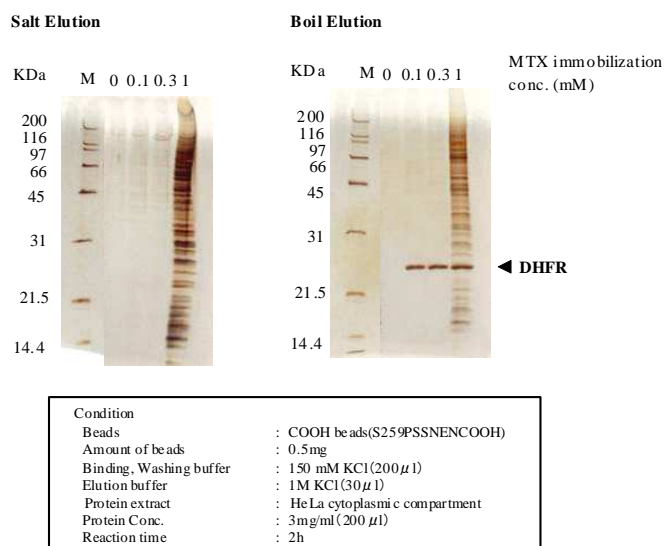
実験プロトコール 201

	Conc. of chemical compound at immobilization (mM)	MTX-NH2 (nmol/500ul)	NHS sup quantative 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



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ない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 beads (またはNHS beads) 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COOH beads (またはNHS beads) を使用して再度固定化を行ってください。

以上