

# SEPARATION REPORT

## TSKgel Tresyl-5PWを用いる免疫吸着体の調製法

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel Tresyl-5PWの性質	1
3. 抗体の固定化	2
4. カラムへの充填	4
5. ブロッキング	4
6. 溶出法	4
7. 免疫吸着体の安定性	5
8. 応用例	5
9. おわりに	9

## 1. はじめに

抗体を用いるイムノアフィニティクロマトグラフィーは、タンパク質精製手段として非常に有効であり、この方法により多くのタンパク質が精製されています。<sup>1-4)</sup>しかしながら活性化型担体に抗体を固定化し免疫吸着体を調製する時、抗原に対する結合量が少なくなるという問題が occurs。この問題は、抗体に限らず他のリガンドについても認められており、一般にリガンド固定化の最適条件はリガンドの種類により異なり良い吸着体を調製するためには、固定化条件の検討が必要になってきます。当社は、活性化型担体として既にTSKgel Tresyl-5PWの充填カラムを上市していますが、今回TSKgel Tresyl-5PWの充填剤を発売することになりました。ここでは、TSKgel Tresyl-5PWに抗体を固定化する時の最適条件の検討、カラムへの充填法、免疫吸着体の使用方法等について紹介いたします。

## 2. TSKgel Tresyl-5PWの性質

TSKgel Tresyl-5PWは、TSKgel G5000PWにトレスル基を約20 $\mu$ mol/mlgel導入しており、図-1に示す通り、リガンド中の一級アミノ基あるいはチオール基と反応します。リガンド固定化後のアミノ酸分析結果より、チロシンの水酸基、ヒスチジンのイミダゾール基とも反応します。TSKgel Tresyl-5PWは、凍結乾燥状態で販売されており、1gの凍結乾燥粉末は、膨潤して約4.0mlのゲルとなります。乾燥粉末は、8 $^{\circ}$ C以下で保存し、この条件下では、1年以上安定に使用可能であり、急激に活性が低下するということは、ありません。

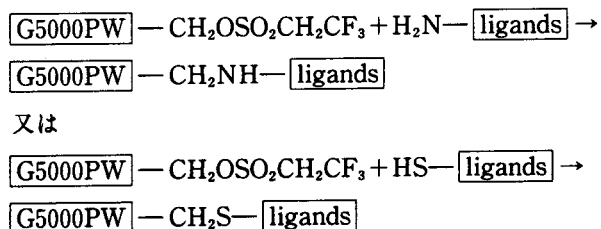


図-1 固定化反応

### 3. 抗体の固定化

#### (1) アフィニティ精製抗体の固定化

抗体の固定化量と抗原の結合量の関係を調べるため、アフィニティ精製抗体の固定化条件を検討しました。抗体として抗ヒトアルブミン抗体(ヤギ、アフィニティ精製)を用いました。表-1に固定化する時の固定化用緩衝液のpHの影響について検討した結果を示します。抗体の固定化量は、反応前後の混合物上清のタンパク量の差を調べ求めました。ヒトアルブミンの結合量は、ヒトアルブミンの $A_{280}^{1\%}$ を5.8として計算しました。又、抗体の効率は、抗体を二価とし、免疫グロブリンG、アルブミンの分子量をそれぞれ15万、6.7万として計算しました。表-1より固定化反応は、pHが高いほどよく、pH 7以上で96%

以上の固定化収率が得られました。ヒトアルブミンに対する結合量もpHの上昇とともに増加し、pH7.5で最高となりその後徐々に減少しました。固定化された抗体の効率は、pH 7~8で70%以上の値が得られており、この固定化条件で抗体は、非常に有効に固定化されていることがわかります。

表-2に抗体量の影響について検討した結果を示します。抗体量が増加するとヒトアルブミンに対する結合量も増加しますが固定化された抗体の効率は、抗体量の少ない時、最高値が得られ抗体量の増加とともに減少しました。

表-1 pH依存性

	pH				
	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
固定化された抗体量 (mg/mlgel)	1.3	2.4	2.5	2.5	2.5
固定化収率 (%)	52	96	100	100	100
抗原結合量 (mg/mlgel)	0.8	1.5	1.7	1.6	1.2
抗体の効率 (%)	69	70	76	72	45

TSKgel Tresyl-5PW : 0.25g、抗体 : 抗ヒトアルブミン抗体 2.5mg、  
固定化用緩衝液 : 1.0Mリン酸カリウム、2 ml、温度 : 4℃、  
時間 : 16時間

表-2 抗体量依存性

	抗体量 (mg)			
	0.5	1.0	2.5	5.0
固定化された抗体量 (mg/mlgel)	0.5	1.0	2.5	4.7
固定化収率 (%)	100	100	100	94
抗原結合量 (mg/mlgel)	0.4	0.8	1.7	2.3
抗体の効率 (%)	87	85	76	55

TSKgel Tresyl-5PW : 0.25g、抗体 : 抗ヒトアルブミン抗体 2.5mg、  
固定化用緩衝液 : 1.0Mリン酸カリウム (pH7.5) 2 ml、温度 : 4℃、  
時間 : 16時間

## (2) IgG画分の固定化

アフィニティ精製抗体は、免疫吸着体を調製するのに有効ですが、価格が高く、種類も限られているのが現状です。そこで比較的入手しやすいIgG画分の固定化について検討しました。抗体として抗ヒトアルブミン抗体(ウサギ、IgG画分)を用いました。アフィニティ精製品の場合と異なりIgG画分は、総タンパク量が多いため、25°Cで固定化反応を行ないました。表-3にまず固定化用緩衝

液のpHの影響を検討した結果を示します。アフィニティ精製品と同様、pH7.5~8.0付近でヒトアルブミンに対する結合量が最高になることがわかります。表-4には、固定化反応の経時変化を示しますが、固定化時間が長くなると固定化量は、増加しますが、ヒトアルブミンの結合量は、8時間で最高値が得られました。

表-3 pH依存性

	pH				
	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
固定化されたタンパク量 (mg/mlgel)	5.4	7.1	9.6	10	10
固定化収率 (%)	50	66	90	93	95
抗原結合量 (mg/mlgel)	1.7	2.2	2.8	2.6	2.4

TSKgel Tressyl-5PW : 0.25g、抗体：抗ヒトアルブミン抗体(タンパク量10.7mg)  
固定化用緩衝液：1.0Mリン酸カリウム、2 ml、温度：25°C、時間：16時間

表-4 経時変化

	時間					
	1	2	4	8	16	24
固定化されたタンパク量 (mg/mlgel)	6.8	7.8	9.0	9.5	9.8	10
固定化収率 (%)	64	73	84	89	92	93
抗原結合量 (mg/mlgel)	1.8	2.2	2.6	2.8	2.8	2.8

TSKgel Tressyl-5PW : 0.25g、抗体：抗ヒトアルブミン抗体(タンパク量10.7mg)  
固定化用緩衝液：1.0Mリン酸カリウム(pH7.5) 2 ml、温度：25°C、時間：16時間

以上抗体の固定化についてまとめると、アフィニティ精製品(タンパク量が少ない)の場合、4°C、16時間、IgG画分(タンパク量が多い)の場合、25°C、8時間程度で、有効な免疫吸着体が得られると考えられます。

#### 4. カラムへの充填

カラムとしては、弊社ガードゲルホルダ<sup>®</sup>、6mmφ×10mm (品番07093)及び10mmφ×20mm (品番16106)がポンプを用いず、アスピレーターで簡単に充填できます。分析的に使用される場合6mmφ×10mmのカラムを、又ある程度の量を分取される場合には、10mmφ×20mmのカラムを使用して下さい。尚、詳しい充填方法は充填剤取扱説明書を参照して下さい。

#### 5. ブロッキング

固定化終了後の残存活性基のブロッキングは、カラムへ充填した後、0.1~0.2M Tris-HCl緩衝液 (pH8.0)を、流速0.8ml/min (6mmφ×10mmの場合)、2.0ml/min (10mmφ×20mm)で1~2時間通液することで可能です。

#### 6. 溶出法

免疫吸着体から、抗原又は抗体の溶出法としては、一般に

- 1) pHを酸性あるいは、アルカリ性にする<sup>5,6)</sup>
- 2) イオン強度を高める<sup>7)</sup>
- 3) 尿素、SDSのような変性剤や界面活性剤を加える<sup>8,9)</sup>
- 4) カオトロピックイオンを添加する<sup>10~13)</sup>

等がよく用いられております。抗ヒトアルブミン抗体(ウサギ、IgG画分)を固定化した免疫吸着体を用いてヒトアルブミンの溶出を種々検討しましたが、やはりpHを酸性にして溶出した場合、最も良い結果が得られました。図-2に溶出緩衝液のpHの影響を示していますが、溶出法は、カラム内容積の2倍程度(3ml)のサンプルループを用いパルス溶出法で行ないました。この方法は、免疫吸着体と溶出液との接触時間を短くすることが可能です。図-2より、pH3ではヒトアルブミンは、ほとんど溶出せず、pH1.6で高い回収率が得られました。抗原又は抗体の酸性溶液中の安定性は、種類によって異なるため、溶出法については、抗体ごとに検討する必要があると思われませんが、TSKgel Tresyl-5PWは、高流速で使用可能であり図-2のクロマトグラムより、溶出される抗原又は抗体と酸性溶液の接触時間をかなり抑えることが可能です。

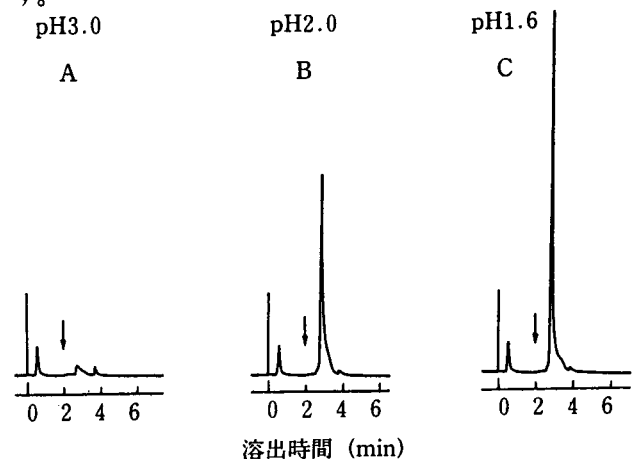


図-2 抗原溶出のpH依存性

- 試料 : ヒトアルブミン(30μg)  
カラム : 抗ヒトアルブミン抗体-5PW (1cmφ×2cm)  
溶離液 : 0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)  
流速 : 2.0ml/min  
検出 : UV(280nm)  
溶出液A : 0.1Mクエン酸-NaOH(pH3.0)  
溶出液B : 0.1Mクエン酸-NaOH(pH2.0)  
溶出液C : 0.1Mクエン酸-HCl(pH1.6)

## 7. 免疫吸着体の安定性

免疫吸着体の安定性は、抗ヒトアルブミン抗体(ウサギ、IgG画分)を固定化したゲルに25°Cで図-3に示すように6.5分間隔でヒト血清5 $\mu$ lをくり返し注入し、pH 1.6の溶出液でヒトアルブミンを溶出させ、注入20回ごとにヒトアルブミンの結合量の変化を調べました。その結果100回後に10%の結合量の減少が認められました。しかし免疫吸着体の安定もリガンドの種類により変わり、4°Cで行なえば、さらに安定性は上がるものと思われま

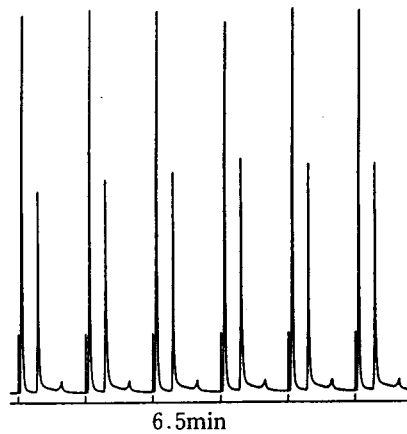


図-3 抗ヒトアルブミン抗体-5PWの安定性

試料：ヒト血清(5 $\mu$ l)

カラム：抗ヒトアルブミン抗体-5PW(6mm $\phi$ ×1cm)

溶離液：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)

流速：1.0ml/min

検出：UV(280nm)

溶出液：0.1Mクエン酸-HCl(pH1.6)

(パルス溶出法)

## 8. 応用例

ここでは、ヒト血清、ヒト血漿中のタンパク質の精製を種々の抗体固定化カラムを用いて検討しました。精製後の純度チェックはすべてSDS-PAGEで行ないました。尚、抗体は、すべてDAKO社製(ウサギ、IgG画分)を使用し、固定化条件は表-5に示しています。

### (1) アルブミン

抗体の固定化条件は、表-5に示しており、ヒトアルブミン結合量は2.8mg/mlgelという値が得られました。血清中のアルブミン含量は、多いため、10mm $\phi$ ×20mmのカラムを用いて精製を行ないました。クロマトグラムを図-4に示しますが、矢印の位置でpHを下げ吸着したアルブミンを溶出しました。SDS-PAGEより純度の高いアルブミンが得られていることがわかります。

表-5 抗ヒトタンパク抗体の固定化

抗ヒトタンパク抗体	総タンパク量 (mg/ml)	固定化収率 (%)	抗原結合量 (mg/ml gel)
抗ヒトアルブミン	18	89	2.8
抗ヒトIgG	11	96	2.5
抗ヒトトランスフェリン	15	89	2.0
抗ヒトIgM	10	90	2.5
抗ヒトオロソムコイド	24	83	—
抗ヒトプラスミノーゲン	11	90	—

TSKgel Tresyl-5PW：0.25g、抗体：抗ヒトタンパク質0.5ml、

固定化用緩衝液：1.0Mリン酸カリウム(pH7.5) 2ml、温度：25°C、

時間：8時間

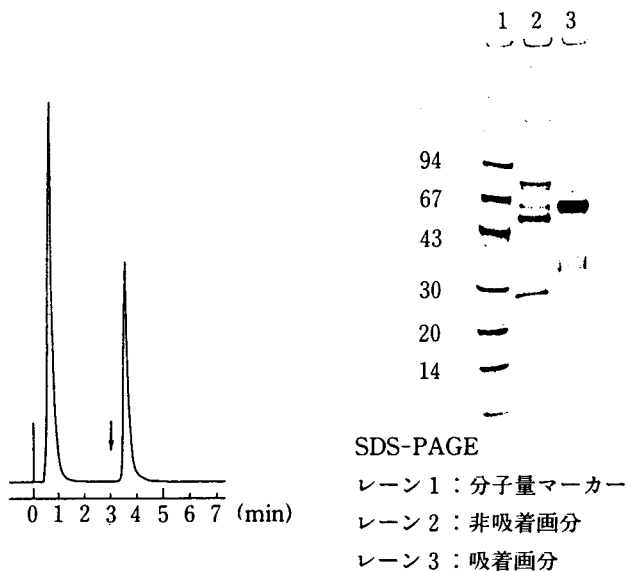


図-4 ヒトアルブミンの精製

試料：ヒト血清(50 $\mu$ l)

カラム：抗ヒトアルブミン抗体-5PW(1cm $\phi$ ×2cm)

溶離液：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)

流速：2.0ml/min

検出：UV(280nm)

溶出液：0.1Mクエン酸-HCl(pH1.6)

(パルス溶出法)

## (2) IgG

リガンドとして抗ヒトIgG( $\gamma$ -chain)抗体を用いました。固定化条件は表-5に示します。ヒトIgGの結合量は、ヒトIgGのA<sub>280</sub><sup>1%</sup>を14.7として計算した時、ゲル1ml当たり2.5mgという値が得られました。抗体固定化後、6mm $\phi$ ×10mmのカラムに充填し、IgGの精製を行ないました。クロマトグラムを図-5に示します。SDS-PAGEより吸着画分にはヒトIgGのH.L鎖が認められます。

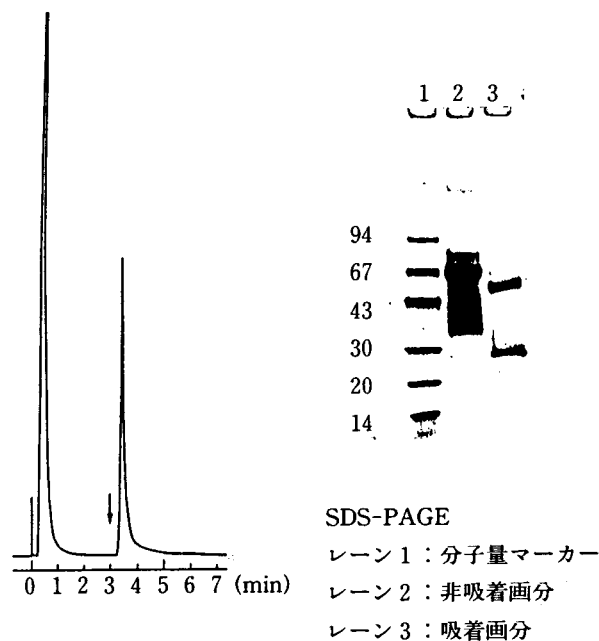


図-5 ヒトIgGの精製

試料：ヒト血清(20 $\mu$ l)

カラム：抗ヒトIgG抗体-5PW(6mm $\phi$ ×1cm)

溶離液：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)

流速：1.0ml/min

検出：UV(280nm)

溶出液：0.1Mクエン酸-HCl(pH1.6)

(パルス溶出法)

### (3) トランスフェリン

抗ヒトトランスフェリン抗体を固定化し、トランスフェリンの精製を行ないました。ヒトトランスフェリンの結合量はトランスフェリンの $A_{280}^{1\%}$ を11.4とした時、2.0 mg/mlgelでした。クロマトグラムを図-6に示します。SDS-PAGEより、この場合も吸着画分のみ分子量8~9万付近にシングルバンドが認められます。

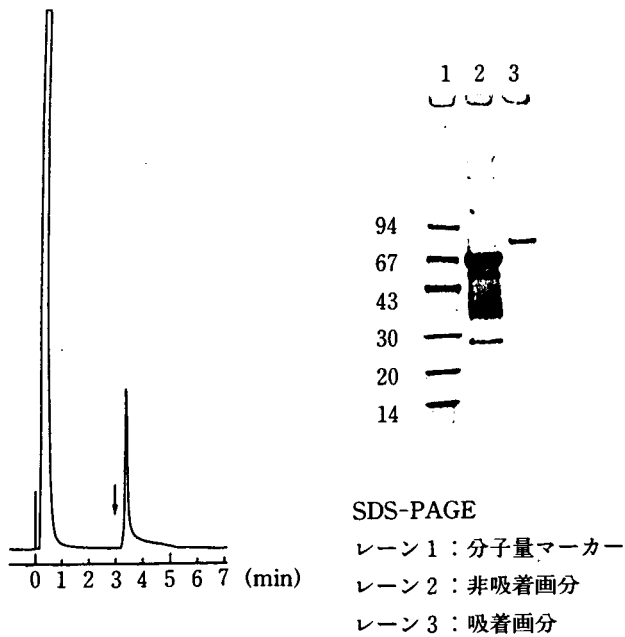


図-6 ヒトトランスフェリンの精製

試料：ヒト血清(20 $\mu$ l)  
 カラム：抗ヒトトランスフェリン抗体-5PW(6mm $\phi$ ×1cm)  
 溶離液：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)  
 流速：1.0ml/min  
 検出：UV(280nm)  
 溶出液：0.1Mクエン酸-HCl(pH1.6)  
 (パルス溶出法)

### (4) IgM

血清中からIgMを精製することは、非常に困難であり、精製例は、あまり報告されていません。抗ヒトIgM( $\mu$ -chain)抗体を固定化し、IgMの精製を行ないました。固定化条件は、表-5に示していますが、IgMの $A_{280}^{1\%}$ を13.3とした時、IgMの結合量は、2.5mg/mlgelでした。クロマトグラムを図-7に示します。図-8は図-7の吸着画分をTSKgel G4000SW<sub>XL</sub>で分析したクロマトグラムを示しております。図-8及びSDS-PAGEより吸着画分は、不純物(IgG、アルブミン等)を含んでいますが、かなり精製されたIgMが得られています。

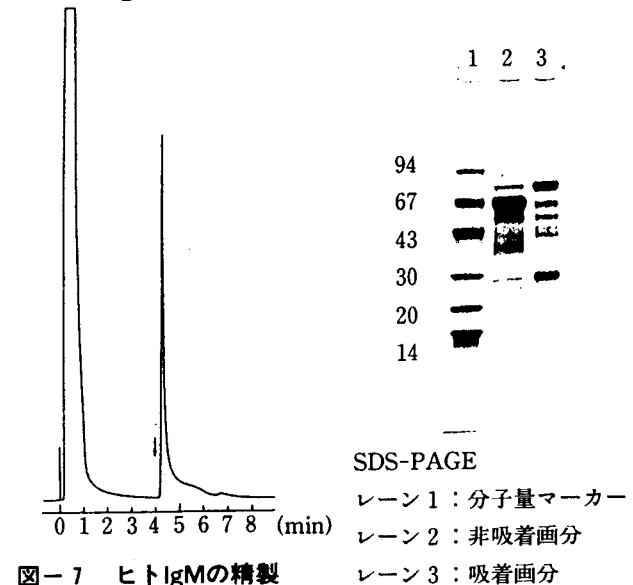


図-7 ヒトIgMの精製

試料：ヒト血清(100 $\mu$ l)  
 カラム：抗ヒトIgM抗体-5PW(6mm $\phi$ ×1cm)  
 溶離液：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)  
 流速：1.0ml/min  
 検出：UV(280nm)  
 溶出液：0.1Mクエン酸-HCl(pH1.6)  
 (パルス溶出法)

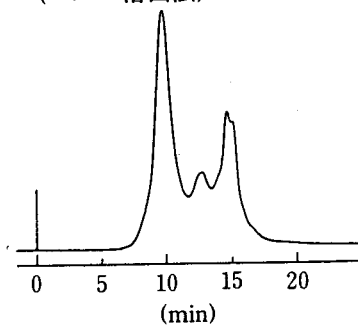


図-8 TSKgel G4000 SW<sub>XL</sub>による純度チェック

試料：吸着画分(図-7)100 $\mu$ l  
 カラム：TSKgel G4000 SW<sub>XL</sub>(7.8mm $\phi$ ×30cm)  
 流速：0.8ml/min  
 検出：UV(280nm)  
 溶離液：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)+0.2M NaCl



### (5) オロソムコイド

抗ヒトオロソムコイド抗体を固定化し、オロソムコイドの精製を行ないました。固定化条件を表-5に精製を行なったクロマトグラムを図-9に示します。SDS-PAGEより吸着画分には、分子量約4.2万のバンドが認められます。

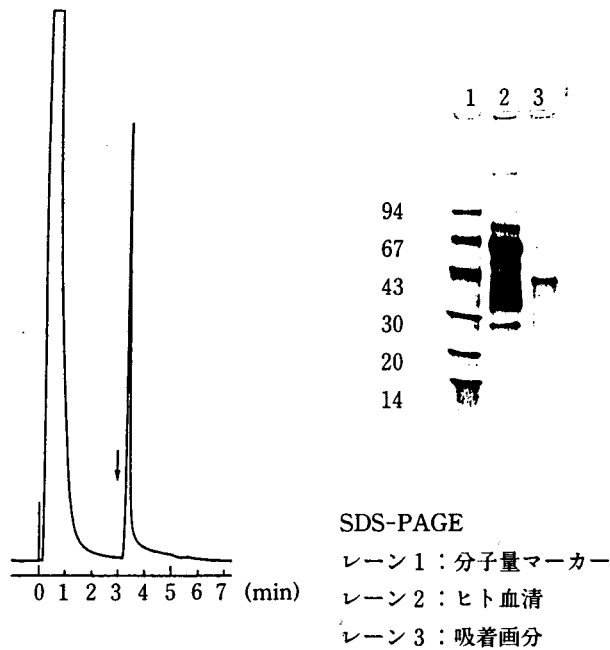


図-9 ヒトオロソムコイドの精製

試料：ヒト血清(100 $\mu$ l)

カラム：抗ヒトオロソムコイド抗体-5PW(6mm $\phi$ ×1cm)

溶離液：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)

流速：1.0ml/min

検出：UV(280nm)

溶出液：0.1Mクエン酸-HCl(pH1.6)

(パルス溶出法)

### (6) プラスミノーゲン

抗ヒトプラスミノーゲン抗体を固定化し、ヒト血漿中からプラスミノーゲンの精製を行ないました。固定化条件は表-5に示します。クロマトグラムは図-10に示します。SDS-PAGEより分子量8~9万付近にシングルバンドが認められます。又、pH1.6で溶出した画分の活性をテストチームプラスミノーゲンキット(第一化学薬品社製)で測定しましたが、80%以上の活性回収率が認められました。

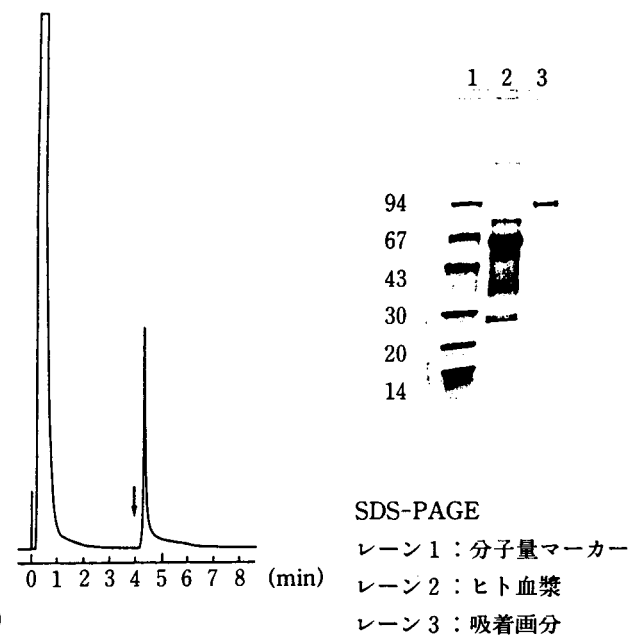


図-10 ヒトプラスミノーゲンの精製

試料：ヒト血漿(50 $\mu$ l)

カラム：抗ヒトプラスミノーゲン抗体-5PW(6mm $\phi$ ×1cm)

溶離液：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)

流速：1.0ml/min

検出：UV(280nm)

溶出液：0.1Mクエン酸-HCl(pH1.6)

(パルス溶出法)

## 9. おわりに

従来の分離モード(ゲル濾過、イオン交換、疎水性クロマトグラフィー)では、多くの成分を含む試料から一回の操作で目的成分のみを精製するのは、非常に困難でありまた長時間(20~60分)を要しました。しかし、免疫吸着体を使用すれば、精製例で示したように10分以内という短時間で純度の高い、目的物質が得られます。TSKgel Tressyl-5PWは、抗体の固定化、カラムへの充填操作等、非常に簡単であり、アフィニティクロマトグラフィーを経験したことのない人でも、免疫吸着体を調製できることがわかりただけたと思います。

又病気の診断に用いられる、タンパク質の分析法には、免疫拡散法や、タンパク質の活性測定法など比較的長時間あるいは複雑な操作を要しますが、免疫吸着体を用いるアフィニティクロマトグラフィーは、それらの方法に代わる測定手段としてこれから威力を発揮するものと思われます。

## 参考文献

- 1) W. H. Scouten, *Affinity Chromatography*, Wiley, New York, 1981. Ch. 10, p. 272
- 2) P. Mohr and K. Pommerening, *Affinity Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 1985, Ch. 8, p. 131
- 3) A. Szewczuk and E. Prusak, *Affinity Chromatography*, IRL Press, Washington, DC, 1985, Ch. 5, p. 117
- 4) N. Cooke, *LC, GC, Lig. Gas Chromatogr.*, 5, 866 (1987)
- 5) L. Wofst and B. Burr, *J. Immunol.*, 103, 380 (1969)
- 6) W. J. Kleinschmidt and P. D. Boyer, *ibid.*, 69, 257(1952)
- 7) M. Heidelberger and E. A. Kabat, *J. Exptl. Med.*, 67, 186(1937)
- 8) J. J. Cebra, D. Givol and E. Katchalski, *J. Biol. Chem.*, 237, 751(1962)
- 9) L. I. Slobin and M. Sela, *Biochim. Biophys. Acta.*, 107, 593(1965)
- 10) S. Carrel and S. Barandun, *Immunochemistry.*, 8, 39(1971)
- 11) V. A. de Saussure and W. B. Dandliker, *Immunochemistry.*, 6, 77(1969)
- 12) W. B. Dandliker, R. Alanso, V. A. de Saussure, F. Kierszenbaum, S. A. Levison and H. C. Schapiro, *Biochemistry.*, 6, 1460(1967)