

2-4. リガンド固定化アフィニティーカラムによる精製例

2-4-1. 抗体固定カラムを用いた抗原の精製

抗 BSA (ウシ血清アルブミン) ポリクローナル IgG を固定した HiTrap NHS-activated HP カラムを使用して、1 回の操作でウシ胎児血清から高純度な BSA を精製した例を紹介します。カラムに結合した抗体分子は全てが抗原と結合できるように配向して固定されているわけではないため、精製抗原の回収率は理論値を下回ります。

リガンド固定カラムの作製

リガンドに用いた抗体は、BSA をウサギに免疫して得られた抗血清から精製した全 IgG 画分です。市販抗体には防腐剤として NaN_3 が添加されている場合があるため、まず PD-10 カラムでカップリングバッファーに交換しました (方法は Appendix2-4. (p.58 ~) を参照)。1 ml の抗体溶液 (4.5 mg IgG/ml) をカップリングに使用し、その時のカップリング効率はほぼ 100 % でした。

ウシ胎児血清からの BSA のアフィニティー精製

作製した IgG 固定アフィニティーカラムを使用して、0.1 ml 分のウシ胎児血清から約 0.34 mg (5.1 nmole) の高純度な BSA を精製することができました (図 2-3)。カラムに固定した 4.5 mg の IgG (30 nmole) のうち 20 % が特異抗体と仮定すると、理論的には 0.8 mg (12 nmole) の BSA がカラムに結合可能です (この数値は 1 分子の IgG が 2 分子の抗原と結合したと仮定した数値です)。

血清中の BSA 濃度は約 50 mg/ml なので、添加したサンプル (原血清 0.1 ml 分) に含まれる BSA 量は 5 mg (74 nmole) となり、カラムの結合容量よりも過剰量を添加していることとなります。過剰量の抗原が存在するにもかかわらず回収量 (0.34 mg) が結合容量 (0.8 mg) を大きく下回ったのは、ゲルに固定された IgG 分子の配向性と関係があります。つまり固定された IgG のうちの一部だけが抗原と結合できる向きであったことを意味しています。

抗体のような巨大分子をカップリングした場合には、抗体分子の配向性により、目的タンパク質の結合量は理論値の 10 % 前後になると言われています。

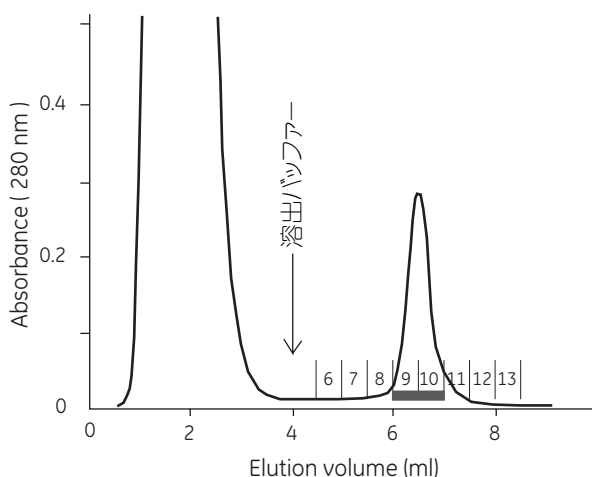


図 2-3. 抗 BSA 抗体固定アフィニティーカラムによる BSA の精製

サンプル： PBS で 10 倍希釈したウシ胎児血清 1 ml
カラム： 全 IgG 画分 (BSA を免疫した抗血清由来) を固定した HiTrap NHS-activated HP 1 ml
流速： 0.2 ml/min
結合バッファー： 10 mM リン酸ナトリウム, 0.15 M NaCl, pH 7.0
溶出バッファー： 0.1 M グリシン -HCl, pH 2.7
精製システム： ÄKTAexplorer 10S

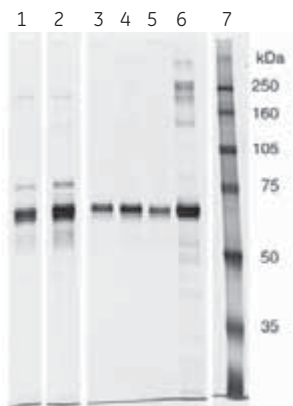


図 2-4. 各画分の SDS-PAGE 分析 (非還元)

システム: SE260 Mighty Small II
 泳動ゲル: マルチゲル 10 (第一化学)
 染色: PlusOne Protein 銀染色キット

レーン 1: ウシ胎児血清
 レーン 2: 素通り画分
 レーン 3, 4, 5: 溶出画分 (フラクション 9,10,11)
 レーン 6: 精製 BSA (市販品)
 レーン 7: Full Range Rainbow Marker

2-4-2. 抗原固定カラムを用いた特異抗体の精製

抗血清中の IgG のうち、抗原と結合する特異抗体の割合は 10 ~ 20 % と言われます。抗体を用いた実験では、しばしば抗体の特異性、力価を高めるために特異抗体の精製が行われます。特異抗体の精製には抗原固定アフィニティーカラムを使用します。

抗原固定カラムの作製

マウス IgG を抗原として抗マウス IgG を精製した例を紹介します。

10 mg の精製マウス IgG を 3.2 ml のカップリングバッファーに溶解し、ペリスタルティックポンプを用いて、抗体溶液を HiTrap NHS-activated HP カラムに 1 時間循環させました。カップリング効率は 95 % でした。リガンド溶液が多い場合は、ポンプを使って循環させることもできます。(注意: リガンド濃度が低い場合には、カップリング効率が大幅に低下することが弊社研究室で確認されています。このような場合、カップリング前に濃縮することをおすすめします。)

結合した抗マウス IgG は、pH 2.7 の酸性バッファーで溶出しました。溶出した IgG が酸性条件で失活しないように、分画する試験管にはあらかじめ分画容量の 1/10 の中和剤 (1 M Tris-HCl, pH 9) を添加しておきます。

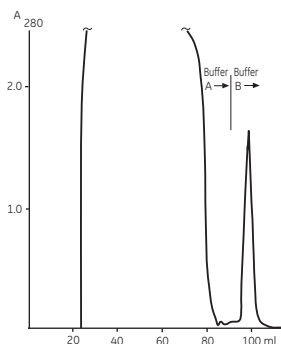


図 2-5. マウス IgG 固定カラムによる抗マウス IgG 特異抗体の精製

サンプル: 50 ml ヒツジ抗マウス Fc 血清
 カラム: マウス IgG 固定 HiTrap NHS-activated HP カラム
 バッファー A: 75 mM Tris-HCl, pH 8.0
 バッファー B: 100 mM グリシン -HCl, 0.5 M NaCl, pH 2.7
 流速: 1.0 ml/min

この例では抗血清をそのまま抗原固定カラムに添加していますが、カラムを繰り返し使用する場合には、カラムの劣化防止の点から Protein A/Protein G カラムによる予備精製をおすすめします。

