

1113 マイクロプレートミニカラムを用いた PCB 多検体検出

○長谷川みき¹, 中村 史¹, 窪田亜由美², 劉学けい¹, 中村 徳幸¹, 三宅 淳¹ (¹産総研・ディッシュエンジニアリング 研究センター, ²東京農工大・工・生命工)

【目的】近年、環境汚染物質を簡便、高感度に検出する検出法の開発が求められている。なかでもポリ塩化ビフェニル (PCB) は環境中で広範囲に検出されており、今なお汚染が問題となっている。そのため本研究ではリポソームクロマトグラフィーを利用した簡便な PCB 検出法の開発を目的とした。

【方法および結果】PCB 検出は 2 つのカラムを組み合わせて行った。まず PCB 抗体固定化カラムにおいて PCB とホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) コンジュゲートとの競合反応を行い、抗体に結合しなかった PLA₂ コンジュゲートを溶出させた。この溶出液を蛍光物質カルセイン封入リポソームカラムへ添加し、PLA₂ よりリポソームが破壊されて漏出してくる蛍光量を測定した。本研究では多検体を同時に検出するために、ウェルの底部がフィルターとなっている 96 穴マイクロプレートを用いた。これにより 96 個のミニカラムを作製することができ、多検体測定を行うことが可能となる。反応についての条件検討を行った結果、競合反応は 1 時間、37°C で振盪することで行い、リポソームカラムにおける反応は室温で 10 分間、振盪により行うこととした。また適当 PLA₂ コンジュゲートの濃度は 5 μg/ml であることが示された。また、シグナル増幅のためには PLA₂ により破壊されやすいリポソームを選択する必要がある。そこで本研究ではリン脂質の組成を変えたりリポソームを用いて、PLA₂ による漏出蛍光量の比較を行った。その結果、負電荷を持つリン脂質 (polyethyleneoxide-palmitoyloleoyl-phosphatidylethanolamine) を含むリポソームの場合に、漏出蛍光量が増大することが示された。また、反応の pH についても検討を行った結果、最適 pH は 8 であることが示された。

Multiple detection of PCBs using microplate mini column

○ Miki Hasegawa¹, Chikashi Nakamura¹, Ayumi Kubota², Xue-Ying Liu¹, Noriyuki Nakamura¹, Jun Miyake¹ (¹TERC/AIST, ²Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words PCB, detection, liposome, competitive immuno-reaction, dye-leakage, phospholipase A₂

1115 静電的相互作用クロマトグラフィーにおける DNA の生体認識機構

○山本修一¹, 吉武朋彦², 番場啓太², 星野陽子² (¹山口大・工・応化, ²山口大院・医・応用医工)

【はじめに】静電的相互作用を利用するクロマトグラフィー (イオン交換クロマトグラフィー, IEC) はタンパク質の精密分離には必要不可欠の方法である。DNA の IEC 分離も実際に実施されているが、タンパク質にくらべて系統化された工学的な解析は多くない。本研究では一塩基多型 (SNPs) の分離を目的として合成オリゴヌクレオチドの IEC における生体認識機構を解析した。

【結果と考察】IEC カラムとしては非多孔性陰イオン交換粒子カラム Tosoh DEAE-NPR を使用した。pH 一定で塩濃度を直線的に増加させる直線塩濃度勾配溶出実験を全自動クロマトグラフィー装置 (Akta Explorer) で行った。

直線塩濃度勾配溶出実験から溶出塩濃度 I_r と規格化された勾配 GH との関係求めた。GH- I_r 曲線から吸着に関与したサイト数 B と一定 GH における溶出塩濃度 I_{rc} を決定した。サイト数はオリゴヌクレオチド長とともに増加したが GC 含量の影響も明らかとなった。また I_{rc} もオリゴヌクレオチド長とともに増加したが GC 含量の影響が顕著であった。一塩基の変異があるサンプルについて多くの場合、良好な分離結果が得られた。

【参考文献】S.Yamamoto & T.Ishihara, "Resolution and retention of proteins near isoelectric points in ion exchange chromatography - Molecular recognition in electro static interaction chromatography-", Sep. Sci. Tech. vol.35, 1707-1717(2000)

Biorecognition of DNA in electrostatic interaction chromatography

○ Shuichi Yamamoto¹, Tomohiko Yoshitake², Keita Banba², Youko Hoshino² (¹Dept. Chem. Eng., Sch. Eng., Dept. Biorecog. Eng., Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ., ²Dept. Biorecog. Eng., Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ.)

Key words chromatography, Biorecognition, electrostatic interaction, DNA, SNPs, separation

1114 オープンサンドイッチ ELISA に適した新規ファージディスプレイ法を用いたビスフェノール A の非競争的検出

○油谷隆秀¹, 坂本健造¹, 増田兼治², 西 甲介³, 大川秀郎⁴, 長棟輝行¹, 上田 宏² (¹東大院・工・化生, ²東大院・新領域・先端生命, ³神戸大院・自然科学, ⁴神戸大・遺伝子実験セ)

【目的】我々はこれまで、抗原による抗体 Fv の安定化を利用した新規免疫測定法オープンサンドイッチ (OS) 法を提案するとともに、ファージ提示法を用いて OS 法に適した抗体を迅速に選択することが可能な系 (split Fv system) の確立を行ってきた。split Fv system では、繊維状ファージ末端にある二種の外被蛋白 p7, p9 の N 末端に抗体 V_L, V_H をそれぞれ融合させることで Fv を提示する。このときベクター上の V_L 遺伝子と g7 の間にアンバーコドンを含み、宿主大腸菌の sup 変異の有無により V_L 断片の提示と分泌の切り替えが可能にしてある。これにより V_H/V_L 提示時には抗原によるパニングが、V_L 分泌時には V_L をプレートに固定化し、培養上清中の V_H 提示ファージの結合量を OS 法により測定することが可能となっている。本研究ではこの split Fv system を用いて、内分泌かく乱物質である単価抗原ビスフェノール A (BPA) の非競争的検出を試みた。

【方法と結果】抗 BPA 抗体 scFv 遺伝子より PCR 法で作成した split Fv 断片を、ファージミッドベクター pKST2 に組み込んだ。これを大腸菌 TG-1 (sup+) に形質転換しファージを調製したところ、十分な BPA 結合能が確認された。次にファージを HB2151 (sup-) に感染させ、同様にファージと可溶性 V_L を含む上清を調製した。これと protein L 固定化プレートを用いて OS 法を行ったところ、BPA 濃度依存的な信号上昇が確認された。

【結論】新規ファージディスプレイ法 split Fv system を用いたオープンサンドイッチ ELISA 法により、ビスフェノール A の非競争的検出が実現された。

Development of noncompetitive immunoassay for Bisphenol A based on a novel phage display system suitable for Open Sandwich ELISA

○ Takahide Aburatani¹, Kenzo Sakamoto², Kenji Masuda³, Kousuke Nishi⁴, Hideo Ohkawa⁵, Teruyuki Nagamura¹, Hiroshi Ueda¹ (¹Dept. Chem. Biotechnol., Sch. Eng., Univ. Tokyo, ²Dept. Chem. Biotechnol., Sch. Eng., Univ. Tokyo, ³Dept. Integ. Biosci., Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo, ⁴Grad. Sch. Sci. Tech., Kobe Univ.)

Key words antibody engineering, phage display, noncompetitive immunoassay, Open Sandwich ELISA, endocrine disrupting chemicals, Bisphenol A

1116 Dye-metal affinity chromatography in mixed mode for purification of alcohol dehydrogenase.

○ Chusnul Hidayat, Mikio Nakajima, Mutsumi Takagi, Toshiomi Yoshida (ICBiotech, Osaka Univ.)

【Objective】The performance of the new type adsorbent matrix (dye-IDA-matrix) developed by means of the immobilization of Cibacron Blue 3GA (CB) on iminodiacetic acid agarose-coated alumina (IDA-matrix) was investigated.

【Method】Alumina was coated with agarose by an emulsion technique, activated with epichlorohydrin, and reacted with iminodiacetic acid (IDA) to produce IDA-matrix. Further the reaction of the IDA-matrix with CB produced the dye-IDA-matrix. The dye-IDA-matrix was charged with zinc ions, and used for purification of alcohol dehydrogenase (ADH).

【Result】Immobilization of CB on IDA-matrix increased ADH binding. One-step elution using 4 mM EDTA containing 0.5 M NaCl resulted in 66% of enzyme recovery and purification factor of 4.7. Two-step elution with buffers containing imidazole resulted in higher purification factor of 6.5 and lower enzyme recovery of 40%. Equilibration of matrix with imidazole before applying the sample increased both of the purification factor and the enzyme recovery to 8.4 and 76%, respectively. Consequently, the combination of the immobilization of CB on IDA-matrix and equilibration of matrices with imidazole before adsorption is a good strategy for purification of metalloenzyme such as ADH, and the usage of this strategy to expanded bed system should be further studied.

Dye-metal affinity chromatography in mixed mode for purification of alcohol dehydrogenase.

○ Chusnul Hidayat, Mikio Nakajima, Mutsumi Takagi, Toshiomi Yoshida (ICBiotech., Osaka Univ.)

Key words Alcohol dehydrogenase, Dye, Metal affinity, Mixed mode, Zinc