

スピнкаラムを用いた簡便迅速試料前処理

MonoSpinのアプリケーションと使用方法のコツのご紹介

太田 茂徳, 古庄 義明

1 はじめに

各種クロマトグラフィーで分析を行う際、気体、固体、液体問わず、適切な試料前処理を実施した後に、機器へ試料を導入する必要がある。近年は分析機器、特に質量分析計の感度の向上に伴い、より簡便な試料の前処理法が求められている。生体試料分析時において、試料に有機溶媒を適量添加することによって実施する除タンパク法や、ミニカラムを用いた精製手法の一つである固相抽出においても、ターゲット化合物を固相充填剤へ吸着後に、溶出する手法ではなく、ターゲット化合物を素通りさせる、クリーンアップによる簡便な前処理を採用するケースも増えている。また、クロマトグラフィーにおける分析時間の短縮に伴い、前処理に対しても迅速性、微量、微小容量、多検体サンプルへの適応といった、新しい要望を受けるケースが増えている。一方で、質量分析計を検出器として用いる場合においては、上記簡便な前処理では排除がされないサンプルマトリックスがターゲット化合物と共溶出することによるイオンサプレッションが、分析精度に影響を与える場合が報告されている¹⁾。そのため、これまでの前処理用製品、固相抽出製品とは異なる、新たなツールが望まれている。

ジーエルサイエンスではこれまでに、シリカモノリスを用いた試料前処理、HPLC 用カラムの開発を行ってきた。シリカモノリスはシリカの骨格と細孔が一体化された構造を有し、それぞれの構造を独立して制御することが可能であり、これまで分析化学の分野において様々な応用が検討されてきた (図 1)。

本技術紹介ではその中でも、微量サンプルを簡便に前処理可能な固相抽出スピнкаラムである MonoSpin の特

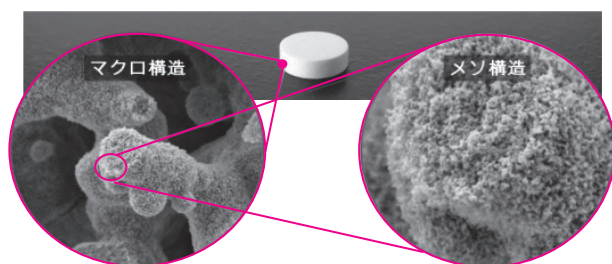


図 1 シリカモノリスディスクの構造

長と、アプリケーション、使用方法のコツについて紹介する。

2 MonoSpin の特長

シリカモノリスディスクを分離媒体として使用しているスピнкаラム MonoSpin は、サンプリングの量が限られている生体試料などの前処理を迅速、簡便に処理するための固相抽出カラムとして開発された。シリカモノリスの特長である、高速通液時においても優れた分離、保持性能を有する点を生かし、高速通液においても、対象成分を安定に保持できるようにデザインされている。シリカモノリスディスクを用いることで、スピнкаラムを作製する際、充填剤をフリットで挟み込む必要がなくなり、より微量サンプルを処理する際に問題となるデットボリュームを減らすことが可能になっている。使用しているシリカモノリスディスクの体積は約 20 μL 程度であり、回収時の溶出液量も少なく抑えることが可能である (図 2)。そして、固相抽出の工程を全て短時間の遠心分離により実施することが可能である (図 3)。

シリカモノリスの表面は通常のシリカゲル同様にシランカップリング剤での修飾が可能であり、逆相用の官能基である C18 や、イオン交換基、アフィニティ担体など様々な官能基が修飾された 17 種類のラインナップを有している。これまで MonoSpin を用いた様々な前処理が開発されており^{2)~6)}、今回その一部を紹介する。

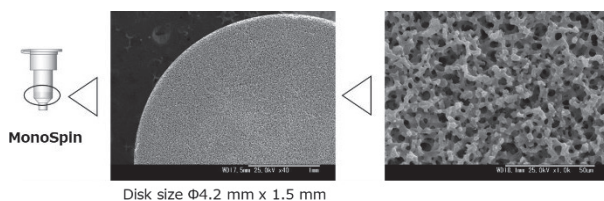


図 2 MonoSpin の構造

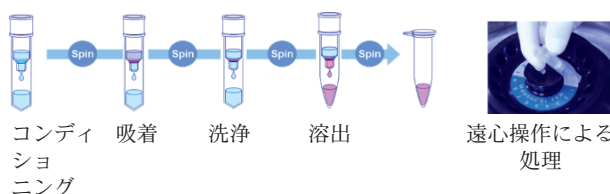


図 3 MonoSpin 遠心での使用

3 MonoSpin の使用方法例

3.1 ペプチドサンプルの脱塩

プロテオミクス解析において調製されるタンパク質の消化物には、処理に用いている高濃度の塩や、変性剤、還元剤が含まれている。これらが入った状態のまま LC/MS へ試料を導入することは避けなければならない。MonoSpin C18 を用いることで、これらの塩を効果的に除去し、ペプチドを回収することが可能である。

使用方法は表 1 に記載している内容を参考に実施する。

図 4 は MonoSpin C18 により BSA 消化物を脱塩した際のクロマトグラムを示す。上段のクロマトグラムでは、タンパク質の還元アルキル化に使用した高濃度の塩が確認されるが、MonoSpin C18 により脱塩を行うことで、塩を除きつつ、ペプチドが回収されていることが分かる。

対象分子量としては、1 万以下が主な対象となるが、比較的高分子量のタンパク質に対しても適応することは可能である。負荷量の参考としては消化物として 500 μ g 程度のペプチドを回収、精製することが可能である。高分子量のタンパク質（例えば BSA 等）は 30 μ g 程度までと、負荷量が異なるため、適用する試料に応じて確認することを推奨する。

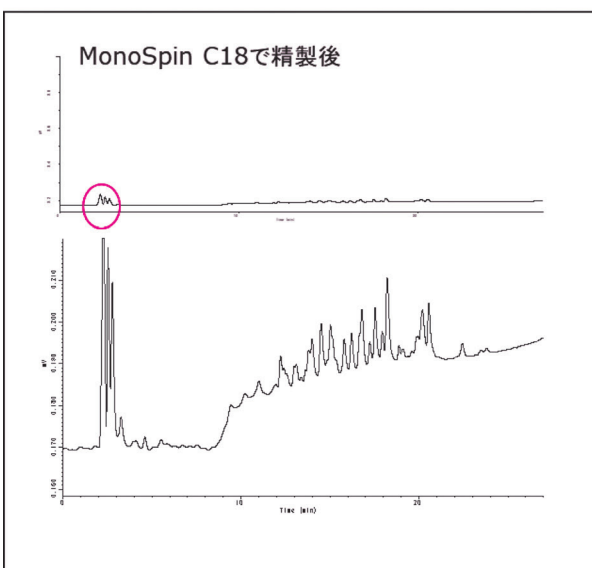
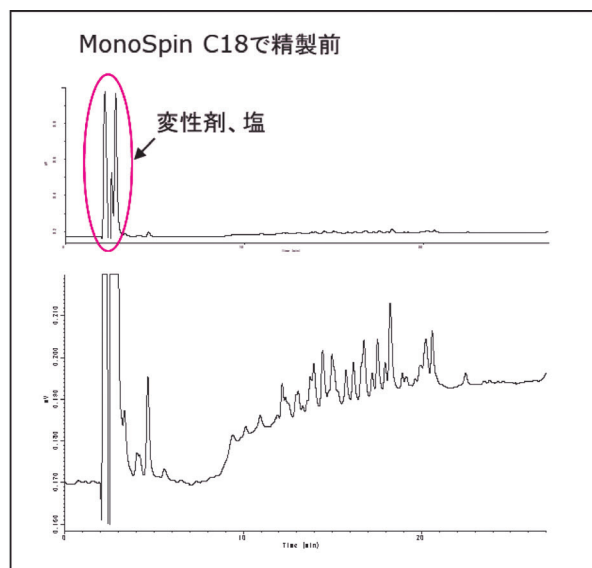
3.2 カテコールアミンの精製

生体試料中のカテコールアミンの濃度は非常に低濃度でありかつ、多くの夾雑成分を含む状態からの検出が求められる。検出器としては、UV の他、高感度検出が可能である電気化学検出器や、近年では質量分析計も用いられている。カテコールアミンは構造にシス型ジオールを有している。フェニルホウ酸基が修飾された MonoSpin PBA はシス型ジオールを有する化合物を選択的に保持させることが可能であるため、カテコールアミンの精製に効果的である。使用方法は表 2 を参考に実施する。

図 5 には MonoSpin PBA を用いたカテコールアミンの精製結果について記載する。上段のクロマトグラムは未精製の尿サンプルを電気化学検出器で検出した結果を示す。比較的选择性の高い電気化学検出器ではあるが、多数の夾雑成分が確認される。MonoSpin PBA を用いることでカテコールアミン類のみを保持、精製することが可能である。その際、サンプルのアプライ量と、溶出液量を調製することで、サンプルを濃縮しながら回収することが可能である。カテコールアミンのような分解性が懸念される化合物は濃縮乾固などの操作を繰り返すことは望ましくない。MonoSpin を用いることで、濃縮乾固を行うことなく、対象成分を濃縮することが可能である。

表 1 MonoSpin C18 を用いたペプチドの回収例

工程	溶液	液量
コンディショニング	アセトニトリル	200 μ L
	0.1% TFA 水溶液	200 μ L
アプライ		~ 800 μ L
洗浄	0.1% TFA 水溶液	200 μ L
溶出	60% アセトニトリル	200 μ L
遠心力 2300 $\times$ g, 遠心時間 1 min		



HPLC Condition

Sample: digested BSA 2 μ L
 Column: Inertsil ODS-3 (3 μ m 150 $\times$ 2.1 mm I.D.)
 Eluent A: Water(0.1 %TFA)
 B: ACN(0.1 %TFA)
 Grad A: B=90:10 – 5 min 90:10 – 20min – 50:50
 Detection : UV 210 nm
 Flow Rate: 0.2 mL/min
 Temp : 40 $^{\circ}$ C

図 4 MonoSpin C18 を用いたペプチドの脱塩

表 2 MonoSpin PBA を用いたカテコールアミンの精製例

工程	溶液	液量
コンディショニング	1. 1%酢酸水溶液	200 μ L
	2. 100 mM リン酸緩衝液 (pH8)	200 μ L
アプライ	尿または血清	200 μ L
	+ 1 M リン酸緩衝液 (pH8)	50 μ L
洗浄	100 mM リン酸緩衝液 (pH8)	200 μ L
溶出	1%酢酸水溶液	200 μ L
遠心力 10000 $\times$ g, 遠心時間 1 min		

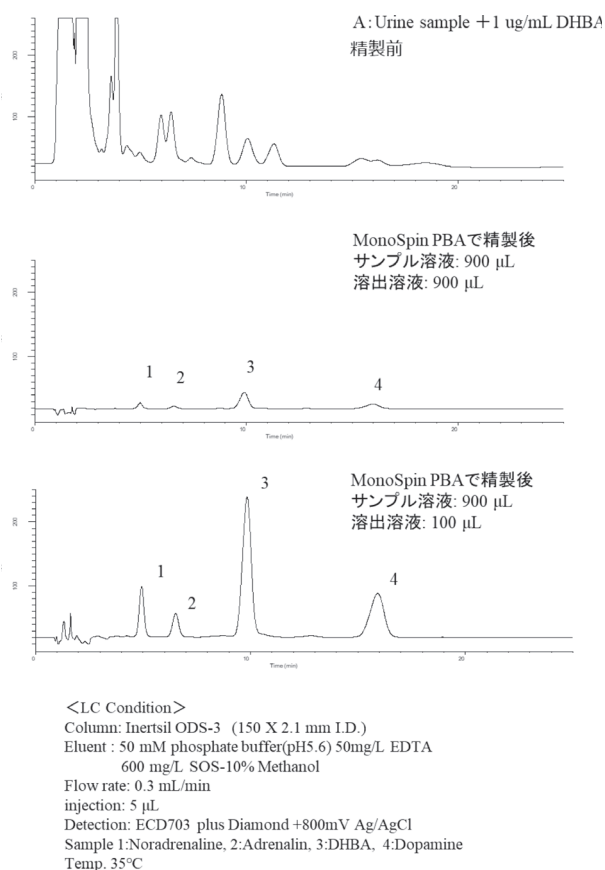


図 5 尿中カテコールアミンの前処理例

3.3 ProteinL 固定化カラムによる低分子抗体の精製

抗体精製用のリガンドとして ProteinA や ProteinG を修飾した MonoSpin ProA, MonoSpin ProG は抗体を迅速精製するためのスピнкаラムとして利用されている。MonoSpin のコンセプトである微量溶出も可能であることから、精製後の濃縮が難しい抗体サンプルを濃縮しながら精製を行うことが可能であり、特に抗体濃度が薄い場合や、微量な場合の処理に効果的である。今回新たに、ProteinL を精製用リガンドとして開発した MonoSpin ProL を紹介する。MonoSpin ProL には株式会社カネカから販売されている KANEKA KanCap L に使用されているリガンドが固定化されており、MonoSpin のコンセプトである微量溶出も可能な低分子抗体精製用のスピнкаラムになっている。使用法は表 3 を参考に実施する。

同製品 (抗体精製用の MonoSpin ProA, ProG, ProL)

表 3 MonoSpin ProL を用いた低分子抗体の精製例

工程	溶液	液量
コンディショニング	50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 + 150 mM NaCl (pH7.0)	500 μ L
アプライ	試料 (pH7 付近に調整)	500 μ L
洗浄	50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 M NaCl (pH7.0)	500 μ L
溶出	100 mM グリシン-HCl 緩衝液 (pH2.5)	500 μ L
遠心力 2300 $\times$ g, 遠心時間 1 min		

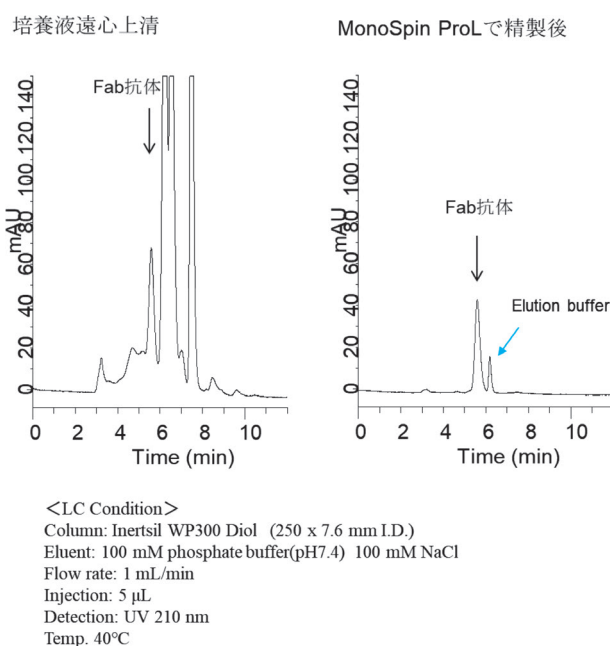


図 6 MonoSpin ProL を用いた低分子抗体の精製

には上記メソッドを実施するのに必要な溶媒類が同梱されている。溶出時には回収用チューブにあらかじめ中和用バッファーとして 1M Tris-HCl (pH8.5) を溶出液の 1/10 量入れておくことで、酸により回収された抗体を瞬時に中和することが可能である。酸に対して耐性の低い抗体についても変性リスクを軽減することが可能である。

図 6 には MonoSpin ProL を用いて低分子抗体を精製した結果を記載する。

培養液中に含まれる Fab 抗体は左のクロマトグラムの通り、多量の夾雑成分を含むことが分かる。MonoSpin ProL を用いることで、これらの夾雑成分を排除しつつ、抗体濃度を下げることなく、回収することが可能である。

4 MonoSpin の上手な使い方

MonoSpin に使用されているシリカモノリスのスルーポアは、迅速に前処理を行うことを目的に、一般的に使用される固相抽出カラムに使用しているゲルに比べて、粒子径にあたる骨格径を小さく設計している。そのため、通液性の高いシリカモノリスではあるが、固形物を

有している試料をそのまま処理するのは困難である。そのため、固形物を有するサンプルや、粘性の高いサンプルを処理する場合には、アプライ時に適宜希釈もしくはフィルトレーション後の試料を用いることを推奨している。フィルトレーションが難しい場合には、試料をあらかじめ $10000\times g$ で1分間遠心した上清を用いることで、良好なサンプル処理を行うことが可能になる。特に^{けっしょう}血漿や血清などの試料においては、見た目に固形物や浮遊物が見えなくても、遠心処理を行ったサンプルを用いることで、処理効率の改善が期待できる。

また、スピнкаラムにはふたがついているが、使用時にふたを閉めてしまうと、遠心時にカラム内が陰圧になってしまうため、スムーズな通液ができない場合がある。そのため、すべての工程において、遠心時にはふたを閉めずに使用することが推奨される。

使用方法に関しては、Webの動画でも確認することができるため、初めて使用される際は是非確認することを推奨する。

5 まとめと展望

本稿ではクロマトグラフィーの前処理として、簡便に使用できるスピнкаラム型固相抽出カラム MonoSpinを紹介した。これまで固相抽出を用いたことがない場合においても、再現性高くサンプルを処理することが可能である。処理可能な分離モードも様々ラインナップしているため、用途に応じて選択いただきたい。

文 献

- 1) M. Villagrasa, M. Guillaumon, E. Eljarrat, D. Barcelo : *J. Chromatogr. A*, **1157**, 108 (2007).
- 2) A. Namera, A. Nakamoto, M. Nishida, T. Saito, I. Kishiyama, S. Miyazaki, M. Yahata, M. Yashiki, M. Nagao : *J Chromatogr. A*, **1208**, 71 (2008).
- 3) T. Saito, R. Yamamoto, S. Inoue, I. Kishiyama, S. Miyazaki, A. Nakamoto, M. Nishida, A. Namera, S. Inokuchi : *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **867**, 99 (2008).
- 4) S. Miyazaki, T. Yamada, S. Ota, T. Saito, A. Namera, M. Ohira : *BUNSEKI KAGAKU*, **59**, 213 (2010).
- 5) M. Tsunoda, C. Aoyama, S. Ota, T. Tamura, T. : *Funatsu Analytical Methods*, **3**, 582 (2011).
- 6) S. Ota, Y. Yui, T. Sato, N. Yoshimoto, S. Yamamoto : *Analytical Sciences*, **37**, 985 (2021).



太田茂徳 (Shigenori Ota)

ジーエルサイエンス株式会社 (〒358-0032 埼玉県入間市狭山ヶ原 237-2). 山口大学大学院創成科学研究科 修了。博士 (生命科学)。《現在の研究テーマ》各種生体試料の簡便前処理法の確立。《趣味》サッカー。

E-mail : sig-ota@gls.co.jp



古庄義明 (Yoshiaki Furusho)

ジーエルサイエンス株式会社 (〒163-1130 東京都新宿区西新宿 6-22-1). 岡山大学大学院自然科学研究科修了。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》高選択分離剤を用いた微量元素分析手法と評価。《趣味》英語原書読書, 字幕無英語ドラマ鑑賞, ゴルフ。

E-mail : furusho@gls.co.jp

会社ホームページ URL :

ジーエルサイエンス株式会社ホームページ

<https://www.gls.co.jp/>

関連製品ページ URL :

MonoSpin 使用方法 (動画付)

<https://www.gls.co.jp/technique/lifescience/monospin/index.html>

MonoSpin 使用方法例

<https://www.gls.co.jp/technique/lifescience/monospin/application/index.html>