

高効率に抗体を精製可能なプロテイン G 積層固定膜の開発

有明高専創造工学科 大河平紀司

株式会社坂本石灰工業所 深浦仁美

Nobuaki Tominaga, Tadashi Okobira (National Institute of Technology, Ariake College)

Hitomi Fukaura (Sakamoto Lime Industry Co, Ltd.)

1. はじめに

プロテイン G は G 群溶血連鎖球菌の細胞壁に存在するタンパク質であり、免疫グロブリンのうち特に IgG 抗体の Fc 領域に親和性が高いという特徴から抗体のアフィニティー精製に利用されている。本研究では、電子線グラフト重合法によりプロテイン G を高分子材料である多孔性中空糸膜に高密度に固定化することで、従来の手法より更に高い効率にて抗体精製を行える機能膜の開発を目指した。

2. 実験方法

ポリエチレン (PE) 製の多孔性中空糸膜に電子線を照射し、グリシジルメタクリレート (GMA) にてグラフト重合を行うことで GMA 膜を作製後、エチレンジアミン (EDA) 溶液に浸漬することで EDA 膜を作製した。残存しているエポキシ環を開環処理した後、グルタルアルデヒド (GA) 溶液に浸漬させることで GA 膜を作製した。この膜にプロテイン G 溶液 (組み替え体) を透過することで膜内の官能基に吸着させ、固定化処理を施した。このプロテイン G 固定膜に 0.1 g/L の IgG 抗体溶液またはウサギ血清を透過し、血清中に含まれる IgG 抗体を吸着させた。リン酸緩衝液で洗浄後、ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液によりブロッキング処理を行い、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識 anti-rabbit-IgG 抗体溶液に浸漬させ、HRP 標識二次抗体を導入した。PBST にて洗浄後、3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) 溶液を膜に滴下し、発色度により抗体吸着量の評価を行った。また、プロテイン G 固定膜にウサギ血清を透過後、pH7.0

のリン酸緩衝液を透過し、非吸着成分を溶出させ、pH2.2 の 0.1 mol/L グリシン塩酸緩衝液を透過し IgG 抗体の回収を SDS-PAGE にて評価した。

3. 結果と考察

二次抗体の導入実験を行った各膜の発色度の結果を図 1 に示す。発色度の値より、プロテイン G 固定膜に IgG 抗体溶液、ウサギ血清を透過した膜について HRP 標識二次抗体由来の発色が確認された。比較対象として、GMA 膜のエポキシ環を開環させたジオール膜に IgG 抗体溶液を透過した膜、GMA 膜についてそれぞれ二次抗体を導入して発色度の測定を行ったが、いずれもプロテイン G 固定膜に IgG 抗体溶液を吸着させた膜より低い発色度を示した。このことから、膜への IgG 抗体の吸着はプロテイン G への結合によるものであること、並びに二次抗体の吸着は膜に吸着されている IgG 抗体への結合によるものであると考えられる。

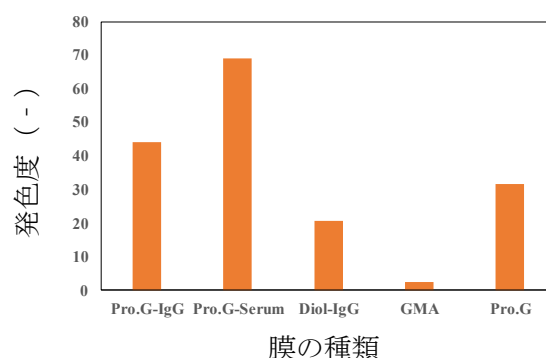


図 1 各膜の発色度の値

【謝辞】

本研究は、有明広域産業技術振興会令和3年度地場産業振興支援研究によりご支援を頂きました。ここに記し深甚なる感謝の意を表します。