

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4291572号
(P4291572)

(45) 発行日 平成21年7月8日(2009.7.8)

(24) 登録日 平成21年4月10日(2009.4.10)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 D
BO 1 J 20/24 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 C
BO 1 J 20/28 (2006.01)	BO 1 J 20/24 C
GO 1 N 21/78 (2006.01)	BO 1 J 20/28 Z
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 21/78 Z

請求項の数 82 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-561926 (P2002-561926)
(86) (22) 出願日	平成14年1月31日(2002.1.31)
(65) 公表番号	特表2004-532387 (P2004-532387A)
(43) 公表日	平成16年10月21日(2004.10.21)
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/003109
(87) 国際公開番号	W02002/061406
(87) 国際公開日	平成14年8月8日(2002.8.8)
審査請求日	平成16年10月19日(2004.10.19)
(31) 優先権主張番号	60/265,952
(32) 優先日	平成13年2月1日(2001.2.1)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	60/267,460
(32) 優先日	平成13年2月8日(2001.2.8)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	598169572
	シグマ-アルドリッチ・カンパニー
	Sigma-Aldrich Co.
	アメリカ合衆国63103ミズーリ州セン
	ト・ルイス、スプリング・ストリート30
	50番
(74) 代理人	100068526
	弁理士 田村 恭生
(74) 代理人	100096079
	弁理士 大角 美佐子
(74) 代理人	100126778
	弁理士 品川 永敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子ブルダウンおよび免疫沈降用途のための視感度を強化した改善親和性マトリックス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

水性溶液から分子を分離するための親和性マトリックスであって、粒状ポリマー支持体、その粒状ポリマー支持体の光学的検出を可能とするため該粒状ポリマー支持体の画分に共有結合させた染料、および分子を捕獲するため粒状ポリマー支持体の画分に結合させた、上記染料以外の親和性リガンドを含み、その染料と親和性リガンドが異なる粒状ポリマー支持体の画分に結合していることを特徴とする、親和性マトリックス。

【請求項2】

該染料が、粒状ポリマー支持体の1%～50%（重量）に結合し、該親和性リガンドが、粒状ポリマー支持体の50%～99%（重量）に結合している、請求項1記載の親和性マトリックス。

【請求項3】

該染料が、粒状ポリマー支持体の1%～15%（重量）に結合し、該親和性リガンドが、粒状ポリマー支持体の85%～99%（重量）に結合している、請求項1記載の親和性マトリックス。

【請求項4】

該染料が、粒状ポリマー支持体の2%～10%（重量）に結合し、該親和性リガンドが、粒状ポリマー支持体の90%～98%（重量）に結合している、請求項1記載の親和性マトリックス。

【請求項5】

10

20

染料が対照マトリックスの粒状支持体に結合していないことを除いて、対照マトリックスが親和性マトリックスと実質的に同一であり、生理的な塩およびpH条件下、天然 - 由来の哺乳動物細胞のライセートに存在する非 - 特異的結合タンパク質に対する親和性マトリックスの能力が、同一条件下で対照マトリックスの能力の50倍より小である、請求項1記載の親和性マトリックス。

【請求項6】

粒状支持体の大きさの平均が1,000マイクロメートルより小さい、請求項5記載の親和性マトリックス。

【請求項7】

粒状支持体の大きさの平均が600マイクロメートルより小さい、請求項5記載の親和性マトリックス。

【請求項8】

粒状支持体の大きさの平均が400マイクロメートルより小さい、請求項5記載の親和性マトリックス。

【請求項9】

粒状支持体の大きさの平均が200マイクロメートルより小さい、請求項5記載の親和性マトリックス。

【請求項10】

染料が、アゾ発色団含有染料、アントロキノン発色団含有染料、またはフタロシアニン発色団含有染料を含む、請求項5記載の親和性マトリックス。

【請求項11】

染料が、ビニルスルホン含有染料、モノまたはジクロロトリアジン含有染料、またはモノクロロ・ジフルオロ・ピリミジミウム含有染料を含む、請求項5記載の親和性マトリックス。

【請求項12】

染料が対照マトリックスの粒状支持体に結合していないことを除いて、対照マトリックスが親和性マトリックスと実質的に同一であり、生理的な塩およびpH条件下、天然 - 由来の哺乳動物細胞のライセートに存在する非 - 特異的結合タンパク質に対する親和性マトリックスの能力が、同一条件下で対照マトリックスの能力の10倍より小である、請求項1記載の親和性マトリックス。

【請求項13】

粒状支持体の大きさの平均が1,000マイクロメートルより小さい、請求項12記載の親和性マトリックス。

【請求項14】

粒状支持体の大きさの平均が600マイクロメートルより小さい、請求項12記載の親和性マトリックス。

【請求項15】

粒状支持体の大きさの平均が400マイクロメートルより小さい、請求項12記載の親和性マトリックス。

【請求項16】

粒状支持体の大きさの平均が200マイクロメートルより小さい、請求項12記載の親和性マトリックス。

【請求項17】

染料が、アゾ発色団含有染料、アントロキノン発色団含有染料、またはフタロシアニン発色団含有染料を含む、請求項12記載の親和性マトリックス。

【請求項18】

染料が、ビニルスルホン含有染料、モノまたはジクロロトリアジン含有染料、またはモノクロロ・ジフルオロ・ピリミジミウム含有染料を含む、請求項12記載の親和性マトリックス。

【請求項19】

10

20

30

40

50

染料が対照マトリックスの粒状支持体に結合していないことを除いて、対照マトリックスが親和性マトリックスと実質的に同一であり、生理的な塩およびpH条件下、天然 - 由来の哺乳動物細胞のライセートに存在する非 - 特異的結合タンパク質に対する親和性マトリックスの能力が、同一条件下で対照マトリックスの能力の3倍より小である、請求項1記載の親和性マトリックス。

【請求項20】

粒状支持体の大きさの平均が1,000マイクロメートルより小さい、請求項19記載の親和性マトリックス。

【請求項21】

粒状支持体の大きさの平均が600マイクロメートルより小さい、請求項19記載の親和性マトリックス。

10

【請求項22】

粒状支持体の大きさの平均が400マイクロメートルより小さい、請求項19記載の親和性マトリックス。

【請求項23】

粒状支持体の大きさの平均が200マイクロメートルより小さい、請求項19記載の親和性マトリックス。

【請求項24】

染料が、アゾ発色団含有染料、アントロキノン発色団含有染料、またはフタロシアニン発色団含有染料を含む、請求項19記載の親和性マトリックス。

20

【請求項25】

染料が、ピニルスルホン含有染料、モノまたはジクロロトリアジン含有染料、またはモノクロロ・ジフルオロ・ピリミジミウム含有染料を含む、請求項19記載の親和性マトリックス。

【請求項26】

染料が、リアクティブ・レッド21を含む、請求項19記載の親和性マトリックス。

【請求項27】

粒状支持体の大きさの平均が1,000マイクロメートルより小さい、請求項1記載の親和性マトリックス。

【請求項28】

粒状支持体の大きさの平均が600マイクロメートルより小さい、請求項1記載の親和性マトリックス。

30

【請求項29】

粒状支持体の大きさの平均が400マイクロメートルより小さい、請求項1記載の親和性マトリックス。

【請求項30】

粒状支持体の大きさの平均が200マイクロメートルより小さい、請求項1記載の親和性マトリックス。

【請求項31】

親和性マトリックスがゼラチン吸着または架橋によって修飾されている、請求項1記載の親和性マトリックス。

40

【請求項32】

染料が、アゾ発色団含有染料、アントロキノン発色団含有染料、またはフタロシアニン発色団含有染料を含む、請求項31記載の親和性マトリックス。

【請求項33】

染料が、ピニルスルホン含有染料、モノまたはジクロロトリアジン含有染料、またはモノクロロ・ジフルオロ・ピリミジミウム含有染料を含む、請求項31記載の親和性マトリックス。

【請求項34】

染料が、リアクティブ・レッド120、またはリアクティブ・ブラウン10を含む、請

50

求項 3 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 3 5】

染料が、フルオレセイン、クマリン誘導体、ピリジルオキサゾール誘導体、またはランタナイド(Lanthanide)金属キレートを含む、請求項 3 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 3 6】

染料が、ナフタレン、ピレン、ローダミン、フルオレセイン・イソチオシアナート、テルビウム錯体、ユーロピウム錯体、またはルテニウム錯体を含む、請求項 3 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 3 7】

粒状ポリマー支持体が、天然アガロース粒子、架橋アガロース粒子、架橋デキストラン粒子、またはポリアクリルアミド粒子を含む、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

10

【請求項 3 8】

架橋アガロース粒子が直径 2 0 ~ 3 0 0 マイクロメートルである、請求項 3 7 記載の親和性マトリックス。

【請求項 3 9】

架橋アガロース粒子が直径 3 0 ~ 2 5 0 マイクロメートルである、請求項 3 7 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 0】

架橋アガロース粒子が直径 4 0 ~ 1 6 5 マイクロメートルである、請求項 3 7 記載の親和性マトリックス。

20

【請求項 4 1】

天然アガロース粒子が直径 3 0 ~ 2 5 0 マイクロメートルである、請求項 3 7 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 2】

架橋デキストラン粒子が直径 2 0 ~ 4 0 0 マイクロメートルである、請求項 3 7 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 3】

ポリアクリルアミド粒子が直径 3 0 ~ 1 5 0 マイクロメートルである、請求項 3 7 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 4】

粒状ポリマー支持体に結合している染料の量が、染料 0 . 5 マイクロモル / c m ³ (ポリマー支持体) ~ 染料 2 0 マイクロモル / c m ³ (ポリマー支持体) を含む、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

30

【請求項 4 5】

粒状ポリマー支持体に結合している染料の量が、染料 1 マイクロモル / c m ³ (ポリマー支持体) ~ 染料 6 マイクロモル / c m ³ (ポリマー支持体) を含む、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 6】

粒状ポリマー支持体に結合している染料の量が、染料 2 マイクロモル / c m ³ (ポリマー支持体) ~ 染料 4 マイクロモル / c m ³ (ポリマー支持体) を含む、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

40

【請求項 4 7】

ポリマーが直径 3 0 ~ 2 5 0 マイクロメートルの架橋アガロース粒子を含み、上記架橋アガロース粒子が上記染料 1 マイクロモル / c m ³ (架橋アガロース) ~ 上記染料 6 マイクロモル / c m ³ (架橋アガロース) を有する、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 8】

ポリマーが直径 4 0 ~ 1 6 5 マイクロメートルの架橋アガロース粒子を含み、上記架橋アガロース粒子が上記染料 2 マイクロモル / c m ³ (架橋アガロース) ~ 上記染料 4 マイクロモル / c m ³ (架橋アガロース) を有する、請求項 1 記載の親和性マトリックス。

【請求項 4 9】

50

親和性リガンドが、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン、ストレプトアビジンの結合特性を有する分子、アビジン、単量体アビジン、アビジンの結合特性を有する分子、ストレプトアクチン、単量体ストレプトアクチン、ストレプトアクチンの結合特性を有する分子、エクストラビジン、単量体エクストラビジン、エクストラビジンの結合特性を有する分子、ニュートラビジン、単量体ニュートラビジン、ニュートラビジンの結合特性を有する分子、プロテインA、プロテインAの結合特性を有する分子、プロテインL、プロテインLの結合特性を有する分子、プロテインG、プロテインGの結合特性を有する分子、プロテインA/G、プロテインA/Gの結合特性を有する分子、プロテインL/A、プロテインL/Aの結合特性を有する分子、カルモデュリン、カルモデュリンの結合特性を有する分子、ビオチン、ビオチンの結合特性を有する分子、金属キレート、グルタチオン、および抗体からなる群から選ばれる、請求項1記載の親和性マトリックス。

10

【請求項50】

親和性マトリックスが、700 x gより小さい遠心分離によって溶液から集められたものである、請求項1記載の親和性マトリックス。

【請求項51】

非-着色粒状ポリマー支持体および着色粒状ポリマー支持体の混合物を含み、該着色粒状ポリマー支持体はポリマーとそのポリマーに共有結合した染料を含み、該非-着色粒状ポリマー支持体はポリマーと親和性リガンドを含む、請求項1記載の親和性マトリックス

【請求項52】

着色粒状ポリマー支持体が、親和性マトリックスの1%（容量）～95%（容量）を占める、請求項51記載の親和性マトリックス。

20

【請求項53】

着色粒状ポリマー支持体が、親和性マトリックスの2%（容量）～50%（容量）を占める、請求項51記載の親和性マトリックス。

【請求項54】

着色粒状ポリマー支持体が、親和性マトリックスの2%（容量）～10%（容量）を占める、請求項51記載の親和性マトリックス。

【請求項55】

非-着色親和性マトリックスが抗体結合マトリックスを含む、請求項51記載の親和性マトリックス。

30

【請求項56】

抗体結合マトリックスが、プロテインAアガロース、プロテインAの結合特性を有する分子で修飾されたアガロース、プロテインGアガロース、プロテインGの結合特性を有する分子で修飾されたアガロース、プロテインLアガロース、プロテインLの結合特性を有する分子で修飾されたアガロース、プロテインA/Gアガロース、プロテインA/Gの結合特性を有する分子で修飾されたアガロース、プロテインL/Aアガロース、およびプロテインL/Aの結合特性を有する分子で修飾されたアガロースからなる群から選ばれる、請求項55記載の親和性マトリックス。

【請求項57】

非-着色親和性マトリックスが、結合抗体を有するマトリックスを含む、請求項51記載の親和性マトリックス。

40

【請求項58】

結合抗体を有するマトリックスが、特定のタンパク質に対する抗体を有するマトリックスを含む、請求項57記載の親和性マトリックス。

【請求項59】

結合抗体を有するマトリックスが、融合タンパク質上の特異的ペプチドタグに対する抗体を有するマトリックスを含む、請求項57記載の親和性マトリックス。

【請求項60】

結合抗体を有するマトリックスが、タンパク質内のエピトープに対する抗体を有するマ

50

トリックスを含む、請求項 5 7 記載の親和性マトリックス。

【請求項 6 1】

抗体が、アミノ酸配列 D Y K D D D D K の少なくとも一部に対して特異性を有する抗体、抗 - ポリヒスチジン、抗 - グルタチオン - S - トランスフェラーゼ、抗 - m y c - タグ、抗 - A v i - タグ、抗 - H A、抗 - 緑色蛍光タンパク質、抗 - ベータ・ガラクトシダーゼ、抗 - チオレドキシン、抗 - マルトース結合タンパク質、抗 - セルロース結合ドメイン、抗 - V S V グリコプロテイン、および抗 - ルシフェラーゼからなる群から選ばれる、請求項 5 7 記載の親和性マトリックス。

【請求項 6 2】

非 - 着色親和性マトリックスが、結合親和性リガンドを有するマトリックスを含む、請求項 5 1 記載の親和性マトリックス。

10

【請求項 6 3】

親和性リガンドが、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン、ストレプトアビジンの結合特性を有する分子、アビジン、単量体アビジン、アビジンの結合特性を有する分子、ストレプトアクチン、単量体ストレプトアクチン、ストレプトアクチンの結合特性を有する分子、エクストラビジン、単量体エクストラビジン、エクストラアビジンの結合特性を有する分子、ニュートラビジン、単量体ニュートラビジン、ニュートラビジンの結合特性を有する分子、プロテイン A、プロテイン A の結合特性を有する分子、プロテイン L、プロテイン L の結合特性を有する分子、プロテイン G、プロテイン G の結合特性を有する分子、プロテイン A / G、プロテイン A / G の結合特性を有する分子、プロテイン L / A、プロテイン L / A の結合特性を有する分子、カルモデュリン、カルモデュリンの結合特性を有する分子、ビオチン、ビオチンの結合特性を有する分子、金属キレート、グルタチオンからなる群から選ばれる、請求項 6 2 記載の親和性マトリックス。

20

【請求項 6 4】

試料水性溶液から生体分子を分離する方法であって、水性溶液を、粒状ポリマー支持体、親和性マトリックスの光学的検出を可能とするため粒状ポリマー支持体の画分に結合させた染料、および生体分子の捕獲のための粒状ポリマー支持体の画分に結合させた、染料以外の親和性リガンドを含む親和性マトリックスと混合し、試料水性溶液から親和性マトリックスを分離することを特徴とする方法。

【請求項 6 5】

分離工程中に親和性マトリックスを光学的に観察し、親和性マトリックスの損失を避ける、請求項 6 4 記載の方法。

30

【請求項 6 6】

分離工程が、手作業で行われ、親和性マトリックスを分離工程中に可視的に観察し、親和性マトリックスの損失を避ける、請求項 6 4 記載の方法。

【請求項 6 7】

親和性リガンドが、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン、ストレプトアビジンの結合特性を有する分子、アビジン、単量体アビジン、アビジンの結合特性を有する分子、ストレプトアクチン、単量体ストレプトアクチン、ストレプトアクチンの結合特性を有する分子、エクストラビジン、単量体エクストラビジン、エクストラアビジンの結合特性を有する分子、ニュートラビジン、単量体ニュートラビジン、ニュートラビジンの結合特性を有する分子、プロテイン A、プロテイン A の結合特性を有する分子、プロテイン L、プロテイン L の結合特性を有する分子、プロテイン G、プロテイン G の結合特性を有する分子、プロテイン A / G、プロテイン A / G の結合特性を有する分子、プロテイン L / A、プロテイン L / A の結合特性を有する分子、カルモデュリン、カルモデュリンの結合特性を有する分子、ビオチン、ビオチンの結合特性を有する分子、金属キレート、グルタチオン、および抗体からなる群から選ばれる、請求項 6 4 記載の方法。

40

【請求項 6 8】

生体分子を含有する試料水性溶液を親和性マトリックスに添加する、請求項 6 4 記載の方法。

50

【請求項 69】

方法が、免疫沈降である、請求項 64記載の方法。

【請求項 70】

生体分子が、天然由来の生体分子、合成生体分子、修飾された天然由来の生体分子、または修飾された合成生体分子を含む、請求項 64記載の方法。

【請求項 71】

生体分子が、(i)ペプチド、ポリペプチド、種々のタンパク質、グリコプロテイン、酵素、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、核酸ポリマー、炭水化物、脂質、および(ii)群(i)の生体分子を含有する複合体からなる群から選ばれる、請求項 70記載の方法。

【請求項 72】

生体分子が、タンパク質を含む、請求項 70記載の方法。

【請求項 73】

試料水性溶液が、ライセート、ライセート画分、未精製生体分子を含有する緩衝液、および精製生体分子を含有する緩衝液からなる群から選ばれる、請求項 64記載の方法。

【請求項 74】

試料水性溶液がライセートを含む、請求項 64記載の方法。

【請求項 75】

方法が、さらに、親和性マトリックスが試料溶液から分離された後に、親和性マトリックスを洗浄水性溶液で洗浄し、洗浄水性溶液から親和性マトリックスを分離し、洗浄水性溶液から分離するときに、親和性マトリックスを光学的に観察する工程を含む、請求項 64記載の方法。

【請求項 76】

洗浄水性溶液が、溶解(lysis)緩衝液を含む、請求項 75記載の方法。

【請求項 77】

さらに、親和性マトリックスに結合した生体分子を解離させる、請求項 64記載の方法。

【請求項 78】

さらに、親和性マトリックスに結合した生体分子を解離させる、請求項 75記載の方法。

【請求項 79】

生体分子を、さらに分析方法にかける、請求項 77記載の方法。

【請求項 80】

生体分子を、さらに分析方法にかける、請求項 78記載の方法。

【請求項 81】

分析方法が、SDS-PAGEを含む、請求項 80記載の方法。

【請求項 82】

分析方法が、酵素試験法を含む、請求項 80記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

親和性に基づく分子プルダウン(免疫親和性捕獲)および免疫沈降の実験は、多様な生物学的システムにおけるタンパク質の発現、修飾および相互作用を研究するための強力かつ広範に使用される方法である。親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降の実験は、エピトープタグをつけた組換えタンパク質の急速精製法、可逆的翻訳後タンパク質修飾の発見と特徴づけ、および分子レベルにおける生物学的過程の理解を増大させた種々の他の観察結果をもたらした。

【0002】

親和性に基づく分子プルダウン技術の背後にある戦略は、溶液中の標的分子を選択する方法として生物分子の親和性を使用することである。抗体のような親和性リガンドがアガロースのような粒状マトリックスに付着され、生成するコンジュゲートが生物学

10

20

30

40

50

的または生化学的調製物中の特定抗原のような標的を突き止めそれに結合するために使用される。

【0003】

免疫沈降は、親和性に基づく分子プルダウン実験の一形式である。親和性に基づく分子プルダウン実験は、特定の生物分子標的に特異的親和性を有するポリマー性支持体に直接コンジュゲートした任意の親和性リガンドを用いて複合体を精製する。しかし、親和性に基づく分子プルダウン実験の一般的な手順は、免疫沈降実験に関係した手順で説明することができる。免疫沈降の基本的な手順は3つの段階を包含する。第1の段階は抗原溶液の調製である。第2の段階は非特異的背景ライセートの予備除去であり、第3の段階は免疫複合体の形成と精製である。一旦精製後は、数々の方法中任意のものを抗原の分析に使用することができる。親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降技術に使用できる種々の手順は、Harlow, E.およびLane, D.(eds.), "Antibodies: a Laboratory Manual", Chapter 7, Cold Spring Harbor Press, NY (1988)中に具体的に詳述されており、そのすべてをここに引用して明細書の記載とする。

10

【0004】

免疫沈降の実施用溶液として任意の水溶液を使用することができるが、免疫沈降は通常細胞または組織から調製したライセートに対して実施される。通常、ライセートはある種の緩和な表面活性剤で細胞または組織を処理して調製される。緩和な表面活性剤は、当抗原のコンホメーションおよび生化学的活性を破壊することなく、膜を除去し、多数の弱い分子間相互作用を妨害し、大部分の抗原を細胞から放出するのに有効である。非特異的に結合するタンパク質による妨害は、当抗原を結合しない抗体で抗原溶液を予備処理して非特異的に結合するタンパク質を除去することにより低減される。

20

【0005】

免疫複合体は、ライセートに特異的抗体を添加することにより形成される。抗体はそれぞれの対応抗原に高い親和性を有し、したがって抗体・抗原複合体の形成は迅速である。ついで複合体は、プロテインAまたはプロテインGビーズ懸濁液のような親和性ビーズ懸濁液を、抗体・抗原複合体を含有する溶液に添加することにより精製される。精製は、プロテインAおよびプロテインGが抗体のFc部分に高い親和性を有するために起る。プロテインA/G-抗体相互作用により複合体がビーズに結合した後、遠心によりビーズを集め、ビーズを洗浄して非結合タンパク質を除去する。ビーズは、溶解緩衝液のような溶液ですすぎ、吸引によりライセートと洗浄緩衝液を除去することにより、洗浄できる。洗浄緩衝液を完全に除去することが、背景を低減しイムノアッセイの効果を増強するために重要である。免疫複合体の形成および精製の完了後、生成する免疫沈降タンパク質をさらに分析することができる。しばしばこの次工程はSDS-PAGEによるタンパク質の分離である。

30

【0006】

一般に行われる親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降法の主要な欠点は、複合体形成および生成段階で使用する管内において親和性マトリックスを可視化するのが困難なことである。この可視化における難点が、効率的でない操作に導き、物質の損失と結果の定量性変動をもたらす。例えば、アガロースまたはポリアクリルアミドビーズは一般に非着色すなわち透明または白色で、管内における可視化が困難であり、このことが方法の操作を冗長にする。この貧弱な視感度のため、非結合タンパク質除去法においてライセート上清の吸引中にビーズが損失されることがある。さらに、ビーズの貧弱な視感度のため洗浄および吸引工程中に管からのアガロースまたはポリアクリルアミドビーズの偶発的除去がありうる。ビーズの貧弱な視感度のために起る難点と不正確さは、親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降実験の主要な限界である。すなわち、分子プルダウンおよび免疫沈降法におけるその機能を変更することなく親和性マトリックスの視感度を改善するような翻案に対する実質的必要性がなお存在する。このような翻案は、分子プルダウンまたは免疫沈降法を行う個人にとって親和性マトリックスの取り扱いをより容易にする。取り扱いの改善は、操作の効果改善をもたらす、物質の損失と結果の定量性変動を減少する

40

50

。要するに、このような翻案は親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降法の有効性と信頼性を改善する。

【 0 0 0 7 】

タンパク質に対するある種の染料の親和性は既知であり、ときに種々の用途に使用されてきた。染料は古くから親和性クロマトグラフィーにおけるタンパク質精製用親和性リガンドとして利用されてきた。親和性クロマトグラフィーは、支持体上に固定されたリガンドに対する物質の(非共有結合的相互作用を含む)生物特異的認識および親和性によって混合物から物質を分離する方法である。タンパク質の精製に使用されてきた染料はもともと織物工業において使用するために開発された。これらの染料は、シアヌロン酸(1,3,5-トリクロロトリアジン)化学に基づくトリアジン染料を包含する。トリアジン染料は、それらがより普遍的な固定化酵素および種々の他の生物学的基特異的媒体に比較して製造および使用の両面において利点を提供するため、親和性クロマトグラフィーのリガンドとして使用されてきた。これらの利点には、天然の生物特異的媒体のそれより顕著に高くなり得るタンパク質結合能、低いコスト、一般的入手性および製造の容易性が含まれる。例えば、Christopher R. Lowe および James C. Pearson, Affnity Chromatography on Immobilized Dyes, Methods In Enzymology, Vol. 104,97 - 113 (1984)参照。

10

【 0 0 0 8 】

U. S. Patent 5,597,485は、合成アニオン性有機染料に化学結合した重合可能な部分を含む少なくとも1種のモノマーから形成されたポリマーを含むポリマー性組成物を使用したタンパク質分離法を開示している。この染料は分離すべきタンパク質に対する親和性を有する。このタンパク質分離法は、タンパク質を染料画分に保持し、ついでタンパク質をポリマーから回収することを含む。この方法は親和性クロマトグラフィーに応用できるが、クロマトグラフィーカラムに限定されてはいない。この方法は、分離すべきタンパク質を含有する溶液にポリマーを接触させ、着色粒子をろ過、遠心または同様な手段により溶液から分離することを含む。しかし、この方法は分離すべきタンパク質に対して特異的親和性を有する染料を意図的に利用し、タンパク質はこの染料に対する特異的結合により分離精製される。

20

【 0 0 0 9 】

U. S. Patent 4,546,161は、モノまたはジクロロトリアジン染料を遊離ヒドロキシまたはアミノ基を有する固体支持体マトリックスと反応させることによる親和性クロマトグラフィー媒体の製造法を開示している。固体支持体マトリックスは、アガロース、デキストロース、デキストランもしくはアクリルアミドのポリマーまたはコポリマーである。染料はアルカリ金属水酸化物およびアルカリ金属塩の存在下に反応される。染料は、トリアジン環を介して固体支持体マトリックスに連結され、高度の特異的タンパク質結合能をもたらす。この媒体は、興味があるタンパク質に特異的に結合するように選択したトリアジン染料を使用するタンパク質の効果的および高度特異的分離用親和性クロマトグラフィーにおいて使用するために特に設計されている。

30

【 0 0 1 0 】

同様に、U. S. Patent 4,880,915は、ヒトTNFを含む溶液を染料結合架橋アガロースゲルを充填したカラムに適用し、カラムを溶離して結合したヒトTNFを放出させ、精製ヒトTNFのカラム画分を回収することを含む、特定のタンパク質であるヒトTNFの精製法を開示している。架橋アガロースゲルは、染料リガンドが共有結合した架橋アガロースゲル支持体を含む。染料リガンドは、チバクロンブルーF3GA、プロシオンレッドHE3BまたはグリーンAであり、ヒトTNFは染料リガンドと特異的に相互作用することにより保持される。染料は、核酸沈降の特定用途において物質の視感度を増強する能力のためにも使用されてきた。WO 97/12994は、指示薬分子と結合したポリマー性担体分子を添加することによる溶液からの可溶性核酸沈降法を開示している。核酸沈降技術は、核酸ペレットの視感度欠如のため、上清相の除去中に沈降した核酸ペレットを損失するのでしばしば予期しない失敗になりがちである。核酸は十分な量の塩類とアルコールを水溶液に添加して溶液からの核酸沈降を招くことにより、沈降される。アルコールと塩類は核酸沈

40

50

降技術の一般的な成分であり、エタノールが方法中で最も一般的に使用されるアルコールである。

【0011】

WO 97/12994に開示された修飾担体分子は、非修飾分子と同一の溶解度および沈降特性を有し核酸と共沈するが、容易に可視化され、使用者が処理試料中の核酸の位置を観察することを可能にする。非修飾および修飾分子両者の溶解度および沈降特性は、核酸沈降で一般に使用される沈降および遠心技術に対して特異的である。具体的には、核酸はより水性の溶液に可溶性であり、水性溶液に対するアルコールの添加のように水性溶液の誘電率が低下したとき凝集する。凝集は、水性溶液から沈降するに十分なマスを核酸に集合的にもたせる。沈降物は、溶液を約5000gの高速遠心に約5分の期間かけることにより水性溶液から分離しなければならない。したがって、修飾担体分子は別の実験に使用できず、WO 97/12994には修飾担体分子が別の技術に適用できる旨の示唆はない。逆に、この方法と担体分子は核酸沈降技術に特異的に限定されている。

10

【発明の開示】

【0012】

発明の要約

発明の目的の中に、親和性に基づく分子プルダウン実験中により容易にモニターできて分離中における親和性マトリックスの意図しない損失を回避しそれにより親和性複合体の定量的回収を改善する、相対的に低い非特異的タンパク質結合能を有する親和性マトリックスの提供がある。

20

【0013】

したがって、略述すると、この発明は、水性溶液からの分子の分離用親和性マトリックスを指向する。この親和性マトリックスは、ポリマー支持体、ポリマー支持体の画分に付着してポリマー支持体の光学的検出を可能とする染料、および分子の捕獲のためにポリマー支持体の画分に付着する染料以外の親和性リガンドを含む。

【0014】

この発明はさらに、水性溶液からの生物分子の分離法を指向する。この方法は、水性溶液をポリマー支持体を含む親和性マトリックスと合わせ、親和性マトリックスを水性溶液から分離することを含む。染料がポリマー支持体の画分に付着され、親和性マトリックスの光学的検出とモニターを可能にし、したがって分離工程中の親和性マトリックス損失の可能性を減少する。さらに、染料以外の親和性リガンドも生物分子の捕獲のためにポリマー支持体の画分に付着される。

30

【0015】

他の目的は以下から部分的に明らかであり部分的に指摘される。

【0016】

発明の詳細な記載

ここで使用する「着色ポリマー」または「着色ポリマー支持体」は、染料類を付着させたポリマー性材料を意味する。これらの染料類は好ましくは本質的にタンパク質結合性が低いか、またはタンパク質結合性が低いように修飾された染料類である。「非着色ポリマー」または「非着色ポリマー支持体」は、染料類を付着させていない、架橋アガロースのようなポリマー支持体を意味する。「着色ポリマー」または「着色ポリマー支持体」は、染料を付着させたポリマー支持体を意味する。「着色親和性マトリックス」は、着色ポリマー支持体を含む親和性マトリックスである。

40

【0017】

一実施態様において、この発明の親和性マトリックスは、染料および生物分子もしくは他の興味がある分子に対する親和性リガンドを付着させた粒状ポリマー性材料を含む。一般に、親和性マトリックスは、(i)親和性リガンドではなく染料を付着させた粒状ポリマー性材料、(ii)染料ではなく親和性リガンドを付着させた粒状ポリマー性材料、または(i)染料および親和性リガンドの両者を付着させ、ただし染料を粒状材料のある画分に付着させ親和性材料を粒状材料のある画分に付着させた粒状材料を含み得る。すなわち、例え

50

ば、親和性マトリックスは、(i)混合物中の粒子のあるものが染料を含有し他の粒子は親和性リガンドを含有するが、粒子のいずれも染料と親和性リガンドの両者を含有しない粒状材料混合物、(ii)混合物中の粒子のあるものが染料と親和性リガンドの両者を含有し他の粒子は染料または親和性リガンドを含有するが両者は含有しない粒状材料混合物、または(iii)粒子の実質的に全部が染料および親和性リガンドの両者を含有する実質的に均質な粒状材料(この実施態様においては、染料を付着させた親和性マトリックス粒状材料の画分は1であり、親和性リガンドを付着させた親和性マトリックス粒状材料の画分もまた1である)を含み得る。

【0018】

好ましくは、染料と親和性マトリックスは粒状ポリマー性材料の別の画分に付着している。例えば、染料は親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約1重量%~約50重量%に付着し得、親和性リガンドは親和性マトリックスを規定する粒状ポリマー性材料の差額すなわち親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約50重量%~約99重量%に付着している。さらに好ましくは、染料は親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約1重量%~約15重量%に結合し、親和性リガンドは親和性マトリックスを規定する粒状ポリマー性材料の差額の残りすなわち親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約85重量%~約99重量%に付着している。その上さらに好ましくは、染料は親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約2重量%~約10重量%に結合し、親和性リガンドは親和性マトリックスを規定する粒状ポリマー性材料の差額の残りすなわち親和性マトリックスを含む粒状ポリマー性材料の約90重量%~約98重量%に付着している。一般に、2つの画分の相対的比率は染料の(光学的または視覚的に測定した)色強度および非特異的タンパク質結合用粒状材料に結合したときの能力に依存する;例えば、それらが結合する粒状材料に大きな非特異的結合能力を付与する染料は、好ましくはそれらが結合する粒状材料に小さな非特異的タンパク質結合能力を付与する染料より低い比率で使用される。

【0019】

この発明で使用される染料は、好ましくはポリマー支持体に付着したとき相対的に低いタンパク質結合能力を有する染料である。一般に、これらの染料はポリマー支持体に共有結合する;したがって、染料は好ましくは反応性の基を有するかまたは反応性の基を提供するように修飾されてポリマー支持体との共有結合を可能にする能力をもつ。反応性の基の例は、モノおよびジクロロトリアジン、ビニルスルホン基、モノクロルジフルオリミジミウム、-スルファトエチルスルホン、およびイソチオシアネートを含むが限定されるものではない。アゾ、アントロキノンおよびフタロシアニンが反応性染料の範囲において優勢な発色団の主要な3タイプである。この発明で使用される染料は、染料をポリマーに付着したとき、染料が付着されたポリマー支持体を含む親和性マトリックスが光学的に検出可能で好ましくは周囲光中肉眼で容易に視覚できる限り、ポリマー支持体に任意の色を提供することができる。

【0020】

適当な染料は、また、可視化のために適切な波長の光による励起を必要とする蛍光染料のような肉眼で視覚可能な表色染料の範囲を超えた染料を含む。蛍光染料は検出に対して大幅に高い感度をもたらすが、このことはきわめて少量の親和性マトリックスで作業するときに重要である。一例は、マススペクトル法(MALDI)分析用の調製物において分子ブルダウン実験で使用される蛍光親和性マトリックスであろう。親和性マトリックス試料は適用例あたり数マイクロリットルでMALDI標的スライドに直接適用しうる。MALDI標的上の親和性マトリックス試料の存在は、適当な波長の光に露光後蛍光により視覚的に測定できるであろう。

【0021】

蛍光性分子は励起した電子状態からフォトンを発光し、吸収/励起および発光スペクトルにより特徴づけられる。蛍光染料は蛍光発光が短命または長命であり得、さらにストークスシフトおよび量子収率で特徴づけられる。フルオレスセインイソチオシアネートは、

10

20

30

40

50

発光が短命な一般的に使用される蛍光マーカーを代表し、相対的に狭いストークスシフトを有し、相対的に高い量子収率をもつ。ローダミンは別の一般的に使用される蛍光染料であり、フルオレスセインより長い波長で発光する。ランタニド金属キレートは、相対的に大きなストークスシフトを有し蛍光発光が長命な一群の蛍光化合物を代表する。この蛍光分子の重要な群は、一般に光エネルギーを転移して強い蛍光を誘導するために別の高吸収分子を必要とする。ランタニド金属の例は、多度配位子キレートにより共通してキレートされるテルビウムおよびユーロピウムである。蛍光性化合物の他の例は、ナフタレン類、ピレン類、クマリン誘導體、ピリジルオキサゾール誘導體、およびルテニウム錯体である。

【 0 0 2 2 】

一般に、ポリマー支持体に付着した染料は、本質的に低いタンパク質結合能をもつ一種(またはそれ以上)であるか、またはポリマー支持体に付着したとき低いタンパク質結合能をもつように修飾された一種(またはそれ以上)であるか、またはそれらの組み合わせである。好ましくは、親和性マトリックスは本質的に低いタンパク質結合能をもつ染料を含む。いずれの場合にも、好ましく選択された染料(類)は親和性マトリックスによる非特異的タンパク質結合を顕著に増加しない; そうでない場合、親和性マトリックスの強化した光学的検出およびモニターによる利益は分子プルダウンまたは免疫沈降法中の非特異的タンパク質結合による相殺より大きい。例えば、生理的塩類およびpH条件下における天然哺乳類細胞ライセート中に存在するタンパク質の非特異的結合に対する重量ベースの親和性マトリックスの能力は、参照マトリックスが参照マトリックスの粒状材料のいずれにも染料が結合していない点を除いて親和性マトリックスと実質的に同一の場合の、同じ条件下における参照マトリックスの能力の100倍より小さい。好ましくは、生理的塩類およびpH条件下における天然哺乳類細胞ライセート中に存在するタンパク質の非特異的結合に対する重量ベースの親和性マトリックスの能力は、同じ条件下における参照マトリックスの能力の50倍より小さい。さらに好ましくは、生理的塩類およびpH条件下における天然哺乳類細胞ライセート中に存在するタンパク質の非特異的結合に対する重量ベースの親和性マトリックスの能力は、同じ条件下における参照マトリックスの能力の10倍より小さい。その上さらに好ましくは、生理的塩類およびpH条件下における天然哺乳類細胞ライセート中に存在するタンパク質の非特異的結合に対する重量ベースの親和性マトリックスの能力は、同じ条件下における参照マトリックスの能力の3倍より小さい。

【 0 0 2 3 】

タンパク質結合性が低い染料は、好ましくはアゾ発色団、アントロキノン発色団、およびフタロシアニン発色団を有する染料から選択される。さらに好ましくは、ポリマー支持体に付着したとき低いタンパク質結合能を本質的に有する代表的な染料は、レマゾールファミリーの染料、ピニルスルホン有する染料、プロシオンファミリーの染料、モノまたはジクロロトリアジン有する染料、およびドリマレンファミリーの染料、モノクロロジフルオロピリミジミウム環を有する染料から選択しうる。適当なタンパク質結合性が低い染料の例は、5 - [(4, 6 - ジクロロ - 1, 3, 5 - トリアジン - 2 - イル) アミノ] - 4 - ヒドロキシ - 3 - (フェニルアゾ) - 2, 7 - ナフタレンジスルホン酸、ジナトリウム塩(プロシオンレッドMX - 5 B); プロシオンブルーMX - R; レマゾールバイオレットR - 4 B; プロシオンレッドMX - B R A; 5 - (アセチルアミノ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - [[2 - ヒドロキシ - 4 - [[2 - (スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ] - 2, 7 - ナフタレンジスルホン酸、銅錯塩(レマゾールブリリアントバイオレット5 R); プロシオンレッドMX - G B A; ブルーMX - 4 R D(ネービーブルー21); ブルーMX - 2 G(コバルトブルー22); ダルマファイアレッド10; 6 - (アセチルアミノ) - 4 - ヒドロキシ - 3 - [[3 - [[2 - (スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ] - 2 - ナフタレンジスルホン酸、ジナトリウム塩(レマゾールブリリアントオレンジ3 R、リアクティブオレンジ16); レマゾールブリリアントレッドB B(リアクティブレッド21); プロシオンタークオイズH - A; レマゾールブリリアントスカーレットR - 3 G; レマゾールブリリアントオレンジR - F N; およびリアクティブブルー21を含

10

20

30

40

50

むが限定されるものではない。この発明で使用する好ましいタンパク質結合性が低い染料の例は、6-(アセチルアミノ)-4-ヒドロキシ-3-[[3-[[2-(スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ]-2-ナフタレンスルホン酸、ジナトリウム塩(レマゾールブリリアントオレンジ3R、リアクティブオレンジ16)、レマゾールブリリアントレッドBB(リアクティブレッド21)、プロシオンタークオイズH-A、レマゾールブリリアントスカーレットR-3G、レマゾールブリリアントオレンジR-FN、レマゾールバイオレットR-4B、5-(アセチルアミノ)-4-ヒドロキシ-3-[[2-ヒドロキシ-4-[[2-(スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ]-2,7-ナフタレンジスルホン酸、銅錯塩(レマゾールブリリアントバイオレット5R)およびリアクティブブルー-21を含むが限定されるものではない。さらに好ましいタンパク質結合性が低い染料の例は、6-(アセチルアミノ)-4-ヒドロキシ-3-[[3-[[2-(スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ]-2-ナフタレンスルホン酸、ジナトリウム塩(レマゾールブリリアントオレンジ3R、リアクティブオレンジ16)、レマゾールブリリアントレッドBB(リアクティブレッド21)、レマゾールブリリアントスカーレットR-3G、レマゾールブリリアントオレンジR-FN、およびリアクティブブルー-21を含むが限定されるものではない。その上さらに好ましいタンパク質結合性が低い染料の例は、レマゾールブリリアントレッドBB(リアクティブレッド21)および6-(アセチルアミノ)-4-ヒドロキシ-3-[[3-[[2-(スルホオキシ)エチル]スルホニル]フェニル]アゾ]-2-ナフタレンスルホン酸、ジナトリウム塩(レマゾールブリリアントオレンジ3R、リアクティブオレンジ16)を含むが限定されるものではない。

10

20

【0024】

低いタンパク質結合性はまた染料を低いタンパク質結合能をもつように修飾することによっても達成しうる。これらの染料は、また、アゾ発色団、アントロキノン発色団、およびフタロシアニン発色団を有する染料から一般に選択しうる。また蛍光染料のような可視スペクトル中になく、およびUVスペクトルまたはIRスペクトルで視覚可能な染料も使用しうる。好ましくは、染料はレマゾールファミリーの染料、ビニルスルホン反応性基を有する染料、プロシオンファミリーの染料、モノまたはジクロロトリアジン基を有する染料、およびドリマレンファミリーの染料、モノクロロジフルオロピリミジミウム環を有する染料から選択しうる。タンパク質結合性染料の例は、リアクティブブラウン10、およびリアクティブレッド120を含むが限定されるものではない。染料を低いタンパク質結合性にする修飾は、ゼラチン吸収および架橋を含むことができる。ゼラチン吸収および架橋はタンパク質結合性染料がタンパク質に結合する部位を物理的にブロックする。したがって、それらがタンパク質に結合する部位がゼラチンによりブロックされているためタンパク質がほとんど染料に結合しない。ゼラチンはポリマー支持体に付着したタンパク質結合性染料の実際のタンパク質結合部位をブロックするように作用し、架橋はブロックしているゼラチンをポリマー支持体上にロックするように作用する。ゼラチン吸収および架橋は、着色ポリマー支持体を水調製物中のゼラチンで飽和し、ついで1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩のような適当な反応剤で架橋することにより達成することができる。この手順は共有結合で付着したリアクティブレッド120をもつビーズ上のアガロースマトリックスにゼラチンを付着するのに使用された。この手順に対する適当な修飾および別の手順の選択はすべてタンパク質結合をブロックする修飾およびそれらが達成される手順に通じた当業界で通常の技術をもつ者によってなし得るであろう。

30

40

【0025】

ポリマー支持体に付着できる染料の量は、具体的な親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降実験の目的物に応じてかなり変化できる。ポリマー支持体に付着できる染料量の上限は、ポリマー支持体の機能を変更または傷つける量である。下限はポリマー支持体の光学的または可視的検出、例えば周囲光中での視感度を可能とする染料量によって規定される。ポリマー支持体に付着する染料量を選択するための他の関係する考察は、さら

50

に親和性リガンドで修飾すべき着色ポリマー支持体の能力を含む。これらの変数を評価し、具体的分子プルダウンまたは免疫沈降実験の対象物に合うようにポリマー支持体に付着する染料の適切な量を選択することは、当然当業界における通常の実施者の技術範囲内にある。

【 0 0 2 6 】

しかし、一般にポリマー支持体に付着できる染料量は染料約 0.5 マイクロモル / ポリマー支持体 cm^3 ~ 染料約 20 マイクロモル / ポリマー支持体 cm^3 の間である。好ましくは、ポリマー支持体に付着される染料量は染料約 1 マイクロモル / ポリマー支持体 cm^3 ~ 染料約 6 マイクロモル / ポリマー支持体 cm^3 の間である。さらに好ましくは、ポリマー支持体に付着される染料量は染料約 2 マイクロモル / ポリマー支持体 cm^3 ~ 染料約 4 マイクロモル / ポリマー支持体 cm^3 の間である。

10

【 0 0 2 7 】

ポリマー支持体は、一般に、染料の付着を可能とする付着部位を含んだ親和性に基づく分子プルダウンまたは免疫沈降実験で親和性マトリックスとして使用できる任意のポリマーである。ポリマーは、好ましくは、低い非特異的タンパク質結合性を示し、それで修飾され得る染料および任意の親和性リガンドまたはタンパク質結合性リガンドの両者に高い結合能力を示す。ポリマーは天然でも合成でもよい。天然または合成ポリマーは架橋されていてもよい。このようなポリマーは、天然アガロース、架橋アガロース、デキストラン、架橋デキストラン、キシランアルギネート、キトサン、ビーズ化セルロース、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリカプロラクトン類、ポリオキシエチレン類、ポリビニル樹脂、アガロース・ポリアクリルアミドコポリマー類、およびデキストランポリアクリルアミドコポリマー類を含むが限定されるものではない。これらおよび他のポリマーの組み合わせもまた、組み合わせられてポリマーが低い非特異的タンパク質結合性および染料および親和性リガンドの両者に対する高い結合能力という意図した特性を有する限り、この発明の範囲に含まれる。好ましいポリマーは、親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降実験でしばしば使用されるものを含む。すなわち、天然アガロース、架橋アガロース、ポリアクリルアミド、および架橋デキストランがこの発明で使用するに好ましいポリマーである。架橋アガロースはこの発明で使用するのにより好ましい。ポリマー支持体は、目的とする親和性に基づく分子プルダウンまたは免疫沈降用途に適切な任意の形態をとることができる。ポリマー支持体は水性溶液に可溶性でも不溶性でもありうる。好ましくは、ポリマー支持体は水性溶液に不溶性である。多くの親和性に基づく分子プルダウンまたは免疫沈降用途において、ポリマー支持体は粒子またはビーズの形態である。すなわち、ポリマー支持体が粒子またはビーズの形態であるのが好ましい。

20

30

【 0 0 2 8 】

一般に、親和性マトリックスは、粒子が約 1,000 マイクロメートルより小さな平均寸法をもつ粒状のポリマー支持体を含む。典型的に、粒状ポリマー支持体中の粒子は約 700 ミクロンより小さな、さらに典型的に 600 ミクロンより小さい平均寸法をもつ。例えば、ある種の用途において粒状ポリマー支持体の粒子は約 400 ミクロンより小さな平均寸法をもち、別の用途において粒子は約 200 ミクロンより小さな平均寸法をもつ。

40

【 0 0 2 9 】

天然および架橋アガロース粒子は、典型的に直径が約 20 ~ 約 300 マイクロメートルにわたる。好ましくは、天然および架橋アガロース粒子は、直径が約 30 ~ 約 250 マイクロメートルにわたる。さらに好ましくは、天然および架橋アガロース粒子は、直径が約 40 ~ 約 165 マイクロメートルにわたる。ポリアクリルアミド粒子は、典型的に直径が約 20 ~ 約 200 マイクロメートルにわたる。好ましくは、ポリアクリルアミド粒子は、直径が約 30 ~ 約 150 マイクロメートルにわたる。さらに好ましくは、ポリアクリルアミド粒子は、直径が約 40 ~ 約 105 マイクロメートルにわたる。デキストランおよび架橋デキストラン粒子は、典型的に直径が約 15 ~ 約 600 マイクロメートルにわたる。好ましくは、デキストランおよび架橋デキストラン粒子は、直径が約 20 ~ 約 400 マイク

50

ロメートルにわたる。さらに好ましくは、デキストランおよび架橋デキストラン粒子は、直径が約50～約300マイクロメートルにわたる。

【0030】

すなわち、この発明で使用するに適当な着色ポリマー支持体の例は、直径が約30～約250マイクロメートルにわたり、天然アガロースの cm^3 あたり染料約0.5～約20マイクロモルを有する天然アガロース粒子である。この発明で使用するに適当な着色ポリマー支持体の他の例は、直径が約30～約150マイクロメートルにわたり、ポリアクリルアミドの cm^3 あたり染料約0.5～約20マイクロモルを有するポリアクリルアミド粒子である。この発明で使用するに適当な着色ポリマー支持体の別の例は、直径が約20～約400マイクロメートルにわたり、架橋デキストランの cm^3 あたり染料約0.5～約20

10

【0031】

この発明で使用するのに好ましい着色ポリマー支持体は、直径が約20～約300マイクロメートルにわたり、架橋アガロースの cm^3 あたり染料約1～約6マイクロモルを有する架橋アガロース粒子である。この発明で使用するのに好ましい別の着色ポリマー支持体は、直径が約20～約300マイクロメートルにわたり、架橋アガロースの cm^3 あたり染料約2～約4マイクロモルを有する架橋アガロース粒子である。

【0032】

この発明で使用するのにさらに好ましい着色ポリマー支持体は、直径が約30～約250マイクロメートルにわたり、架橋アガロースの cm^3 あたり染料約1～約6マイクロモル

20

【0033】

この発明で使用するのになおさらに好ましい着色ポリマー支持体は、直径が約40～約165マイクロメートルにわたり、架橋アガロースの cm^3 あたり染料約1～約6マイクロモルを有する架橋アガロース粒子である。この発明で使用するのに好ましい別の着色ポリマー支持体は、直径が約40～約165マイクロメートルにわたり、架橋アガロースの cm^3 あたり染料約2～約4マイクロモルを有する架橋アガロース粒子である。染料は、当業界の技術者が入手できる任意の適当な手段によりポリマー支持体に共有結合で付着しう

30

【0034】

染料は、例えば染料のあるもののトリアジン環中にある塩素原子(類)をポリマーマトリックスのあるもの上にあるヒドロキシル基で置換することにより共有結合されう。染料はまた、染料のあるもののビニルスルホン基とポリマーのあるものにあるヒドロキシル基を通じて付着しう。好ましくは、染料はポリマー支持体に直接共有結合される。しかし、好ましくはないが、染料をポリマー支持体に間接的に共有結合することも可能である。このような間接的付着は、ポリマー支持体に染料を付着する際スペーサーまたは別の分子の使用を含み得よう。典型的なスペーサーは、ヘキシルスペーサーのような炭化水素スペーサーを含む。

40

【0035】

一実施態様において、染料は当業界で知られる任意の手段によりアガロースに付着される

50

。例えば、アガロースを遠心し、繰り返し洗浄し、重炭酸ナトリウム中にけんだくしうる。ついで染料を塩化ナトリウム中に溶解し、塩/染料溶液を樹脂炭酸スラリーに添加しうる。あわせた塩/染料溶液と樹脂/炭酸スラリーをついで1時間～数時間にわたる期間(例えば25と80の間の温度で)インキュベートし、その後遠心またはろ過して上清を除きうる。着色アガロースペレットを非結合染料が除去されるまで水で繰り返し洗浄する。樹脂を適当なストック緩衝液中に再けんだくする。

【0036】

染料は、25と80の間の温度で1時間～数時間にわたる期間アルカリ性条件を使用する同様な手順を使用してもアガロースに付着しうる。アルカリ性条件は、手順中でNaOHを使用して供給することができる。結合後、ポリマーを水で繰り返し洗浄して非結合染料を除く。この手順は、アガロースにある種のプロシオンおよびレマゾール染料を付着するために使用された(Hasnaoui, M., et al., J. Chromatogr. A, 766, 49-60, 1997)。別の染料および他のポリマーを結合するとき、付着手順に当業界の技術者に明らかな適当な変更および調節をすることが必要となり得ることが理解される。

【0037】

染料を付着後、着色ポリマー支持体は、好ましくは、染料が結合していない同一ポリマーがもっていたのと同様な溶解度と遠心特性および同様な密度を有する。例えばポリマーが水性溶液に不溶の場合、好ましくは着色ポリマー支持体も水性溶液に不溶である。好ましくは、着色ポリマーもまた700×G未満の遠心により水性溶液から容易に採取できる。

【0038】

この発明の別の実施態様は、この発明の親和性マトリックスを使用する水性試料溶液からの生物分子の分離法を指向するものであり、親和性マトリックスは改善された視覚性をもち低い非特異的タンパク質結合特性を有することを特徴とする。この興味がある生物分子の分離法で使用する親和性マトリックスは、親和性リガンドで修飾された着色ポリマー支持体を含みうるか、または着色ポリマー支持体と非着色親和性マトリックスの混合物を含みうる。

【0039】

着色ポリマー支持体は、具体的な親和性に基づく分子プルダウン用途または免疫沈降用途に適した親和性リガンドで修飾することができる。しばしば使用される親和性リガンドの例は、抗体、金属キレート、グルタチオン、ストレプトアビジン、モノマー性ストレプトアビジン、ストレプトアビジンの修飾形のようなストレプトアビジンの結合特性をもつ分子、アビジン、モノマー性アビジン、アビジンの修飾形のようなアビジンの結合特性をもつ分子、ストレプトアクチン、モノマー性ストレプトアクチン、ストレプトアクチンの修飾形のようなストレプトアクチンの結合特性をもつ分子、エキストラビジン、モノマー性エキストラビジン、エキストラビジンの修飾形のようなエキストラビジンの結合特性をもつ分子、ニュートラビジン、モノマー性ニュートラビジン、ニュートラビジンの修飾形のようなニュートラビジンの結合特性をもつ分子、プロテインA、断片、組み合わせ、組換え形またはプロテインAの他の変形のようなプロテインAの結合特性をもつ分子、プロテインL、断片、組み合わせ、組換え形またはプロテインLの他の変形のようなプロテインLの結合特性をもつ分子、プロテインG、断片、組み合わせ、組換え形またはプロテインGの他の変形のようなプロテインGの結合特性をもつ分子、プロテインA/G、断片、組み合わせ、組換え形またはプロテインA/Gの他の変形のようなプロテインA/Gの結合特性をもつ分子、プロテインL/A、断片、組み合わせ、組換え形またはプロテインL/Aの他の変形のようなプロテインL/Aの結合特性をもつ分子、カルモジュリン、カルモジュリンの結合特性をもつ分子、ビオチン、およびビオチンの結合特性をもつ分子を含む。

【0040】

親和性マトリックスは同等な非着色親和性マトリックスがもつと同様な遠心および溶解特性をもち、興味がある生物分子の分離、精製、および分析に異なって機能しないので

10

20

30

40

50

、親和性リガンドで修飾された後の親和性マトリックスはすべての型の親和性に基づく分子プルダウンまたは免疫沈降法に使用するに適する。親和性リガンドで着色ポリマー支持体を修飾できる方法は当業界で技術をもつものに周知である。

【0041】

この発明の親和性マトリックスは、均等な非着色親和性マトリックスと同様な遠心および溶解特性をもち興味がある生物分子の分離および精製に全く異なって機能しないので、標準的な親和性に基づく分子プルダウン法に対する特別な調節は必要がない。しかし、親和性に基づく分子プルダウン実験(親和性捕獲)の手順は、マトリックスに固定された親和性リガンドの性質およびその標的生物分子に応じて変化する。当業界において通常の技術をもつものは、親和性に基づく分子プルダウン実験の種々の手順に充分通じている。親和性に基づく分子プルダウンの手順は下記の基本的工程をもつ。付着した親和性リガンドを有する親和性マトリックスを、興味がある生物分子を含む水性溶液とインキュベートする。相互作用の強度および持続期間を含む親和性相互作用の性質は、具体的実験または手順の対象に応じて広範に変化できる。すなわち、親和性リガンドと興味がある生物分子間の親和性相互作用は、一過性または親和性リガンドと興味がある生物分子間で特定の複合体を形成するに十分な期間であることができる。複合体が形成されるそれらの実験および手順において、複合体が付着した親和性マトリックスは遠心により水性溶液から分離される。ついで、上清を吸引し複合体を洗浄することにより、非結合タンパク質を除去する。溶解緩衝液のような溶液ですすぎ吸引によりライセートと洗浄緩衝液を除去することにより、粒子を洗浄することができる。複合体を水性溶液から分離するために過も使用しうる。ついで、興味がある生物分子を複合体から取り外すことができ、または複合体の残りの部分が親和性マトリックスに付着したまま活性を分析することができる。複合体から取り外した場合、生物分子は物理的、化学的、または機能的分析に付することができる。例えば、ついで生物分子の分子量をSDS/PAGEにより決定でき、または非結合生物分子について酵素アッセイを行うことができる。

【0042】

免疫沈降は、親和性に基づく分子プルダウン方法の1種である。免疫沈降の基本的な操作は、抗原溶液の調製、抗体-抗原複合体の形成および精製を含む。抗体-抗原複合体はライセートに特異的抗体を添加することによって形成される。各抗原に対する抗体の親和性は、抗体-抗原複合体を迅速に形成させる。親和性ビーズ懸濁液、例えば、プロテインAまたはプロテインG懸濁液は、ついで、複合体を精製するために抗体-抗原複合体を含有する水性溶液に添加される。抗体のFc部のプロテインAおよびプロテインGによって与えられる高親和性は複合体の精製を容易にする。複合体が、プロテインA/G-抗体相互作用によってポリマー支持体の粒子に結合した後、粒子が遠心分離によって水性溶液から分離される。ついで、非結合プロテインが上清液を吸引し、洗浄することによって除去される。洗液は吸引して除く。濾過を親和性マトリックスの粒子を水性溶液から分離するために用いることができる。ついで、当生体分子は複合体から除去するか、またはポリマー支持体に結合した複合体の一部の活性を分析することができる。ハーロウ(Harlow、上掲、ここに引用して明細書の記載とする)は免疫沈降実験に適切な条件を記載している。標準的な免疫沈降方法に特別な調節は必要でなく、なぜなら、着色親和性マトリックスは同じポリマーの非-着色親和性マトリックスと同様の沈降および溶解特性を持っているからであり、当生体分子の分離および精製において異なって機能しないからである。しかし、非-着色親和性マトリックスとは反対に、着色親和性マトリックスは免疫沈降方法の種々の手順中可視化される。

【0043】

着色親和性マトリックスの存在のために、親和性に基づく分子プルダウンおよび免疫沈降の方法に変更はないから、両方の方法において下記の一般的な工程が行われる。当生体分子の精製および分離の親和性に基づく分子プルダウン方法の第1工程は、当生体分子を含有する当水性溶液を、改善された視感度および低非-特異的タンパク質結合特性を有する着色親和性マトリックスと混合する。混合は着色親和性マトリックスを生体分子を含有

10

20

30

40

50

する水性溶液に添加して行うことができる。好ましくは、混合は生体分子を含有する水性溶液を着色親和性マトリックスに添加することによって行う。

【0044】

当生体分子を含有する水性溶液は、典型的にはライセート、ライセート画分、または、精製または未精製のタンパク質または他の生体分子または修飾された生体分子を含有する緩衝液であるが、他の生体分子を含有する水性溶液も用いることができる。生体分子は、天然由来または合成起源のものであってよく、またはなんらかの方法で修飾された天然由来または合成起源の生体分子であってもよい。当天然由来の生体分子には、これに限定されるものではないが、ペプチド、ポリペプチド、種々のタンパク質、グリコプロテイン、酵素、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAなどの核酸ポリマー、炭水化物、脂質、およびタンパク質を含有する複合体が含まれる。合成生体分子の例としては、これに限定されるものではないが、合成ペプチド、合成ポリペプチド、種々の合成タンパク質、合成グリコプロテイン、合成ヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAなどの合成核酸ポリマー、合成酵素、合成炭水化物、合成脂質、およびタンパク質を含有する合成複合体が挙げられる。修飾生体分子の例は、これに限定されるものではないが、酵素切断などの方法によって修飾されるかまたは、ピオチニル化またはアミノ酸エピトープタグなどの合成タグを有する、天然由来または合成の生体分子を含む。溶液はこれらの生体分子の混合物を含有していてもよい。

10

【0045】

この方法の第2工程は、着色親和性マトリックスの水性溶液からの分離を含む。着色親和性マトリックスは、典型的には水性溶液遠心分離および上清液の吸引によって分離される。しかし、具体的な実験に依存して、濾過または他の適当な方法を採用してマトリックスを水性溶液から分離することができる。遠心分離は典型的には8,000 x g、30秒またはそれ以下で行われる。しかし、免疫沈降および親和性に基づく分子プルダウン実験に適した遠心分離はかなり変更することができる。すなわち、免疫沈降および親和性に基づく分子プルダウン実験の種類および実験者の好みによって、より遅い速度の遠心分離を長期間にわたって採用することができる。同じく、短期間の場合はより早い遠心分離を採用することができる。

20

【0046】

非結合生体分子は、着色親和性マトリックスから着色親和性マトリックスを洗浄することによって除くことができる。洗液は吸引して除去する。光学的検出のために、着色親和性マトリックスは、洗浄および吸引工程中光学的にモニターされる。好ましくは、光学的モニターは周囲光中で操作者の視覚によって行われる。しかし、光学的モニターは器具または装置によってもまた、さらに自動でも行うことができる。すなわち、操作者は、洗浄工程中に、着色親和性マトリックスの位置を可視的に確認することができる。吸引によって着色親和性マトリックスの粒子を誤って除去する可能性はない。マトリックスの光学的モニターが可能なのはこの方法の信頼性を増大させ、量的な可変性を減少させる。

30

【0047】

実験の目的に依存して、首尾よい実験では、親和性相互作用によって着色親和性マトリックスに結合した当生体分子を得ることができる。当生体分子の精製および分離方法の追加の工程によって、結合生体分子が放出または処理され、その後の物理的、化学的または機能的分析が可能になる。物理的分析の例には、SDS/PAGEによる分子量測定が含まれる。生化学的分析は翻訳後修飾を含み、機能的分析には、例えば酵素試験が含まれる。

40

【0048】

当生体分子の精製および分離の親和性に基づく分子プルダウン方法に用いられる着色親和性マトリックスは、親和性リガンドで修飾された本発明の着色ポリマー支持体を含むか、または本発明の着色ポリマー支持体および非着色親和性マトリックスの混合物を含むことができる。この混合物は着色ポリマー支持体と非着色親和性マトリックスを結合させて製造される。

50

【0049】

着色ポリマー支持体および非-着色親和性マトリックスの密度、溶解度および遠心分離性を、着色親和性マトリックスが、従来の非-着色マトリックスに対して改善された光学的検出性を示すようにする。好ましくは、本発明の着色ポリマー支持体は、それが結合される非-着色親和性マトリックスと、実質的に同様の遠心分離および溶解特性、および同じ密度を有する。それらが同様の特性および密度を有するとき、着色ポリマー支持体は、非-着色親和性マトリックスに実質的に均一に分散される傾向にあり、均一な色を示し、具体的実施において、周囲光で操作者の目に見えるか、または光学検出器によって光学的に可視化され得る。均一な分散とは、着色ポリマー支持体が、混合後にむらなく非-着色親和性マトリックス内に分散され、着色親和性マトリックスの外見がマトリックスの特定の領域に色の濃淡がなくむらのないかつ均一な色であることを意味する。非-着色親和性マトリックス内の着色ポリマー支持体のこの分散は、遠心分離後も均一なままである。さらに、着色ポリマー支持体は、変化しないか、または、当分子の分離および精製における非-着色親和性マトリックスの機能を助ける。

10

【0050】

一般に、着色ポリマー支持体および非着色ポリマー支持体は、同じ種類および同じ大きさのポリマーで調製されるのが好ましい。それらが遠心分離特性、溶解度および密度の項目で十分類似していれば、着色および非-着色ポリマー支持体は異なるポリマーの種類または粒子の大きさを含むことができる。同様に、着色ポリマー支持体および非-着色ポリマー支持体はそれぞれポリマー支持体の1つまたはそれ以上の種類または大きさを含むことができる。

20

【0051】

親和性マトリックスは、ポリマー支持体の表面に広範な種類の親和性リガンドを含むことができる。例えば、親和性リガンドは分子の結合ペアのいずれであってもよく(それぞれが特定の結合ペアの構成員である)、天然由来または合成して製造される。分子ペアの一方は、その表面上に、他方の分子の特定の空間的および極性組織と特異的に結合する領域または空洞をもち、従って、相補的であると定義され、そのペアは互いに特異的に結合する性質がある。特異的結合ペアの種類例は、抗原-抗体、ピオチン-アビジン、ホルモン-ホルモン受容体、受容体-リガンド、酵素-基質およびIgG-プロテインAである。

30

【0052】

本発明の1つの態様において、ポリマー支持体は、アガロースおよびアガロースの表面に結合されているのは、プロテインA(「プロテインAアガロース」)またはプロテインAアガロースに匹敵する結合特性を有するその誘導体もしくは類似体、プロテインG(「プロテインGアガロース」)、またはプロテインGアガロースに匹敵する結合特性を有するその誘導体もしくは類似体、アガロースL(「プロテインLアガロース」)、プロテインLアガロースに匹敵する結合特性を有するその誘導体もしくは類似体、およびそれらの組合せ、例えば、プロテインA/Gアガロース、またはプロテインA/Gの結合特性を有する分子で修飾されたアガロース、およびプロテインL/Aアガロース、またはプロテインL/Aの結合特性を有する分子で修飾されたアガロースである。

40

【0053】

他の具体例において、ポリマー支持体に結合されているのは、融合タンパク質のペプチドタグまたは、タンパク質の構成員と共有することができるタンパク質内のエピトープに特異的である抗体である。マトリックスに結合し得る抗体の例には、アミノ酸配列DYKDDDDKの少なくとも一部に対して特異性を有する抗体(シグマ-アルドリッチ社製anti-FLAG(登録商標)抗体)に限定されるものではなく、抗-ポリヒスチジン、抗-グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、抗-myc-タグ、抗-Avi-タグ、抗-HA、抗-緑色蛍光タンパク質、抗-ベータ・ガラクトシダーゼ、抗-チオレドキシニン、抗-マルトース結合タンパク質、抗-セルロース結合ドメイン、抗-VSVグリコプロテイン、および抗-ルシフェラーゼが含まれる。

50

【 0 0 5 4 】

別の具体例において、ポリマー支持体に結合された親和性リガンドは、抗体ペアの構成員以外である。例えば、このような親和性リガンドには、ストレプトアビジン、単量体ストレプトアビジン、ストレプトアビジンの結合特性を有する分子、アビジン、単量体アビジン、アビジンの結合特性を有する分子、ストレプトアクチン、単量体ストレプトアクチン、ストレプトアクチンの結合特性を有する分子、エクストラビジン、単量体エクストラビジン、エクストラアビジンの結合特性を有する分子、ニュートラビジン、単量体ニュートラビジン、ニュートラビジンの結合特性を有する分子、カルモデュリン、カルモデュリンの結合特性を有する分子、ピオチン、ピオチンの結合特性を有する分子、グルタチオンおよび金属キレートが含まれる。

10

【 0 0 5 5 】

着色ポリマー支持体は、適当な方法によって非 - 着色親和性マトリックスと結合させることができる。着色ポリマー支持体は、非 - 着色親和性マトリックスと、例えば、各マトリックスをスラリーとしてピペットでとり、混合することができる。すなわち、もし、10%の着色ポリマー支持体を含有する着色親和性マトリックスを製造したいならば、50%のスラリーとして9部の非 - 着色親和性マトリックスの当量を管にピペットでとり、ついで、50%のスラリーとして1部の着色ポリマー支持体の当量を同じ管にピペットでとる。ついでスラリーを混合し、均一な懸濁液を得る。各部は容量または重量で測定する。

【 0 0 5 6 】

スラリーはまた、濾過、計量され、ついで手作業で混合され、着色親和性マトリックスが得られる。すなわち、10%の着色ポリマー支持体を含有する着色親和性マトリックスを得たいならば、下記の方法を採用することができる。非 - 着色親和性マトリックスのスラリーおよび着色ポリマー支持体スラリーをそれぞれ濾紙を用いて別々に濾過する。着色ポリマー支持体1部(重量)の当量を測定し、同じ方法で得られた9部(重量)の非 - 着色親和性マトリックスの当量を一緒にする。一緒にした着色ポリマー支持体および非 - 着色親和性マトリックスをついで適当な緩衝液に再懸濁させ、得られたスラリーを手作業で混合し、着色親和性マトリックスを得ることができる。適当な方法の選択および条件は当分野の従事者の技術範囲内に十分含まれる。

20

【 0 0 5 7 】

着色親和性マトリックス内の着色ポリマー支持体の量は、かなりの範囲で変えることができ、下記の3つの基準によって選択することができる。

30

【 0 0 5 8 】

着色親和性マトリックスは、所望により検出可能であり、非 - 着色親和性マトリックスの非特異的タンパク質結合に匹敵する非特異的タンパク質結合を示す。さらに、着色親和性マトリックスは、非 - 着色親和性マトリックスに匹敵する特異的生体分子結合を示す。所望により、検出可能とは、親和性マトリックスが、所望により機械的に、または操作者もしくは観察者による視角によるかのいずれかで検出され得ることをいう。着色親和性マトリックスは、この方法の種々の操作中に所望により検出される。非 - 特異的タンパク質結合に匹敵するとは、着色親和性マトリックスが、非 - 着色親和性マトリックスより以上に、有意に非 - 特異的タンパク質結合を示さないことを意味する。有意により大きい非 - 特異的タンパク質結合は、生体分子を標的とするその後の分析を妨害する量である。これは操作者の具体的な適用によって変化する。特異的生体分子結合に匹敵するとは、着色親和性マトリックスが、非 - 着色親和性マトリックスの免疫試験または分子プルダウン方法における当生体分子に対する親和性または結合能力と、類似の親和性または結合能力を有することをいう。

40

【 0 0 5 9 】

すなわち、特定の分子プルダウンまたは免疫沈降実験で用いられる、着色親和性マトリックス中の着色ポリマー支持体の量は、約1%(容量)～約95%(容量)の範囲で変えることができる。好ましくは、着色親和性マトリックス中の着色ポリマー支持体の量は、約2%(容量)～約50%(容量)である。より好ましくは、着色親和性マトリックス中の着色ポリマー支

50

持体の量は、約2%(容量)～約10%(容量)である。しかし、多くの変数が非 - 着色親和性マトリックスに添加されるべき着色ポリマー支持体の適当な量の決定に関与しており、これは当業者になじみのあるものである。この変数の1つは、着色ポリマー支持体中に用いられる染料の種類であり、周囲光中でのその色の強度である。すなわち、例えば、レマゾール・イエローGLなどの黄色の染料はレマゾールブリリアント・レッドBBと同じ色強度ではなく、周囲光で十分な視感度を得るために、レマゾールイエロー GL着色ポリマーはより高い%を必要とする。別の変数には、分子プルダウン技術の種類が含まれる：ある種の親和性リガンドの機能は、ポリマー支持体中の染料分子の存在により敏感な場合があり、より低い%の着色ポリマー支持体を用いて、当生体分子に対する着色親和性マトリックスの親和性および当生体分子の結合に影響を与えないようにすることができる。

10

【0060】

本発明の着色親和性マトリックスはまた、特定の分子プルダウンまたは免疫沈降実験を確認するための手段として有用である；2つの異なる分子プルダウンまたは免疫沈降実験を実験に採用されている親和性マトリックスの色によって区別することができる。すなわち、着色親和性マトリックスはまた、複数の実験の操作者を援助することができる。さらに、親和性に基づく分子プルダウンまたは免疫沈降実験においてこの明細書に記載された種類の着色親和性マトリックスの使用は、実験中の親和性マトリックスの位置を可視化およびモニターし得る能力をもたらす。この方法中で親和性マトリックスの位置を可視化またはモニターし得るこの能力は、親和性に基づく分子プルダウンまたは免疫沈降実験に関連する種々の手作業を、操作者にとってより容易にし、操作の間違いを減らすのに役立つ。

現在の親和性に基づく分子プルダウンまたは免疫沈降技術に対するこの改善は、一般にこれらの強力な技術の信頼性を大きく増大する。下記の実施例は本発明を具体的に説明するものであって限定するものではない。

20

【0061】

実施例1

着色が差異のおよび非 - 着色のマトリックスの適合性の比較

着色が差異のおよび非 - 着色のマトリックスを混合し、続いて遠心分離しそして得られたマトリックスペレットを目視観察することによって比較した。

【0062】

セファロースCL-4Bアガロース(非 - 着色)およびリアクティブ・レッド(Reactive Red)120アガロース(シグマ社製品番号R9129；赤色)を膨潤し、標準的な方法によって洗浄して平衡とし、そして20%エタノール含有のトリス緩衝生理食塩水(TBS)中の50%ゲルスラリーとして保存した。リアクティブ・レッド120アガロースを、0%、5%、10%、25%、50%、100%の非 - 着色アガロースに加え、微量遠心機管(1.5mL)中で混合し、そして標準的な微量遠心機中で30秒間遠心分離(8,000×g)した。

30

【0063】

得られたペレットを、マトリックスペレット中での着色の分布の均一性についておよび全着色の総強度について、周囲光で注意深く目視観察した。全てのペレットが均一な着色(これは、マトリックスペレット全般にわたって一様に分布することである)を示し、このことはリアクティブ・レッド120アガロースの密度および遠心分離の性質が非 - 着色アガロースのものに匹敵することを示す。リアクティブ・レッド・アガロースを含有するペレットの可視強度は、100%リアクティブ・レッド120アガロースの場合の暗赤色から5%混合物の場合の淡赤色/桃色にまで広範にわたり、そして非 - 着色アガロースのみの場合よりも可視であった。10%リアクティブ・レッド120アガロース混合物は容易に可視であり、そして最少限度に希釈した非 - 着色アガロースマトリックス(これは、実在の親和性捕獲アガロース接合体を模倣する)を用いた場合に所望する視感度を有した。

40

【0064】

本実験により、非 - 着色アガロースと混合した着色アガロースは所望の遠心分離の性質を有しており、これにより遠心分離後に、容易に可視化である均一に着色したポリマー支

50

持体のペレットを与えることを示した。

【0065】

実施例 2

タンパク質によるブロックおよび架橋

公知のタンパク質製品を用いてマトリックスピーズを飽和とし且つタンパク質をアガローススピーズ上に架橋させることにより、染料のタンパク質結合部位を遮蔽し、従って着色性アガロースマトリックスと結合することができるであろう非特異的なライセートタンパク質の量が減少するかどうかを調べた。

【0066】

リアクティブ・レッド120アガロース親和性樹脂の50%懸濁液(シグマ製品番号R0503)(2.4 mL、1.2 mLのパックド(packed)ゲル)を、各6管中に分配し、そして卓上用遠心機中、室温で5分間遠心分離(2500 × g)した。懸濁液を注意深く吸引した。各管へ水(9 mL)を加え、混合しそして上記の通り遠心分離することによって、樹脂ペレットを洗浄した。洗液の上清を吸引した。ペレットを同じ方法によって2回以上洗浄した。種々の被験用タンパク質溶液を以下に示す通り、ペレットに加えた。

管A 水中、5 mg / mLのアルブミン溶液(4 mL)。

管B 4 M NaCl中、20 mg / mLのアルブミン溶液(4 mL)。

管C 水中、20 mg / mLのゼラチン(4 mL)。

管D 水中、20 mg / mLのカゼイン加水分解物(4 mL)。

管E 水中、40 mg / mLのゼラチン加水分解物(4 mL)。

管F タンパク質混合物(5 mg / mLのアルブミン溶液(1 mL)、20 mg / mLのゼラチン(1 mL)、20 mg / mLのカゼイン加水分解物(1 mL)および40 mg / mLのゼラチン加水分解物(1 mL))(4 mL)。

【0067】

混合し、管を静かに回転させて混和しながら、4 で1時間、インキュベートした。次いで、管を上記の通り遠心分離して樹脂ペレットを集めた。上清を吸引することによってとり出し、そしてペレットを上記の通り、1回の洗浄につき水(9 mL)で3回洗浄した。最終的な洗液の上清の吸引後に、各々に水(1.2 mL)を加えることによって、ペレットを各々50%懸濁液とした(各管当たりの総容量は2.4 mL)。混合した後に、その後の分析のために、0.2 mLを各々からとり出した。

【0068】

次いで、0.1 M E D A C (1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸; シグマ製品番号E1769)中での架橋を行なって、吸収されるブロック用タンパク質を樹脂上にロックした。各樹脂管のpHを、小滴の0.1 M HClを用いてpH約5.4 ~ 5.7に調節した。懸濁した樹脂(管当たり2.2 mL)の各管に、E D A Cの新しいストック水溶液(0.47 mg / μLの89.8 μL)を加えた。静かに回転式混合しながら、管を室温で混合し、インキュベートした。反応の最初の2時間中30分毎に、pHを約5.0 ~ 5.7に再調節した。次いで、反応を終夜(約16 ~ 18時間)続けた。反応を停止させるために、管を室温で5分間遠心分離(2500 × g)した。懸濁液を吸引した後に、ペレットを上記の通り、1回の洗浄につき水(8 mL)で洗浄した。最終的な洗液の上清の吸引後に、各々に20%エタノール含有のトリス緩衝生理食塩水(1 mL)を加えることによって、ペレットを50%スラリーとして懸濁し、そしてスラリーを保存のために4 ECに置いた。各50%樹脂懸濁液(50 μLのパックドゲル)(100 μL)を、以下の擬似免疫沈降プロトコールに記載する通り、哺乳動物組織培養細胞ライセートと結合した非特異的なバックグラウンドタンパク質の量について直接に調べた。

【0069】

擬似免疫沈降プロトコール

1. マイクロチューブ(1.5 mL)中でアガローススピーズ混合物を調製して、非 - 着色アガロースとの10%染色アガロース混合物の管当たり50 μLのパックドゲルを得る。染色アガロースの50%スラリー(10 μL)を非 - 着色アガロースの50%スラリー(90

10

20

30

40

50

μ L)中に加え、渦巻き、そして氷上にセットする。

2. アガロースビーズをRIPA溶解緩衝液(50 mM トリスHCl、pH 8.0、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% DOC、0.1% SDS)中で洗浄し/平衡とする:各管にRIPA緩衝液(750 μ L)を加え、渦巻き、そして微量遠心機中で30秒間遠心分離(8,000 × g)する。上清を注意深く吸引し(または、マイクロピペットを用いて取り出す)、そしてビーズペレットを有する管を氷上にセットする。上記の通り、洗浄を繰り返す。最終的なペレットを氷上にセットする。

3. 細胞ライセート(100 mm組織培養プレート由来の新しい集密の組織培養セルラインのRIPAライセート(1 mL))を解凍し、そして氷上にセットする。存在するならば、変性DNA凝集物をピペットを用いて除く。各ライセートをマイクロチューブに移し、低温室(4)内の微量遠心機中で10分間遠心分離(8,000 × g)して、細胞デブリおよび不溶性の変性タンパク質をペレットする。透明な上清をとり出しそして氷上の管中で合わせる。

10

4. 合わせたライセートを混合し、そして1 mLを各々の洗浄したアガロースビーズ管に氷上で加える。簡単に渦巻き、低温室内に置いてインキュベートし、回転ホイール(wheeling)を用いてゆっくりと1時間混合する。

5. 微量遠心機中で30秒間遠心分離(8,000 × g)する。氷上にセットする。上清を注意深く吸引し(または、マイクロピペットを用いてとり出す)、そしてビーズペレットを有する管を氷上にセットする。

6. 各管にRIPA(750 μ L)を加えることによって、ビーズペレットを洗浄する。簡単に渦巻き、低温室内に置き、インキュベートし、回転ホイールを用いてゆっくりと5分間混合する。低温室(4)内の微量遠心機中で30秒間遠心分離(8,000 × g)する。上清を注意深く吸引し(または、マイクロピペットを用いてとり出す)、そしてビーズペレットを有する管を氷上にセットする。

20

7. 工程6と同様に、2回以上洗浄を繰り返す。

8. 各管にRIPA緩衝液(25 μ L)を加え、簡単に渦巻き、次いで2 × 層状(Laemli)タンパク質ゲル試料緩衝液(25 μ L)を加える。簡単に渦巻き。直ぐに使用しない場合には、保存のために試料を凍結する。

9. 試料を5分間沸騰させ、微量遠心管中で30秒間遠心分離(8,000 × g)して、アガロースをペレットする。各上清および分子量標準物質の10 μ Lを変性SDS/PAGEゲル上で実験する。

30

10. コロイドのブルーおよび/またはシルバー染料を用いて染色して、タンパク質バンドを可視化する。考証および/または定量化のために写真撮影または走査型撮影を行なう。

【0070】

結果:

チューブA樹脂(アルブミンでブロック)の場合には、アルブミンはリアクティブ・レッド120アガロース樹脂と結合したり、架橋した;非特異的なライセートタンパク質との結合は70~80%だけ減少した。

【0071】

管B樹脂(4 M NaCl中のアルブミンでブロック)の場合には、アルブミンはリアクティブ・レッド120樹脂と結合しなかった;非特異的なライセートタンパク質との結合は、減少しなかった。

40

【0072】

管C樹脂(ゼラチンでブロック)の場合には、ゼラチンはリアクティブ・レッド120アガロース樹脂と十分に結合したり、十分に架橋した;非特異的なライセートタンパク質との結合は、90~98%だけ減少した。

【0073】

管D樹脂(カゼイン加水分解物でブロック)の場合には、カゼイン加水分解物はリアクティブ・レッド120アガロース樹脂と結合しなかった;非特異的なライセートタンパク質

50

との結合は、減少しなかった。

【0074】

管E樹脂(ゼラチン加水分解物でブロック)の場合には、ゼラチン加水分解物はリアクティブ・レッド120アガロース樹脂と結合しなかった；非特異的なライセートタンパク質との結合は、減少しなかった。

【0075】

管F樹脂(アルブミン、ゼラチン、カゼイン加水分解物、ゼラチン加水分解物の混合物でブロック)の場合には、混合物はリアクティブ・レッド120アガロース樹脂と一部結合したり、架橋した；非特異的なライセートタンパク質との結合は、80～90%だけ減少した。

【0076】

管C樹脂(ブロックされたゼラチン)について使用する条件は、本方法を用いた非特異的なライセートタンパク質との結合を減少させるための最適な性能を与え、そして免疫沈降法および他の分子プルダウン法において十分に実施することができると合理的に想定することができる。

【0077】

実施例3

種々の染料とのアガロース樹脂接合体の非特異的なタンパク質との結合

タンパク質との結合能力について、親和性クロマトグラフィー樹脂を得るのに潜在的に有用である染料をスクリーニングした学術的な文献を参照して、いくつかの染料を選択した。染料の多数が、タンパク質と結合する能力が乏しいために、その利用に不適當であることが分かった。これらの染料のいくつかとのアガロース樹脂接合体を調製し、そして非特異的なタンパク質との結合についてそれらを調べた。

【0078】

プロシオン・レッド(Procion Red)MX-B5(アルドリッチ社製品番号404365)およびレマゾール・ブリリアント・オレンジ(Remazol Brilliant Orange)3R(アルドリッチ社製品番号306509)は、ライセートタンパク質との乏しい結合(Scopes, R. K., J. Chromatogrによる376, 131-140, 1986)およびIgGタンパク質との乏しい結合(Hasnaoui, M.らによるJ. Chromatogr. A, 766, 49-60, 1997)が報告されている染料の1つである。これらの染料を用いたアガロースの染色を、Hasnaoui, M.らによるJ. Chromatogr. A, 766, 49-60, 1997における染料固定化方法によって実施した。

【0079】

各々の固定化反応のために、セファロースCL-4Bアガロース(1mLのパックドゲル)の50%スラリー(2mL)を、卓上用遠心機中、室温で5分間遠心分離(2500×g)し、そして上清を吸引することによってとり出した。アガロース樹脂ペレットを、各々3回水洗(10mL)した。各々の洗浄のために、水を加えた後に、管を混合し、上記の通り2.5分間遠心分離し、そして上清を吸引によって注意深くとり出した。

【0080】

洗浄したアガロース樹脂ペレットを、固定化溶液(2%NaClを含有する200mM NaOH)(10mL)中で3回洗浄することによって平衡とした。各々の洗浄のために、固定化溶液を加えた後に管を混合し、上記の通り2.5分間遠心分離し、そして上清を吸引によって注意深くとり出した。

【0081】

プロシオン・レッドMX-B5またはレマゾール・ブリリアント・オレンジ3R染料(21mg)の固定化溶液(2mL)を、平衡としたアガロースペレットに加え、混合し、そして静かな回転によって絶えず混合しながら60の湯浴中で1時間インキュベートした。

【0082】

反応を停止させ、洗液の上清が完全に透明で無色になるまで、1回の洗浄につき水(10mL)で連続して洗浄することによって、非結合染料を除去した。最終的な洗液の上清

10

20

30

40

50

をとり出した後に、着色アガロースペレットを20%エタノール含有のトリス緩衝生理食塩水(1 mL)中に懸濁させて50%スラリーを得て、このものを使用するまで4 で保存した。

【0083】

実施例2の擬似免疫沈降プロトコールに記載する通り、哺乳動物組織培養細胞ライセートと結合した非特異的なバックグラウンドタンパク質の量について、各50%樹脂懸濁液(50 µLのパックドゲル)(100 µL)を直接に調べるか、または10%で非-着色アガロースと混合したものを調べた。

【0084】

結果：

100%プロシオン・レッドMX-5Bアガロースは、非特異的なバックグラウンドタンパク質との結合がコントロールのリアクティブ・レッド120アガロースと比較して70~80%だけ減少し、そしてゼラチンでブロックされ且つEDACを用いて架橋されたリアクティブ・レッド120アガロース(実施例2を参照)の場合に匹敵することを示した。100%レマゾール・プリリアント・オレンジ3Rアガロースは、非特異的なバックグラウンドタンパク質との結合がコントロールのリアクティブ・レッド120アガロースと比較して>95%だけ減少することを示した。アガロース中の10%混合物として使用する場合には、レマゾール・プリリアント・オレンジ3Rアガロースはなお全く可視であるが、非特異的なバックグラウンドタンパク質との結合においては有意な差異は全く示さず、そして非-着色アガロースのみ(100%セファロースCL4B)の場合に匹敵した。

【0085】

上記の方法は、本発明に必要とされる所望の視感度、遠心分離および非常に低いタンパク質結合能力の性質を有する可視アガロース樹脂を製造することができたことを示した。

【0086】

実施例4

炭酸塩を用いる反応性染料とアガロースとのカップリング反応

染料とアガロースとのカップリング反応の別方法は、炭酸塩中でカップリング反応を実施することを含む。各カップリング反応について、セファロースCL-4Bアガロース(1.75 mLのパックドゲル)の50%スラリー(3.5 mL)を管に分配し、そしてこれらを卓上用遠心機中、室温で5分間遠心分離(2500 x g)した。各上清を吸引によってとり出した。アガロース樹脂ペレットを各々、実施例2に記載する通り、3回水洗(10 mL)し、そして最終的な洗液の上清を吸引によってとり出した。アガロース樹脂ペレットを各々、0.4 M炭酸ナトリウム(Na_2CO_3)の0.5パックドゲル容量(0.85 mL)中に懸濁した。

【0087】

プロシオン・レッドMX-B5(アルドリッチ社製品番号404365)およびレマゾール・プリリアント・オレンジ3R(アルドリッチ社製品番号306509)を各々、20 mg/mLパックドゲルで秤量(各々35 mg)し、そして各々を0.68 M NaCl の0.5パックドゲル容量(0.85 mL)に溶解した。各カップリング反応について、各々の染料/塩溶液(0.85 mL)を、上記由来のアガロース/炭酸塩のスラリー(0.85 mL)を含有する管中に加えた。各カップリング反応管を、十分に且つ絶えず混合するために静かに振り混ぜながら、湯浴中、60 でインキュベートした。

【0088】

各反応を停止させ、そして非結合染料を遠心分離によって除去し、吸引し、そしてアガロースペレットを上記の通り、洗液の上清が完全に透明で且つ無色になるまで、1回の洗浄につき水(10 mL)でアガロースペレットを連続して洗浄した。最終的な洗液の上清をとり出し、着色アガロースペレットを20%エタノール含有のトリス緩衝生理食塩水(1 mL)中に懸濁して50%スラリーを得て、そしてこのものを使用するまで4 で保存した。

【0089】

実施例 2 の擬似免疫沈降プロトコールに記載する通り、哺乳動物組織培養細胞ライセートと結合した非特異的なバックグラウンドタンパク質の量について、各 50 % 樹脂懸濁液 (50 μ L のパッドゲル)(100 μ L) を直接に調べるか、または 10 % で非 - 着色アガロースと混合したものを調べた。

【0090】

結果：

結果は、実施例 3 の結果と非常に類似した。100 % プロシオン・レッド MX - 5 B アガロースは、非特異的なバックグラウンドタンパク質との結合がコントロールのリアクティブ・レッド 120 アガロースと比較して 70 ~ 80 % だけ減少し、そしてゼラチンでブロックされ且つ E D A C を用いて架橋されたリアクティブ・レッド 120 アガロースの場合に匹敵することを示した(実施例 2 を参照)。100 % レマゾールブリリアントオレンジ 3 R アガロースは、非特異的なバックグラウンドタンパク質との結合がコントロールのリアクティブ・レッド 120 アガロースの場合と比較して > 95 % だけ減少することを示した。アガロース中の 10 % 混合物として使用する場合には、レマゾール・ブリリアント・オレンジ 3 R アガロースはなお全く可視であるが、非特異的なバックグラウンドタンパク質との結合は全く検出し得ないことを示し、そして非 - 着色アガロースのみ(100 % セファロース CL - 4 B) の場合に匹敵した。

【0091】

本方法により、アルカリ溶液を必要とせずに、本発明に要求する所望する視感度、遠心分離および非常に低いタンパク質結合能力の性質を有する可視アガロース樹脂の製造が可能となる。

【0092】

実施例 5

免疫沈降法における着色した親和性マトリックスの使用

レマゾール・ブリリアント・レッド BB を、実施例 4 に記載する方法を用いてアガロース(セファロース CL - 4 B) とカップリングさせた。得られた着色樹脂であるブリリアント・レッド BB アガロースについて、実施例 2 の擬似免疫沈降プロトコールに記載する通り、哺乳動物組織培養細胞ライセートと結合した非特異的なバックグラウンドタンパク質の量を調べた。100 % レマゾール・ブリリアント・レッド BB アガロースは、非特異的なバックグラウンドタンパク質がコントロールのリアクティブ・レッド 120 アガロースと比較して > 95 % だけ減少することを示した。アガロース中の 10 % 混合物として使用する場合には、レマゾール・ブリリアント・レッド BB アガロースはなお全く可視であるが、非特異的なバックグラウンドタンパク質との有意な結合は全く示さず、そして非 - 着色アガロースのみ(100 % セファロース CL - 4 B) の場合に匹敵した。

【0093】

レマゾール・ブリリアント・レッド BB アガロースの可視化としての性能は、親和性ベースの分子プルダウン法を以下の免疫沈降実験において評価するのを助ける。実験は、哺乳動物細胞のライセート中にスパイクした組換え融合タンパク質の免疫沈降について、標準的な非 - 着色プロテイン A アガロース(レッド・プロテイン A アガロース)中の 10 % レマゾール・ブリリアント・レッド BB アガロースを、100 % 標準非 - 着色プロテイン A アガロース(シグマ社製品番号 P3391 ; 非 - 着色プロテイン A アガロース)と比較した。

【0094】

COS7 組織培養細胞を 100 mm 組織培養プレート中で集密まで増殖し、氷冷リン酸緩衝生理食塩水(10 mL)を用いて簡単に 2 回洗浄した。第 2 の洗浄溶液をプレートから吸引した後に、氷冷の RIP A 溶解緩衝液(1 mL)を各プレートに加え、細胞を溶解し、細胞スクレーパー(scraper)を用いて収集した。ライセートを各プレートからとり出し、そして氷上で貯蔵した。試料(1 mL)を管に分配し、素早く凍結しそして保存のために -70 に置いた。

【0095】

レッド・プロテイン A アガロースまたは非 - 着色プロテイン A アガロースの 50 % スラ

10

20

30

40

50

リーのアリコート(100 μ L)を、マイクロチューブ(1.5 mL)に分配し、そして1回の洗浄につきRIPA溶解緩衝液(750 μ L)で4回洗浄した。最終的な洗液の上清をとり出した後に、洗浄したアガロース樹脂ペレットを有する管を氷上にセットした。

【0096】

凍結ライセートを解凍し、このものを実験の直前に氷上にセットした。変性DNA(粘性(slimy)凝集物の形態)を、ピペットを用いて各ライセート試料(1 mL)から手動でとり出した。哺乳動物プロテアーゼインヒビターカクテル(シグマ社製品番号P8320)(100 μ L)を各々に加え、そして試料を渦巻くことによって簡単に混合した。細胞デブリおよび変性タンパク質沈降物を、マイクロチューブ中、4 で10分間遠心分離(8,000 \times g)することによって除去した。透明な上清を注意深くとり出し、そして免疫沈降のために清潔な管に移した。

10

【0097】

清澄したライセートの管の半分について、N-末端FLAG-BAP(細菌アルカリ性ホスファターゼ)精製の組換え融合タンパク質(シグマ社製品番号P7582)(5.4 μ g/ μ L)(1.2 μ L)を各々に加え、静かに混合しそして氷上にセットした。抗BAPマウスモノクローナル抗体BAP-77(2.6 mg/mL;シグマ社製品番号B6804)(3.85 μ L)を清澄したライセートの各管に加え、そして静かに混合した。抗体-抗原複合体を生成することができるように、管を4 で1時間回転によって混合した。管を5秒間遠心分離し、そして各々の全内容物をピペットを用いて氷上の洗浄したアガロース樹脂ペレットの別個の管に移し、そして簡単に混合した。抗体-抗原複合体をプロテインAアガロースと結合することができるように、管を4 で1時間回転によって混合した。

20

【0098】

インキュベート後に、アガロース樹脂をマイクロチューブ中、4 で30秒間遠心分離(8000 \times g)することによって集め、そして上清を吸引によってとり出した。各ペレットを1回の洗浄につき氷冷RIPA緩衝液(750 μ L)を用いて4回洗浄した。各洗浄について、ペレットを4 で5分間回転することによって混合し、上記の通り遠心分離し、そして上清を吸引した。最終的な洗液の上清をとり出した後に、RIPA緩衝液(25 μ L)を各々に加え、そして簡単に混合した。次いで、2 \times 層状タンパク質ゲル試料緩衝液(シグマ社製品番号S3401)(25 μ L)を各々に加え、混合し、そして得られた試料を5分間沸騰させてアガロース樹脂からタンパク質を遊離させた。

30

【0099】

試料を簡単に遠心分離してアガロース樹脂をペレットし、そして各上清の10 μ LについてSDS/PAGE変性ゲル電気泳動を行ない、そしてウェスタン免疫プロット法によって分析した。ウェスタンプロット法は、アルカリ性ホスファターゼと接合した抗FLAG M2モノクローナル抗体をプローブとし、続いて標準的なNBT/BCIP比色検出をすることによって行なった。

【0100】

結果：

レッド・プロテインAアガロースペレットは周囲光で非常に可視であり、一方で非-着色プロテインAアガロースペレットは見るのが困難であった。レッド・プロテインAアガロースの高い視感度は、全ての操作を容易にし、そして吸引間、ペレットの偶発的な除去によって間違いが生じる傾向が少ない。レッド・プロテインAアガロースA免疫沈降物は、非-着色プロテインAアガロース免疫沈降物の場合と同程度に、N-FLAG-BAPタンパク質についてのイムノプロット上のシグナル強度を示し、非特異的なバックグラウンドの検出可能な増大は全くなかった。従って、本発明は、標準的な方法と等価な性能を供する一方で、親和性ベースの分子プルダウン法、免疫沈降法を著しく容易にするものである。

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	27/26	3 0 1 B
G 0 1 N 33/548	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/53	U
		G 0 1 N	33/548	A

(72)発明者 エドワード・ピー・ワトソン・ザ・サード
 アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スプルース・ストリート3050番、シグ
 マ・アルドリッチ・カンパニー内

(72)発明者 ケネス・イー・ヒューアーマン
 アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スプルース・ストリート3050番、シグ
 マ・アルドリッチ・カンパニー内

(72)発明者 ジョン・ジー・ダブロン
 アメリカ合衆国63103ミズーリ州セント・ルイス、スプルース・ストリート3050番、シグ
 マ・アルドリッチ・カンパニー内

審査官 吉田 佳代子

(56)参考文献 特開平04-166767(JP,A)
 特開平02-103468(JP,A)
 特開昭64-072754(JP,A)
 特開昭59-051938(JP,A)
 国際公開第00/007019(WO,A1)
 特開平10-048210(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/543

专利名称(译)	改进的亲合力矩阵用于分子下拉和免疫沉淀应用的可见性增强		
公开(公告)号	JP4291572B2	公开(公告)日	2009-07-08
申请号	JP2002561926	申请日	2002-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	西格玛-奥吉奇公司		
申请(专利权)人(译)	西格玛 - Aldrich公司		
当前申请(专利权)人(译)	西格玛 - Aldrich公司		
[标]发明人	エドワードビーワトソンザサード ケネスイーヒューアーマン ジョンジーダブロン		
发明人	エドワード・ビー・ワトソン・ザ・サード ケネス・イー・ヒューアーマン ジョン・ジー・ダブロン		
IPC分类号	G01N33/543 B01J20/24 B01J20/28 G01N21/78 G01N27/447 G01N33/53 G01N33/548 B01D15/00 B01J20/286 B01J20/32 C07K1/22 C12Q1/68		
CPC分类号	B01D15/00 B01D15/3804 B01D15/3809 B01D15/3823 B01J20/28004 B01J20/286 B01J20/32 B01J20/ /321 B01J20/3212 B01J20/3242 B01J20/3274 B01J20/3282 C07K1/22 C12Q1/6837 G01N33/543 G01N33/54313 G01N33/582		
FI分类号	G01N33/543.581.D G01N33/543.581.C B01J20/24.C B01J20/28.Z G01N21/78.Z G01N27/26.301.B G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/548.A		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
优先权	60/265952 2001-02-01 US 60/267460 2001-02-08 US		
其他公开文献	JP2004532387A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于基于亲和力的分子下拉和免疫沉淀方法的亲和基质。亲和基质包含聚合物载体，与一部分聚合物载体结合的染料以允许聚合物载体的光学检测，结合到聚合物载体的一部分以捕获分子的染料其他亲和配体。还提供了一种从水溶液中分离生物分子的方法。该方法包括将水溶液与包含聚合物载体的亲和基质混合，并将亲和基质与水溶液分离。染料与聚合物载体的一部分结合，这允许光学检测和监测亲和基质，从而降低分离过程中亲和基质损失的可能性。