

生体試料分析

生体由来の試料には微量成分から高濃度成分まで、低分子から高分子まで、幅広い物質が含まれている。その中で、診断などに用いられる疾患関連分子（疾患マーカー）は微量であることが多く、その測定には高感度と高特異性、あるいは高分離能な分析手法が求められる。加えて、多検体を効率よく測定するためには、測定時間が短い方が望ましい。本講演では、キャピラリー電気泳動法（Capillary Electrophoresis, CE; 高分離能、短時間分析）とLED励起蛍光検出（LED Induced Fluorescence, LEDIF; 高感度）を組み合わせた測定系（CE-LEDIF, 図1）を用いた高感度生体試料分析とその応用例について紹介する。

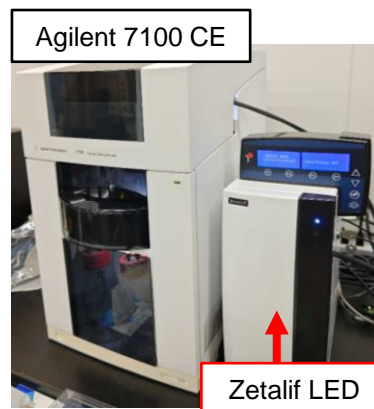


図1. CE-LEDIF 装置外観.

CE-LEDIF

本講演で紹介する CE 装置（Agilent 7100CE）と検出器（Zetlif LED）を接続すると、CE 装置側のコントロールパネルに検出器が同期される。また、CE 装置搭載のフォトダイオードアレイを用いた吸光検出と Zetlif による蛍光検出が、1つのアプリケーションで同時に制御・実行できる（図2）。LED 波長は 275, 365, 450, 580, 530, 640 nm から測定試料に合わせて1つ選択でき、Agilent 7100CE を所持していれば、蛍光検出器搭載型 CE 装置の新規購入よりは安価に蛍光測定を導入できる。



図2. カートリッジ内の検出部.

測定例

- モノクローナル抗体（NISTmab）の CE-LEDIF 分析*（励起波長: 275 nm, 検出波長: 300~450 nm）
 - 抗体のアイソフォーム解析, UV 吸収検出と蛍光検出のパターン一致 + 10倍以上の高感度化
(* H. Zagst, et al., Separations 2023, 10, 320.)
- 血清中 Cell-free DNA の CE-LEDIF 分析**（励起波長 480 nm, 検出波長 > 500 nm）
 - 血清中のスパイク DNA 分析, 煩雑な前処理なく血清試料を CE 分析, がん診断への応用
(** dyed by Sybr Green I; A. Boutonnet, et al., Anal. Chem. 2023, 95, 9263.)

応用例 (励起波長: 480 nm, 検出波長: > 500 nm)

- 核酸アプタマー***と生体分子間の相互作用解析
*** 標的分子特異的結合能を持つ一本鎖核酸

エクソソーム標的アプタマーを選抜後、選抜されたアプタマー候補群とエクソソームとの結合能評価を行った。得られた候補群のCE-LEDIF分析の結果、いずれもエクソソーム添加時に複合体形成を示唆するピークが多数検出された（図3）。

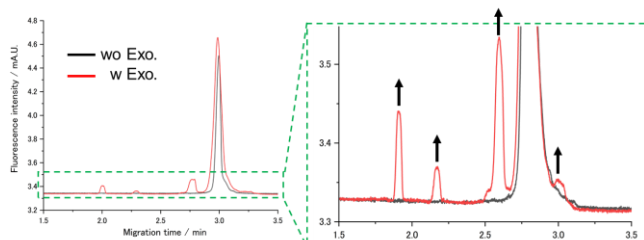


図3. エクソソームアプタマー候補の結合能評価の例.

- 修飾アプタマーの機能評価

アプタマーの更なる高機能化を目指して、いくつかの人工修飾を施したアプタマーを調製した。生体適合性材料であるアガロースにアプタマーを修飾したものに対して、CE-LEDIF分析を行った結果、アプタマー未添加時と比して添加時にはピークのブロードニングおよび複合体形成を示唆するピークが観測された（図4）。

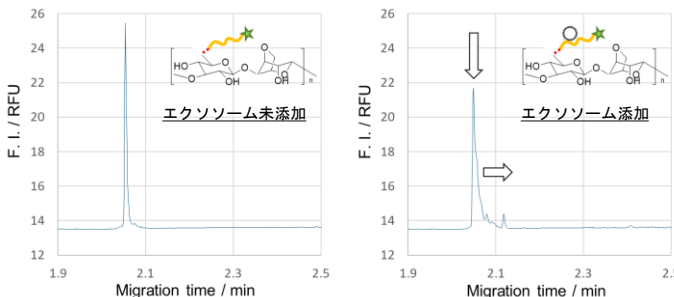


図4. アプタマー修飾アガロースの結合能評価の例.

展望

感度と分離性能の両立が可能なCE-LEDIF（あるいはレーザー励起蛍光, LIF）は、微量かつ帯電した試料が多い生体試料分析において、特に今後活躍する場が拡大するものと期待される。