

アプタマー分析

Application Note: AN 2.005-V1

アプタマーは、DNA配列のランダムライブラリーから選択されたDNA（またはRNA）オリゴヌクレオチドです。このオリゴヌクレオチドは三次元構造に折り畳まれ、異なるクラスのターゲットに高い親和性と選択性で結合します。アプタマーが選択される可能性も、選択されたアプタマーの品質も、回収方法の選択に大きく依存します。このアプリケーションノートでは、CE-UV-LEDIF検出/non-SELEXを用いたアプタマーの選択方法を紹介します。non-SELEXでは、CEを用いた分割を繰り返し行いますが、その後の増幅や鎖分離は必要ありません。

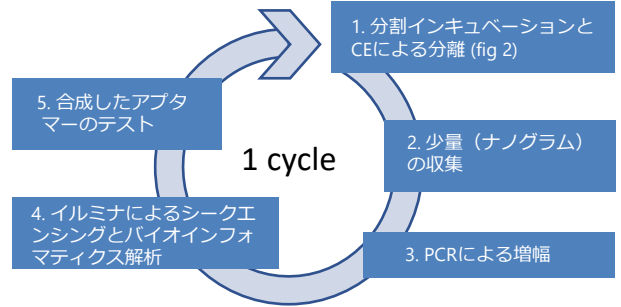


Figure 1: CE-UV-LEDIF アプタマー分析

装置:

キャピラリー電気泳動: Agilent Technologies 7100 CE
検出器: Picometrics ZETALIF LED 480 nm/30 nm

サンプル:

FAM (6-カルボキシフルオレセイン) で標識したT29アプタマー (fig 4) UV吸光度 (210 nm) でトロンビンを検出 (fig 3)

前処理:

サンプルは95 °Cで5分間加熱して変性させ、室温に戻しました。トロンビンをT29アプタマーと混合し、キャピラリーに注入しました。すべてのサンプルは、Tris-HCl 50 mM + NaCl 100 mM + MgCl₂ 1 mMの混合液で希釈しました。

- メソッド:**
- キャピラリー: 90 cm x 50 μm ID (有効長: 19 cm)
 - 泳動バッファー: Na₂HPO₄
 - 電圧: +20 kV
 - 注入: 50 mbars, 30 s
 - カセット温度: 25 °C

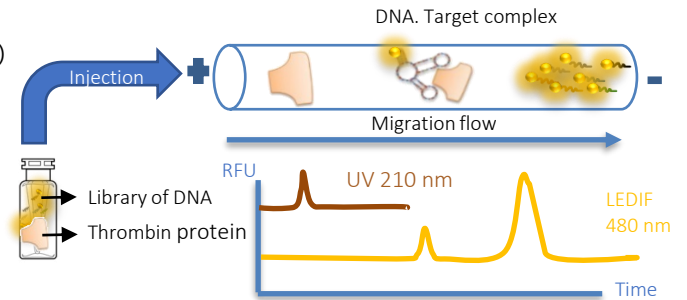


Figure 2: CEによるアプタマーの選択とUV検出およびLEDIF検出による二重検出法

UVとLEDIFの二重検出により、トロンビン (T_mUV=9分、fig 3) とT29アプタマー (T_mLEDIF=18分、fig 4) の移動時間を決定することができます。複合DNAターゲットは中間的な移動時間を持ちます (fig 5)。

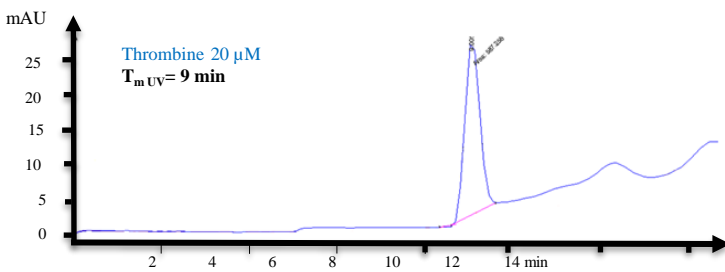


Figure 3: 20 μMのトロンビンのUV吸光検出 (210 nm) によるエレクトロフェログラム

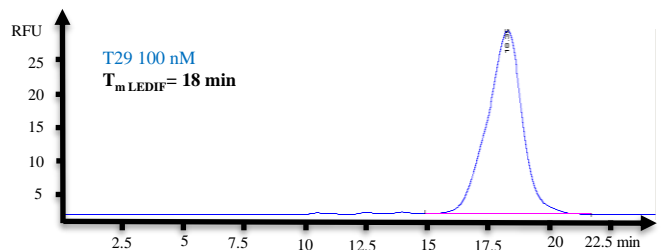


Figure 4: 100 nMのT29アプタマーのLEDIF検出 (480 nm) によるエレクトロフェログラム

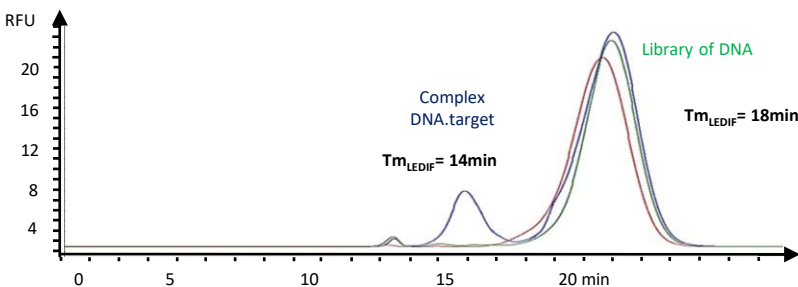


Figure 5: 100 nMのT29アプタマー (赤)、DNAライブラリー (緑)、トロンビン+DNAライブラリー+T29アプタマー (青) の分析

結論:

このアプリケーションノートでは、タンパク質、複合DNAタンパク質、およびDNAライブラリーの分離方法を示しました。UVとLEDIFの二重検出により、各成分の移動時間がわかります。キャピラリー電気泳動によるアプタマーの回収方法はアプリケーションノートAN 2.006に記載されています。