

# アプタマーの回収方法

## Application Note: AN 2.006-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、回収パラメータを標準混合物で最適化し、解離速度定数 ( $k_{off}$ ) がより遅くなるように、移動時間の小さな範囲で回収方法を検証しました。

## キャピラリー電気泳動による回収方法

回収方法を標準化する目的で、APTSで標識したグルコース (DP1)、マルトース (DP2)、マルトトリオース (DP3) の3種類の糖の混合物を分析しました。  $c_i = 10^{-7}$  mol/Lで100 nLのプラグを注入し、各移行時間を測定しました。

その後、回収方法を設定し、8回の回収を行いました。回収したサンプルは、再度注入し、回収量と再現性を評価しました (fig 2)。

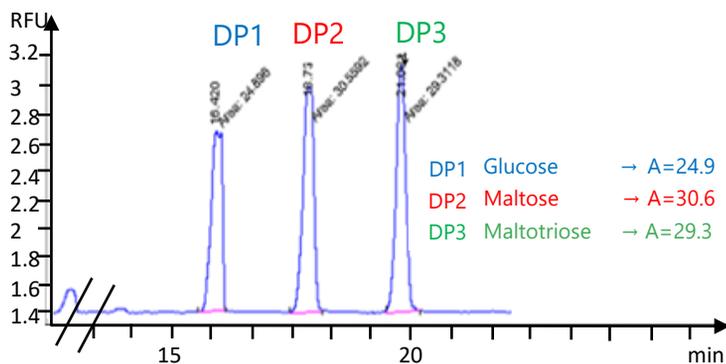


Figure 1 : CE-UV-LEDIFによる3種類の糖の分析 ( $t_m$ : 移動時間、A: 面積)  
 DP1  $t_m = 16.4 \text{ min}$  -  $A1 = 24.9$ ; DP2  $t_m = 18.7 \text{ min}$  -  $A2 = 30.6$ ; DP3  $t_m = 21.1 \text{ min}$  -  $A3 = 29.3$

### 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:

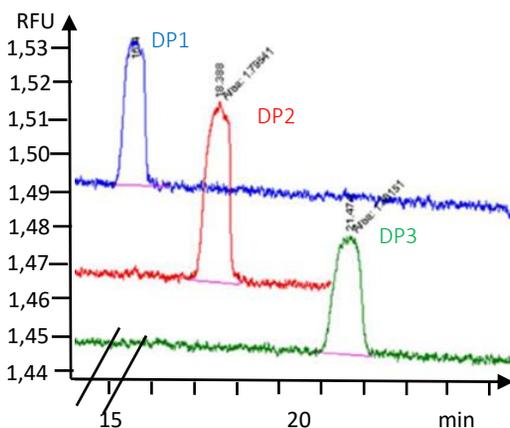
グルコース (DP1)、マルトース (DP2)、マルトトリオース (DP3) をAPTSで標識し、水で希釈しました。100 nLのプラグがキャピラリーに注入されます。

### メソッド:

- キャピラリー: 90 cm x 50  $\mu\text{m}$  ID (有効長 69cm)
- 泳動バッファー: 40 mM アミノカプロン酸 pH=4.5 + 0.02% ヒドロキシプロピルメチルセルロース
- 電圧: +20 kV
- 注入: 30 mbars, 10 s
- カセット温度: 25  $^{\circ}\text{C}$

回収した生成物のピーク面積が希釈倍率DFと一致するかどうかをチェックしました:

$$c_i = 10^{-7} \text{ mol/L}; v_i = 100 \text{ nL} \quad 8 \text{ collects and } v_f = 15 \mu\text{L} \quad \text{so } DF = 8 \cdot 10^{-7} / 15 \cdot 10^{-6} = 0.05$$



DP1 Glucose → A=1.2  
 DP2 Maltose → A=1.8  
 DP3 Maltotriose → A=1.4

$AF1_{\text{theoretical}} = DF \cdot A1 = 24.9 \cdot 0.05 = 1.3$	$\Leftrightarrow$	$A1_{\text{experimental}} = 1.2$
$AF2_{\text{theoretical}} = DF \cdot A2 = 30.6 \cdot 0.05 = 1.5$	$\Leftrightarrow$	$A2_{\text{experimental}} = 1.8$
$AF3_{\text{theoretical}} = DF \cdot A3 = 29.3 \cdot 0.05 = 1.5$	$\Leftrightarrow$	$A3_{\text{experimental}} = 1.4$

Figure 2 : CE-UV-LEDIFで回収した生成物の注入 DP1  $t_m = 16.4 \text{ min}$  -  $A1 = 1.2$ ; DP2  $t_m = 18.4 \text{ min}$  -  $A2 = 1.8$ ; DP3  $t_m = 21.5 \text{ min}$  -  $A3 = 1.4$

### 結論:

3種類の糖をそれぞれ100%に近い収率で回収できました。

優れた収率でアプタマーを回収し、これらのボトルネック工程を回避する、効率的な複合体分離法を開発しました。