

抗体に標識したい(架橋剤)

利用製品

GMBS	[G005]	Sulfo-GMBS	[S025]
EMCS	[E018]	Sulfo-EMCS	[S024]
HMCS	[H257]	Sulfo-HMCS	[S026]
KMUS	[K214]	Sulfo-KMUS	[S250]

I はじめに

生体サンプル中の特定の物質(ホルモン、基質、抗体、タンパク質、ペプチド等)を検出および定量するバイオアッセイは、臨床分析をはじめ、組織学、分子生物学、免疫学等の分野で欠くことのできない分析法である。なかでも、目的の分子の認識に抗原-抗体反応を利用したイムノアッセイは、高感度で特異性の高い方法として、バイオアッセイの中心的な位置を占めている。

イムノアッセイには、様々な手法が開発されているが、なかでも ELISA、イムノプロットング、免疫組織化学法が最もよく用いられる。これらの方法は、いずれも固相に保持された、あるいは捕捉された標的物質を、何らかのリポーター分子で標識した抗体で検出するステップを含む。従って、これらの方法の成否は、どのような標識抗体を用いるかに大きく依存している。リポーター分子としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質などが用いられ、これを用いた手法をそれぞれ、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイと呼ぶ。このうち、ラジオイムノアッセイは、最も早くから開発された手法であり、高感度を特徴とするが、放射性同位元素を利用するため、危険性が高い。また、標識抗体の保存安定性の低さや、廃棄などの取扱が容易ではないなどの欠点がある。抗体に直接蛍光分子を標識して検出に用いる蛍光イムノアッセイは、感度的には他の2者に劣るが、分解能が非常に高いため、組織学や分子生物学の分野で用いられる。

一方、酵素標識抗体を用い、酵素反応により色素、発光、蛍光シグナルを発生させて目的物質を検出、定量するエンザイムイムノアッセイは、標識抗体の安定性も高く、感度もラジオイムノアッセイに匹敵し、危険性が低いことから、広く用いられている。ここでは、エンザイムイムノアッセイで中心的な役割を演じる抗体-酵素ラベル法を中心に、抗体への標識法について述べる。

II 抗体へのラベル化法

タンパク質の架橋法として、原理的には2つのタンパク質のSH基あるいはアミノ基のいずれかを利用することが可能である。しかし、抗体標識の場合、アミノ基を利用すると、抗原認識部分への修飾が起り、特異性が低下すると共に、非特異的吸着も増加することがある。よってこのような特異性の低下を防ぐためには、SH基を修飾基として利用した方がよい。抗体は、分子内にジスルフィド結合を有し、これを還元すればSH基が得られるので、このSH基を利用する事ができる。特に、ヒンジ部のジスルフィドを開裂させたSH基は、抗原認識部分とは無関係であるため、SH基を修飾しても抗体の特異性が損なわれない利点がある。このようなヒンジ部由来のSH基を有するFab'などを用いた架橋法をヒンジ法という。この方法は最も実用的な抗体修飾法である。Fab'の調製法はVで説明する。

これに対し、抗体のアミノ基を利用する架橋法は、ノンヒンジ法と呼ばれるが、抗体活性が損なわれることがあるため、Fab'が得られない場合に用いられることが多い。

III Heterobifunctional Reagent

前述のヒンジ法では、架橋剤が中心的役割を演じるため、その選択が非常に重要である。SH基を利用する方法としてマレイミド法と、ピリジルジスルフィド法に大別できる。マレイミド法はSH基選択的な反応基としてマレイミドを有する架橋剤を用いる方法で、温和な条件で選択的な架橋ができ、生成する結合の安定度も高い優れた架橋法である。

マレイミドヒンジ法では、マレイミドとアミン反応性基を有する架橋剤(Heterobifunctional Reagent)を用いる。この方法は、まず標識したいタンパク質(酵素など)と、この種の架橋剤を反応させ、タンパク質にマレイミド末端を導入する。その後、還元型抗体やFab'フラグメントと反応して標識抗体を得る。アミン反応性基としては一般にN-ヒドロキシスクシンイミド活性化エステル(NHSエステル)が用いられる。NHSエステルは、アミンと中性以上のpHで効率よく反応し、非常に安定なアミド結合を形成するため、アミン反応性基として適している¹⁾。タンパク質上の α -アミノ基とリジン側鎖の ϵ -アミノ基が利用できる。特に ϵ -アミノ基が、NHSエステルのターゲットとなる。ただし、このアミノ基は、中性ではプロトン化しているため、反応はpH8前後で行う方が効率がよい。これ以上のpHでは、NHSエステル自身の加水分解を生じ効率が低くなる。この場合、TrisやグリシンはNHSエステル反応化合物であるので、バッファーとして使用できない。NHSエステル型試薬は、一般的にDMSOやエタノール等の水に混和可能な溶媒に溶かし、タンパク質のバッファー溶液に最終体積の0.5~10%添加する。有機溶媒の使用が許されない場合は、水溶性型のスルホNHSエステルを使用する。

SH基と反応するマレイミド基は、抗体標識に適した次に示す利点を有する。

- 反応条件が温和で、反応収率も高い。
- 反応がSH基選択的で、中性ではアミンに比べ、SH基とは約1,000倍速く反応する。
- 架橋が安定。中性下、4℃ではこの方法で作製した標識抗体の架橋は数年安定。

ただし、マレイミドは加水分解され易いため、反応時のpHは必ず中性付近で行い、pHを上げることは極力避ける。SH基との反応はpH6~7で、充分進行する。加水分解は、SH基と反応した後でも起こる。また、高pHでは、加水分解の他、アミンとの反応速度が上昇し、SH基との反応を妨害する。マレイミドは、比較的酸化され易いので、これが問題となる場合は、系にEDTAを加えておけば安定化できる²⁾。

分子内に活性エステル基とマレイミドをもつheterobifunctional reagentとして、まず、MBS³⁾が開発され、次いで、その改良型として、HMCS(Code: H257)、KMUS(Code: K214)、GMBS(Code: G005)、HMCS(Code: H257)、KMUS(Code: K214)が開発された。また、小社ではこれらの水溶性アナログであるSulfo-EMCS(Code: S024)、Sulfo-GMBS(Code: S025)、Sulfo-HMCS(Code: S026)、Sulfo-KMUS(Code: S250)も商品化している⁵⁾。これらは、水溶性が向上しており、有機溶媒の使用が困難なときに有用である。(表1)

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

表 1 使用製品および関連製品の構造式

品コード	品名	構造式	品コード	品名	構造式
G005	GMBS		S025	Sulfo-GMBS	
E018	EMCS		S024	Sulfo-EMCS	
H257	HMCS		S026	Sulfo-HMCS	
K214	KMUS		S250	Sulfo-KMUS	

IV 酵素標識

抗体に酵素を標識して検出系に用いると、高感度な手法が構築できる。この場合、用いられる酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ等が知られている。どの酵素を用いたらよいかは、用いるサンプルとプロトコルに依存している。例えば、ペルオキシダーゼは、一般的な検出用酵素で、ELISA やイムノプロットングなど、多くの手法に用いられ、特に免疫組織化学的手法に適している。アルカリホスファターゼは、非常に高感度で、定量性がよい測定を構築することができる。特に、イムノプロットングに適している。β-ガラクトシダーゼは、内在性の酵素活性が非常に低いのが特徴で、イムノアッセイ全般に使用できる。グルコースオキシダーゼは、微生物由来の酵素であり、ほ乳類サンプルに内在性酵素活性がないのが特徴で、免疫組織化学的手法などに用いられる。しかし、有用な検出用基質のパリエーションが少ないという欠点がある。以下、抗体標識時に必要な Fab' の調製法の紹介をした後、抗体への標識法について述べる。

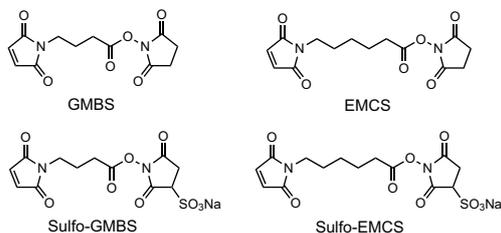


図 1 heterobifunctional reagents

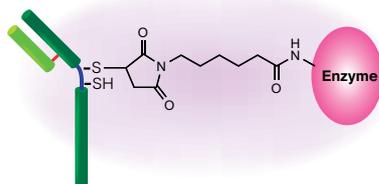


図 2 EMCS による Fab' の酵素標識体

V Fab' の調製法⁶⁾

1. F(ab')₂ の調製

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ IgG
- ・ プタ胃ペプシン
- ・ 緩衝液 A、緩衝液 B
- ・ Sephacryl S-200HR(GE ヘルスクエア社製)

(2) 操作

- 1) IgG 5 mg/0.5 ml を緩衝液 A で透析する。
- 2) 透析液にプタ胃ペプシン 0.1 ~ 0.2 mg を溶解し、37°C で 15 ~ 20 時間インキュベートする。
- 3) pH7 に調整して、Sephacryl S-200HR で、緩衝液 B を用いて 0.35 ml/min でゲル濾過する。
- 4) F(ab')₂ 分画をとり、濃縮する。280 nm での吸光度を測定し、100 mg/ml のナトリウムアジドを 1% 添加して保存する。
- 5) MW=92,000、E_{280 nm}=1.48 g⁻¹・L・cm⁻¹ を用いて濃度を決定する。
 蛋白濃度 (mg/ml)=A_{280 nm}/(1.48×MW)×MW=A_{280 nm}/1.48 またはモル濃度 (mol/l)=A_{280 nm}/(1.48×MW) で求める。

※ IgG のペプシンによる消化時間は、動物種により異なる。例えば、ウサギ IgG では 6 時間だが、ヤギでは 1 ~ 2 日、ラット・マウスの IgG 2b では、F(ab')₂ とはならない。

2. Fab' の調製^{6, 8)}

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ F(ab')₂
- ・ 緩衝液 C、緩衝液 D
- ・ 0.1 mol/l 2-メルカプトエチルアミン溶液 (11.36 mg の 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩を緩衝液 D 1 ml に溶解する。)

(2) 操作

- 1) 0.1 ~ 3 mg の F(ab')₂ を含む緩衝液 C 0.45 ml に、2-メルカプトエチルアミン溶液 50 μl を添加する。
- 2) 37°C で 90 分間インキュベートする。
- 3) Ultrogel AcA44 カラムで、緩衝液 D を用いて 0.35 ml/min でゲル濾過する。
- 4) Fab' 分画をとり 280 nm の吸光度を測定し、MW=46,000、E_{280 nm}=1.48 g⁻¹・L・cm⁻¹ を用いて濃度を決定する。さらに、後述の方法で、SH 基を定量する。

3. SH 基の定量法^{6,8)}

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ 5 mmol/l 4-PDS 溶液 (4-PDS(Code: P017)1.1 mg/ 緩衝液 B 1 ml)

(2) 操作

- 1) Fab'(3 ~ 14 μmol/l、 $A_{280\text{nm}}=0.1 \sim 1.0$) の緩衝液 D 溶液 0.5 ml に 4-PDS 溶液 20 μl を添加する。
- 2) 30°C で 10 分間インキュベートする。
- 3) 324 nm の吸光度を測定し、4-PDS より遊離した 4-チオピリドン、そのモル吸光係数 $\epsilon_{324\text{nm}}=19,800$ を用い定量する。
※ Fab' の SH 基は、EDTA 存在下では、還元型 IgG の SH 基よりも格段に安定で取り扱い易い⁸⁾。

VI 仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ Fab' への標識¹⁾

1. 仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼへのマレイミドの導入

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ 仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ
- ・ 緩衝液 E、緩衝液 F
- ・ EMCS(Code: E018)
- ・ Sephadex G-25(GE ヘルスクエア社製)

(2) 操作

- 1) アルカリホスファターゼ (2 mg)/ 緩衝液 E 0.5 ml を同じ緩衝液 E を用い透析する。
- 2) 透析液に EMCS(0.17 mg)/DMF 10 μl を添加して、30°C で 30 分間インキュベーションする。
- 3) Sephadex G-25 カラム (1×45 cm) で、緩衝液 F によりゲル濾過し、濃縮する。
- 4) マレイミド量 (VI-3) とアルカリホスファターゼ活性 (VI-4) を測定する。

2. マレイミド導入アルカリホスファターゼの Fab' への標識

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ マレイミド導入アルカリホスファターゼ Fab'
- ・ 緩衝液 D、緩衝液 G、緩衝液 F
- ・ 10 mmol/l 2-メルカプトエチルアミン (緩衝液 D 溶液)
- ・ ナトリウムアジド

(2) 操作

- 1) マレイミド導入アルカリホスファターゼ 1 mg(10 nmol) を緩衝液 F 0.25 ml に溶解し、Fab' 2.3 mg (50 nmol)/ 緩衝液 D 溶液 0.25 ml を混合する。
- 2) 4°C で 20 時間インキュベートする。
- 3) 10 mmol/l 2-メルカプトエチルアミン溶液 10 μl を添加し、UltroGel AcA44 カラムでゲル濾過する。溶離液には緩衝液 G を用い、0.35 ml/min で流す。
- 4) アルカリホスファターゼ活性 (VI-4) を測定し、100 mg/ml BSA と 100 mg/ml のナトリウムアジドをそれぞれ 1% 添加し保存する。

3. マレイミドの定量法⁶⁾

EMCS や GMBS によりアルカリホスファターゼに導入されたマレイミドの導入数は、以下の方法で算出する。

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ マレイミド導入アルカリホスファターゼ
- ・ 緩衝液 C
- ・ 0.5 mmol/l 2-メルカプトエチルアミン溶液 (V-2 で調製した 0.1 mol/l の 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩溶液 10 μl と 50 mmol/l EDTA (pH6.0) 2 ml を混合し

調製する。50 mmol/l EDTA 溶液 100 ml 調製時には小社 2NA(Code: N001) 1.86 g を溶解し 1 mol/l NaOH で pH6.0 に調製する。)

- ・ 5 mmol/l 4-PDS 溶液 (4-PDS(Code: P017)1.1 mg/ 緩衝液 B 1 ml)

(2) 操作

- 1) マレイミドを導入したアルカリホスファターゼ (約 10 μmol/l) / 緩衝液 C 0.45 ml に、0.5 mmol/l 2-メルカプトエチルアミン溶液 50 μl を添加する。
- 2) 30°C で 20 分間インキュベートする。
- 3) 5 mmol/l の 4-PDS 溶液 20 μl を加える。
- 4) 30°C で 10 分間インキュベートする。
- 5) 324 nm の吸光度より、 $\epsilon=19,800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ を用いて計算する。

4. アルカリホスファターゼ活性の測定

比色法および蛍光法があるが、ここでは最も一般的な比色法として、PNPP(4-ニトロフェニルリン酸)による方法を紹介する⁸⁾。

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ 緩衝液 H
- ・ 5.5 mmol/l PNPP/ 緩衝液 H
- ・ 1 mol/l NaOH

(2) 操作

- 1) 酵素溶液を、緩衝液 H で希釈する。
- 2) 酵素希釈溶液 0.5 ml を 30 ~ 37°C で 5 分間インキュベーションする。
- 3) 5.5 mmol/l PNPP/ 緩衝液 H 0.5 ml を添加する。
- 4) 30 ~ 37°C で 10 ~ 100 分間インキュベーションする。
- 5) 1 mol/l NaOH 0.5 ml を加えて、反応を停止させ、405 nm の吸光度を測定する。
予め既知濃度のアルカリホスファターゼを用い同一法で活性を測定し、作製しておいた酵素濃度 - 吸光度の検量線から定量する。また、酵素量は、280 nm の吸光度より、 $\epsilon=0.99 \text{ cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$ と $MW=100,000$ より計算する。
タンパク濃度 (mg/ml) = $A_{280\text{nm}} / (0.99 \times MW) \times MW = A_{280\text{nm}} / 0.99$ またはモル濃度 (mol/l) = $A_{280\text{nm}} / (0.99 \times MW)$ で求める。

VII GMBS を用いた β-ガラクトシダーゼの IgM モノクローナル抗体への標識⁹⁾

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ 緩衝液 I、緩衝液 L、緩衝液 J、緩衝液 M、緩衝液 K、緩衝液 N
- ・ β-ガラクトシダーゼ
- ・ GMBS(Code: G005)
- ・ SephadexG-25(GE ヘルスクエア社製)
- ・ DEAE-TOYOPEARL (東ソー社製)

(2) 操作

- 1) IgM(1 mg、1.1 nmol)/ 緩衝液 I 1.0 ml に、GMBS(33 μg、117 nmol)/dioxane 50 μl を添加する。
- 2) 20°C で 40 分間インキュベーションする。
- 3) Sephadex G-25 カラム (1.4×16 cm) を用い、4°C、緩衝液 J でゲル濾過する。280 nm の吸光度が 0.41(0.87 nmol のタンパク質に相当) を含むフラクション 2.5 ml を得る。
- 4) これに、β-ガラクトシダーゼ (2.62 nmol)/ 緩衝液 K 1.0 ml を添加する。
- 5) 30°C で 30 分間インキュベートする。
- 6) 緩衝液 L 0.1 ml を添加する。
- 7) この溶液 500 μl を、緩衝液 M で平衡に達した DEAE-TOYOPEARL カラム (1.2×15 cm) にアブライする。緩衝液 N を用い、NaCl を 0.1 mol/l から 0.5 mol/l にグラディエント

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

をかけながら溶出する。

- 8) 280 nm の吸光度を測定し、緩衝液 L 0.1 ml の入ったチューブにとって酵素活性を測定する。

緩衝液一覧

本稿で用いた緩衝液の組成の一覧を下記に示す。

- 緩衝液 **A** : 0.1 mol/l 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5、0.1 mol/l NaCl を含む)
- 緩衝液 **B** : 0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)
- 緩衝液 **C** : 0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0)
- 緩衝液 **D** : 0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0、5 mmol/l EDTA を含む)(EDTA-2Na 塩を緩衝液作製途中で終濃度が 5 mmol/l となるよう加え、希釈してリン酸濃度が 0.1 mol/l にする。すなわち 100 ml 調製時は小社 2NA(Code: N001) を 186 mg 用いる)
- 緩衝液 **E** : 50 mmol/l ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH7.6、1 mmol/l MgCl₂、0.1 mmol/l ZnCl₂ を含む。)
- 緩衝液 **F** : 0.1 mol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0、1 mmol/l MgCl₂、0.1 mmol/l ZnCl₂ を含む)
- 緩衝液 **G** : 10 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8、0.1 mol/l NaCl、1 mmol/l MgCl₂、0.1 mmol/l ZnCl₂ を含む)
- 緩衝液 **H** : 0.1 mol/l グリシン -NaOH 緩衝液 (pH10.3、1 mmol/l MgCl₂、0.25 g/l 卵白アルブミンを含む)
- 緩衝液 **I** : 0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0、50 mmol/l NaCl を含む)
- 緩衝液 **J** : 10 mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.3、10 mmol/l MgCl₂、50 mmol/l NaCl を含む)
- 緩衝液 **K** : 0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0、10 mmol/l MgCl₂、5 mmol/l EDTA を含む)
- 緩衝液 **L** : 60 mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4、10 mmol/l EDTA、1 mmol/l MgCl₂、0.1% BSA、0.1% ナトリウムアジドを含む)
- 緩衝液 **M** : 20 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5、0.1 mol/l NaCl を含む)
- 緩衝液 **N** : 20 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5)

参考文献

- 1) P. Cuatrecasas, I. Parikh, *Biochemistry*, **1972**, *11*(12), 2291.
- 2) S. Yoshitake, Y. Yamada, E. Ishikawa, R. Masseyeff, *Eur. J. Biochem.*, **1979**, *101*, 395.
- 3) M. J. O'Sullivan, E. Gnemmi, D. Morris, G. Chieriegatti, A. D. Simmonds, M. Simmons, J. W. Bridges, V. Marks, *Anal. Biochem.*, **1979**, *100*, 100.
- 4) S. Yoshitake, M. Imagawa, E. Ishikawa, *Anal. Lett.*, **1982**, *15*(132), 147.
- 5) J. V. Staros, *Biochemistry*, **1982**, *21*, 3950.
- 6) E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, T. Ueno, *J. Immunoassay*, **1983**, *4*, 209.
- 7) S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, E. Ishikawa, *Scand. J. Immunol.*, **1979**, *10*, 81.
- 8) 石川榮治、河合忠、宮井潔、酵素免疫測定法第三版 (1987 医学書院).
- 9) K. Fujiwara, N. Matsumoto, S. Yagisawa, H. Tanimori, T. Kitagawa, M. Horita, K. Hiratani, K. Fukushima, A. Tomonaga, K. Hara, K. Yamamoto, *J. Immunol. Methods*, **1988**, *112*, 77.

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を小社 HP にて掲載。ご興味のある方は、小社 HP にて最新情報をご確認下さい。

タンパク質架橋 同仁 検索