

生物学実験 IV (加藤担当)

2010 年度改訂

イムノグロブリンの精製 および 酵素免疫学的測定法

本実習では、以下に説明する遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチンをウサギに免疫して得られた抗血清より、抗体分子を分離精製分離し(イムノグロブリンの精製)、続いてこの抗体を用いた酵素免疫学的定量測定系を構築することを学ぶ。実験を通じて、幅広い学識を獲得する。

【抗体(Ig:イムノグロブリン)】

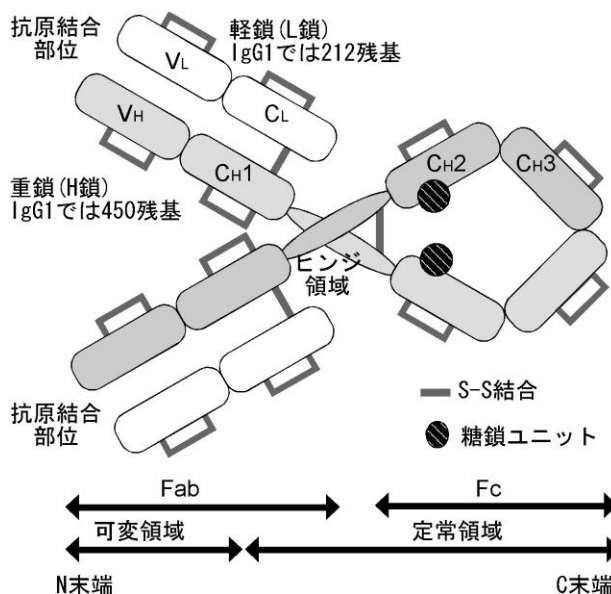
抗体(Ig:イムノグロブリン)は、血液中の主要な糖蛋白質であり、B リンパ球から分泌され、主要な生体防御機構である液性免疫を担う。抗原を特異的に認識する可変領域(V領域)は、遺伝子の組み合わせの種類と点変異などによって、とりうる構造は膨大であり、多様な抗原部位(エпитープ)に対応する。抗体の抗原認識の特異性を応用して、各種の手法が考案されている。

抗体は、人工的には異種の動物に抗原を投与して作ることが出来る。抗血清とは、免疫動物から回収された血清である。抗原免疫を重ねることにより、総イムノグロブリンのうち、5~30%が投与抗原に対する特異抗体となる。抗血清からイムノグロブリン画分として精製される抗体のうち、同じ抗原分子を認識する特異抗体であっても、様々なB細胞から分泌され分子構造が異なる抗体の総和である。そのような状態の場合はポリクローナル抗体という。モノクローナル抗体とは、それぞれの抗体を発現する個別のB細胞から得られるものであり、由来する遺伝子としても抗体分子として均一なものである。

抗体を用いた生体物質の検出系には多くの手法が開発されている。PVDF やニトロセルロースなどに抗原あるいは抗体を固相化するブロット法、ポリスチレンやビーズに抗体あるいは抗原を固相化するELISA・EIA法、放射性リガンドを利用するRIA法、さらには組織標本中の物質を特異的に染色する方法、細胞膜分子に結合させて解析するフローサイトメトリーなど、広範な領域・手法があるが、全て特定の抗原を認識する抗体の性質を利用したものであり、生命科学を学ぶ者はそれらの原理・手技、応用について学ぶ必要があるといえよう。

【Erythropoietin とは?】

私達の1μlの血液中には、健常時420~560万(男性)、380~500万(女性)の赤血球が存在する。Erythropoietin(EPO:エリスロポエチン・エリトロポエチン)は、骨髄の血液幹細胞から分化派生する赤血球前駆細胞に特異的に作用して、赤血球を造る造血因子である。ヒトのEPO分子は糖蛋白質であり、165のアミノ酸残基からなるペプチド鎖と、体内代謝上 *in vivo* の活性に不可欠である糖鎖(3本のN結合型と1本のO結合型)で構成されている。その分子構造が未知のまま、赤血球産生に関わる生物活性の探求は古くから続けられていた。再生不良性貧血という疾病がある。その患者は骨髄で血球産生が著しく低下しており、赤血球の低形成が惹き起こす臓器への酸素供給



低下は、フィードバック制御により、EPO 産生臓器と考えられた腎臓からの EPO 分泌量を高度に亢進させることが突き止められていた。1976 年、ついに再生不良性貧血患者尿より EPO は純化され、1977 年に歴史的な論文¹⁾が発表された²⁾。精製標品よりアミノ酸配列が解明され、1985 年、米国のバイオベンチャー 2 社により同時にヒト EPO 遺伝子がクローニングされた³⁾⁴⁾。生物活性に基づく力価は、糖鎖付加の程度によって変化し均一ではない。遺伝子組換え型ヒト EPO(rhEPO)の場合、1mg 蛋白質当たりの力価は WHO の標準品を基準に、15 万～20 万国単位(IU)程度である。健常人の血中濃度は 8～36m IU/ml であり、重量濃度では約 40～240pg/ml となる。大腸菌で EPO を発現させた場合、EPO 分子内ジスルフィド結合の形成が困難であり、また糖鎖は付加されない。本実習で用いる EPO は、動物細胞(CHO Cells: Chinese Hamster Ovary Cells)に EPO 遺伝子を組換え導入して生産された rhEPO であり、*in vivo* 活性に不可欠な糖鎖が付加された分子である。



結晶化されたヒト EPO 蛋白質の高次構造(Syed, et al. Nature, 1998; Protein Data Bank; 1CN4C)。分子を二方向から見た図を並べてある。サイトカインに広く共通する 4 本のヘリックスが構成するバンドル構造に注目。生体内の EPO 分子には、さらに空間的に大きな領域をもつ糖鎖構造が付加される。

赤血球前駆細胞の増殖と分化は、EPO と EPO 受容体の結合に続く細胞内シグナリングを介して制御される。EPO の 80%以上は腎臓の傍尿細管細胞で、残りは肝臓で産生される。低酸素刺激やアンドロジェン等により EPO 産生は増加し、血中半減期は約 5 時間、肝臓で最終的に不活化する。腎機能不全では腎性貧血となり、その他、悪性腫瘍による癌性貧血、骨髄造血器疾患(再生不良性貧血等)においては貧血となり、EPO の血中濃度は健常値から変動する。

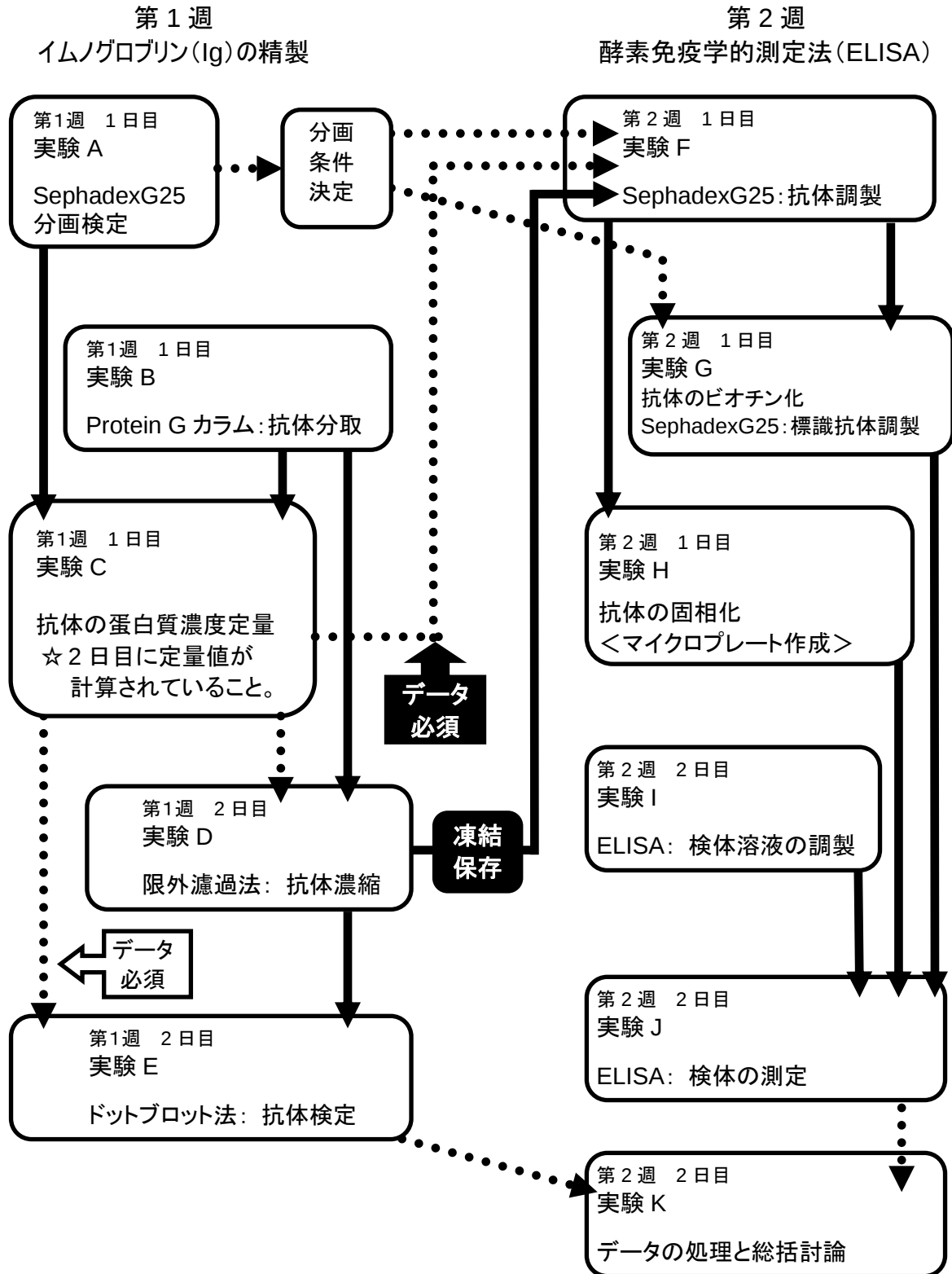
EPO は、世界で初めて動物細胞発現系で生産された遺伝子組換え医薬としても知られている。既に我が国でも、血液透析を必要とするような腎臓病患者の腎性貧血を治療する医薬として認可されている。現在、さらに糖鎖改変付加して長期間の薬効を維持する次世代分子 EPO が臨床に投入されつつある。このような背景のもと、造血因子(サイトカイン)の発見の歴史の面からのみならず、EPO の発見と開発に関しては、バイオテクノロジー医薬の歴史、またバイオベンチャー発祥の歴史の上で、多方面の領域から注目されてきた。

EPO は筋への酸素運搬量を増大させる。5%多くの酸素が筋に運ばれるためには、ヘマクリットが 5%上昇すれば良く、これが実現すると競技力が 8%向上すると言われている。実際、ソウルオリンピック以後、スポーツ界(マラソン・競輪・水泳・テニス等)において、血液ドーピングに代わる安全かつ検査検出が困難なドーピングとして、EPO が転用されていることが問題となっている。

- 1) Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*. 1977 Aug 10;252(15):5558-5564.
- 2) 宮家隆次 河北誠. エリスロポエチン純化の歩み. 造血因子. 第 1 巻 3 号:109-113
- 3) Lin FK, Suggs S, Lin CH, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985 Nov;82(22):7580-7584.
- 4) Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 1985 Feb 28-Mar 6;313 (6005) : 806-810.

実験の流れ図: イムノグロブリンの精製・酵素免疫学的測定法

データの流れ ➡ 試料の流れ ➡



イムノグロブリンの精製

【この実験の狙い】

- ゲル濾過法原理を復習し、ミニカラムによる実践的な溶媒交換・脱塩手法を身につける。
- クロマトワークのモニタリングの重要性や、アフィニティ精製法の仕組みを理解する。
- 正確なマイクロピペット操作法を学び、さらに ng, pg といったサブ μg 量の単位に慣れる。
- マイクロプレートによる蛋白質定量と、物質定量の代表的なデータ処理手順を会得する。
- 抗体免疫染色法のひとつを実際に経験し、抗原抗体反応の可視化手順を理解する。
- 実践的な限外濾過(UF)濃縮法を経験し、限外濾過の原理と実際を理解する。
- 実験結果を次の実験に活かす実験フローの組立て、実験設計を学ぶ。
- 実験データを整理し、グラフにまとめるための基本を身につける。

【予め準備しておくこと】

- ゲル濾過法や、Bradford 蛋白質定量法を復習しておくこと。
- 抗原抗体反応の基本を調べておくこと。
- マイクロソフト Excel 等を用いる表計算データ処理や、多次回帰式の計算を理解しておくこと。

【試薬】

遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチン (rhEPO; recombinant human Erythropoietin)
抗 rhEPO ウサギ抗血清 0.2ml

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

0.02% ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin: BSA) 含有 0.5 M NaCl 溶液

1% 及び 10% BSA 含有 DPBS 溶液

0.1 M Glycine-HCl, pH 2.0, 5 M NaCl, 20%エタノール, メタノール

1 M Tris [hydroxymethyl] aminomethane ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ FW=121.1: TRIZMA BASE: Sigma 社)

ビオチン化 抗ウサギ IgG (Bio-Rad 社)

アルカリフォスファターゼ (AP) 標識アビジン (Bio-Rad 社)

Bradford 蛋白質定量試薬 (Bio-Rad 社), ウシ イムノグロブリン G (IgG) 標準液 (Pierce 社)

Tween 20 (Bio-Rad 社), 10% SDS (Bio-Rad 社)

TBS [10 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl]

TTBS [0.1% Tween 20 TBS 溶液]

【器材・機器】

pH メーター, 電子天秤, ハンディ pH メーター, ハンディ電気導電率メーター
プレートミキサー, マイクロプレートリーダー, 小型遠心機

マイクロピペット, チップ, マイクロチューブ (1.5ml), ピンセット, 簡易型ドットブロッター
Sephadex G25 カラム [NAP5 カラム] (GE ヘルスケア バイオサイエンス社)
Protein G カラム [PROCEP G カラム] (Millipore 社)
PVDF 膜 [Immobilon PVDF] (Millipore 社)

遠心限外濾過濃縮ユニット: 分子量 3 万カット [ULTRAFREE-MC UFC3LTK00] (Millipore 社)
96 穴平底ポリスチレン マイクロアッセイプレート (Costar 社 #3591)
ポリプロピレン (PP) 製 15ml 試験管 (染色槽として用いる)

実験 A Sephadex G25 カラムによる溶媒交換の条件決定 (第一日)

【添加と分画(フラクショネーション)の開始】

- 0.02% BSA の 0.5 M NaCl 溶液 (調製済) を, **0.5 ml** を添加する。
添加開始と同時に, 滴下する溶離液をマイクロチューブに採取する。(画分 1)
分画して得られる溶液を画分という。(画分 1, フラクション 1, Fraction 1)

【分画・回収と測定】

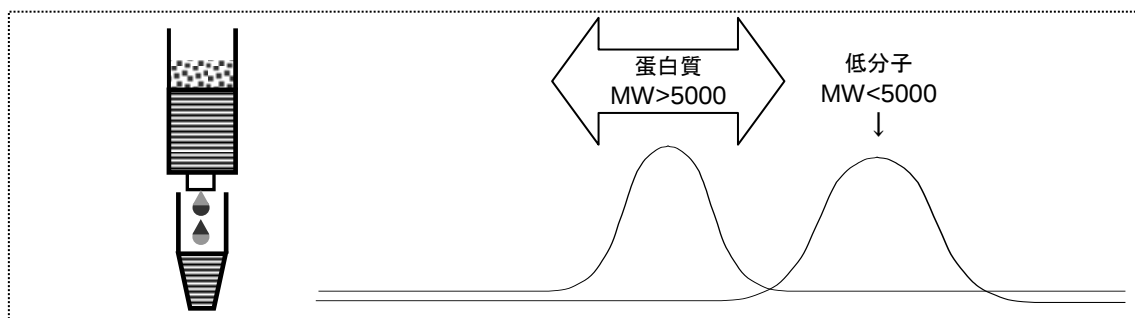
- カラムに DPBS を **0.5 ml** 添加し,
同時に溶出される溶離液 **0.5 ml** をマイクロチューブに採取 (画分 2)。
これを 回繰り返す, 合計 本の画分を採取する。
- 各画分の電気導電率を測定する。検量範囲を超えた場合は適宜希釈して測定する。
- 各画分 (0.5 mL) の一部を採取して, 実験 C にある手順に従って, 蛋白質量を測定する。
注意: 実験 B のサンプルと同時に測定する。

【データ解析】

- 蛋白質の溶出プロファイルと塩溶出範囲を, 同じグラフ上に整理し,
溶媒交換されて回収すべき蛋白質画分の範囲を決定する。

【カラムの後処理】

- 5 倍体積の DPBS でカラムを洗浄後,
20% エタノール 5 倍体積でカラムを平衡置換し, 室温または 4°C で保存する。
- 次週「酵素免疫学的測定法 ELISA」の実験 F に用いる。



実験 B Protein G カラムによるイムノグロブリン(Ig)のアフィニティ精製 (第一日)

【準備】

- 保存されているカラムの寸法を定規で測り、カラム体積(ベッド体積)を計算する。
- カラム体積 3 倍以上の DPBS により、保存液を追い出し、DPBS に置換平衡化する。
- Glycine-HCl 酸性緩衝液を pH 7.5~8 にするのに要する 1M Tris の添加量を決定する。
- 実験 C のピペッティングの注意の項を参照して、0.200 ml(200 μ l)の抗血清より正確に 1 μ l を採取し、予め 99 μ l の DPBS を入れたマイクロチューブに加えて攪拌する。これを実験 C 蛋白質定量の「100 倍希釈抗血清」とする。

【血清のカラム添加と、非結合成分の回収】

- 抗血清 199 μ l を Protein G カラムに添加する。
添加と同時に、溶出される溶離液をマイクロチューブに回収し始める。
さらに 300 μ l の DPBS で抗血清の容器の管壁を洗いこみ、続いてカラムに添加する。
以上で、合計、499 μ l(500 μ l と見なす)の添加と、画分 1 の採取が終了する。
- 次いで、DPBS 0.5 ml をカラムに添加し、同時に溶出される溶離液をマイクロチューブに回収する (画分 2)。
- 以後同様に、DPBS 0.5 ml を添加、同時に 0.5 ml を回収することを繰り返す(画分 3~)。
DPBS 添加量がカラム体積の 2 倍量に達するまで、これを繰り返す。こうして、カラム非結合成分(素通り)を洗い流す。
素通り画分のうち、蛋白質溶出画分のピーク画分の一部を採取し、実験 E で用いる。

【Protein G 結合 Ig 画分の溶出】

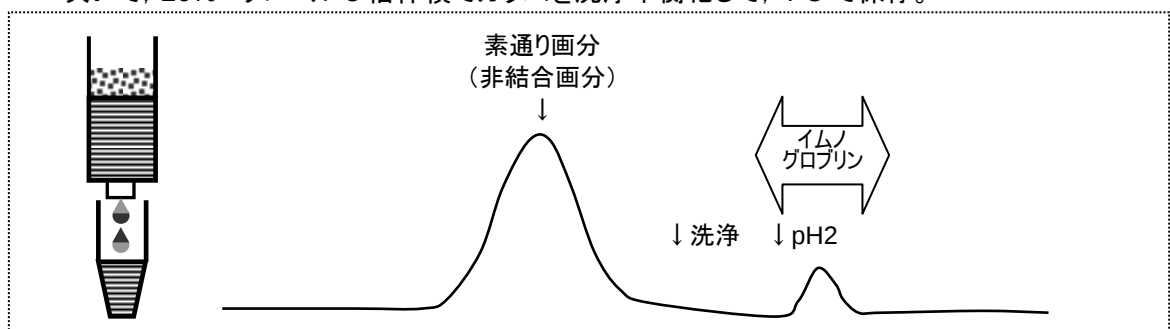
- 予め、溶出液を集める各マイクロチューブに、中和に必要な 1 M Tris を添加しておく。
- 0.5 ml の Glycine-HCl 酸性緩衝液をカラムに添加し、同時に溶出される溶離液 0.5 ml をマイクロチューブに回収する。
- これを繰り返し、溶出液の全量が、カラム体積の 3 倍量に達するまで分画する。
各回収画分の pH のチェックを行う。

【データ解析】

- それぞれの画分の蛋白質濃度と蛋白質量を求める。(* 実験 C)。
次いでグラフを作成してイムノグロブリン画分の範囲を決定する。

【カラムの保存処理】

- まずカラム容積 2 倍の DPBS で酸性溶液を追い出し、
次いで、20%エタノール 5 倍体積でカラムを洗浄平衡化して、4°C で保存。



実験 C マイクロプレート法による蛋白質量の定量（第一日）

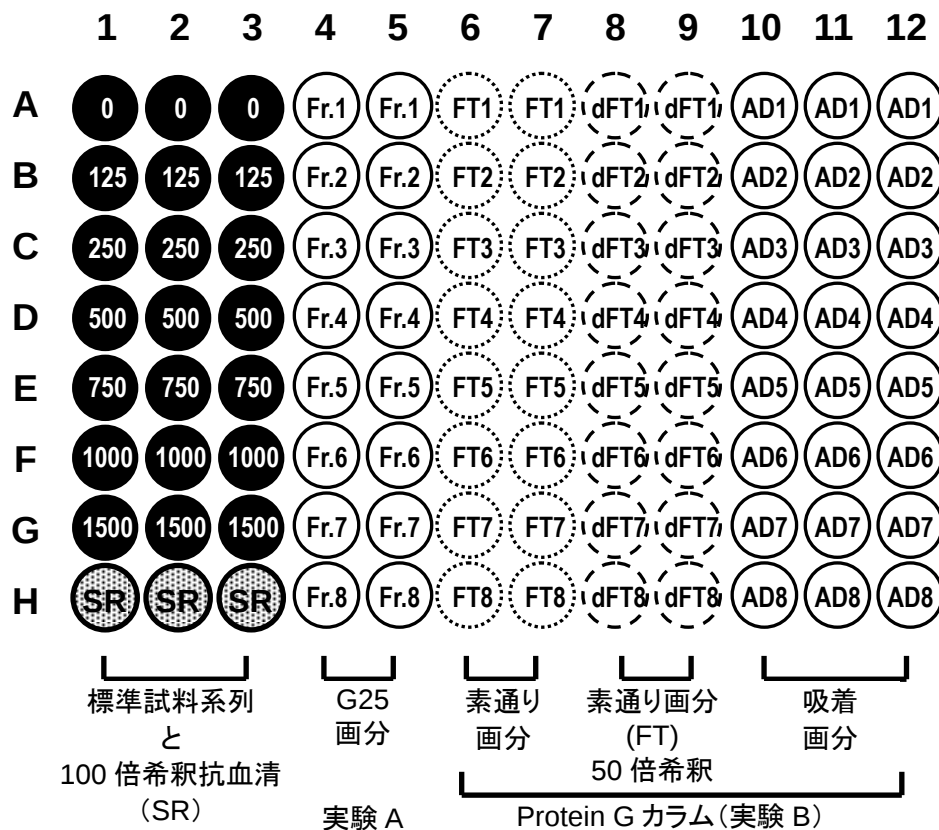
実験 A, B で得た画分の蛋白質量を Bradford 法(色素蛋白質結合法)で測定する。

- 下記の希釈表の通り, 0-1500 $\mu\text{g/ml}$ の標準蛋白質の希釈系列をつくる。
精密なピペット操作(チップへの排出入・チップ外壁・内壁の濡れ対策等)に留意する。
空気圧で液体を押出すピペットでは, 液体粘度に応じた速度でピPETTINGを行う。
同一のチップを用いて, 蛋白質濃度の薄い検体から濃い検体へ操作することは可とする。
その逆に, 濃い検体を採取したチップで, 薄い検体を採取してはいけない。(→何故か?)

【試料の希釈】

試料位置	標準試料 ($\mu\text{g/ml}$)	実必要量 $10\mu\text{l} \times 3 + \alpha$	原液 (μl)	DPBS (μl)	調製液量 (μl)
A 列	0	40 μl	—	—	—
B 列	125	40 μl	750 $\mu\text{g/ml}$ を 20 μl	100 μl	120 μl
C 列	250	40 μl	1000 $\mu\text{g/ml}$ を 15 μl	45 μl	60 μl
D 列	500	40 μl	1000 $\mu\text{g/ml}$ を 25 μl	25 μl	50 μl
E 列	750	40 μl	1500 $\mu\text{g/ml}$ を 35 μl	35 μl	70 μl
F 列	1000	40 μl	2000 $\mu\text{g/ml}$ を 45 μl	45 μl	90 μl
G 列	1500	40 μl	2000 $\mu\text{g/ml}$ を 60 μl	20 μl	80 μl

【蛋白質定量・マイクロプレート試料配置図】



- 図に従って、各ウェルに、予め CBB 溶液 200 μ l を添加し、次に蛋白質試料 10 μ l を添加する。同一のチップを用いて、蛋白質濃度の薄い検体から濃い検体へ操作することは可とする。
- 強すぎず弱すぎず、プレートミキサーの回転数を適宜調整し、試料を混和攪拌する。攪拌が強すぎると試料を損失し、試料間の汚染を招くので、細心の注意を払うこと。攪拌の強さが適切であれば、30 秒も攪拌すれば充分である。
- マイクロプレートリーダーで吸光度 [$\lambda_1=595$ nm, $\lambda_2=415$ nm] を測定する。
($\rightarrow$ それぞれの測定波長は、どのような意味を持つか?)

標準蛋白質溶液(ウシ IgG)	$\rightarrow$ 3 点測定 (triplicate, triplet)
100 倍希釈抗血清(Protein G カラム添加試料)	$\rightarrow$ 3 点測定 (triplicate, triplet)
Sephadex G25 カラムの溶出各画分	$\rightarrow$ 2 点測定 (duplicate)
Protein G カラムの素通り画分(原液)	$\rightarrow$ 2 点測定 (duplicate)
Protein G カラムの素通り画分(50 倍希釈)	$\rightarrow$ 2 点測定 (duplicate)
Protein G カラムの結合画分(原液)	$\rightarrow$ 3 点測定 (triplicate, triplet)

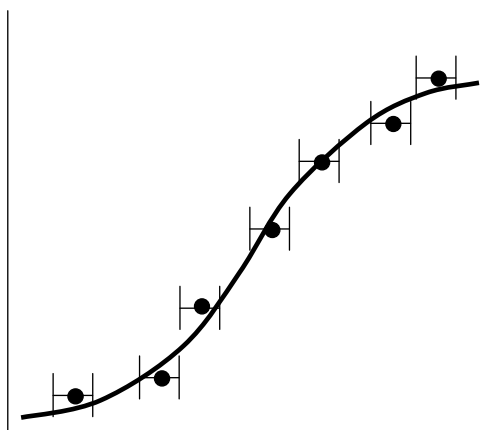
- 検量線を作成する。

3 次回帰式, 2 次回帰式($a=0$), 直線回帰式($a=0$ かつ $b=0$)の各々の近似式を求め、それらのうち、最適なカーブフィットが得られたものを検量線として用いる。

【検量線のグラフ】X, Y 軸のそれぞれには何をおくべきか?

$$[\text{Protein Conc}] = a[\text{Abs}]^3 + b[\text{Abs}]^2 + c[\text{Abs}] + d$$

Protein Conc: 蛋白質濃度; Abs: 吸光度



- 各画分の蛋白質濃度と蛋白質量を求めよ。 $\rightarrow$ 計算値は第二日に必要
- 有効数字に留意して、結果を表(次ページに例を示す)にまとめよ。
- クロマトグラフィーの結果を工夫してグラフ化し、分かりやすく報告せよ。

<表の例>

【蛋白質と低分子塩の分画】

カラム : Sephadex G25 カラム (NAP5 カラム)

カラムサイズ :

溶離液 :

画分	画分体積 (ml)	累積溶出量 (ml)	電気導電率 (mS/cm)	蛋白質濃度 (mg/ml)	蛋白質量 (mg)
添加試料: BSA 溶液	0.500	—		—	—
画分 1	0.500	0.500			
画分 2	0.500	1.00			
画分 3	0.500	1.50			
画分 4	0.500	2.00			
画分 5	0.500	2.50			
画分 6	0.500	3.00			
画分 7	0.500	3.50			
画分 8	0.500	4.00			

【ウサギ抗血清イムノグロブリンの分離】

カラム : Protein G カラム (PROCEP G カラム)

カラムサイズ :

非吸着画分溶離液 :

吸着画分溶離液 :

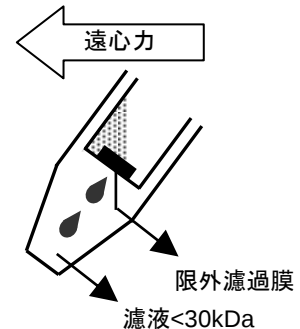
画分 (連続番号)	累積 溶出量 (ml)	Tris 添加量 (ml)	画分 体積 (ml)	pH	蛋白質 濃度 (mg/ml)	蛋白質 質量 (mg)	蛋白質 回収率 (%)	注釈
添加試料: ウサギ抗血清	—		0.399				100	
画分 1	0.500							素通り
画分 ?								素通り
画分 ?								ドットプロット用に 50 µg 採取
画分 ?								素通り
画分 ?								溶離開始
画分 ?								酸性溶離
画分 ?								イムノグロブリン
画分 ?								イムノグロブリン
画分 ?								酸性溶離
非吸着画分 合計	—							非吸着画分
イムノグロブリン (濃縮前)	—							画分?~?のプール ドットプロット用に 50 µg 採取
イムノグロブリン (濃縮後)	—	—	—	—	(計算値)	(計算値)		限外濾過 3 万カット

実験 D イムノグロブリン画分の限外濾過遠心法による濃縮と溶媒交換（第二日）

待ち時間があるので、この間、実験 E を平行して進める。

【イムノグロブリン画分の濃縮】

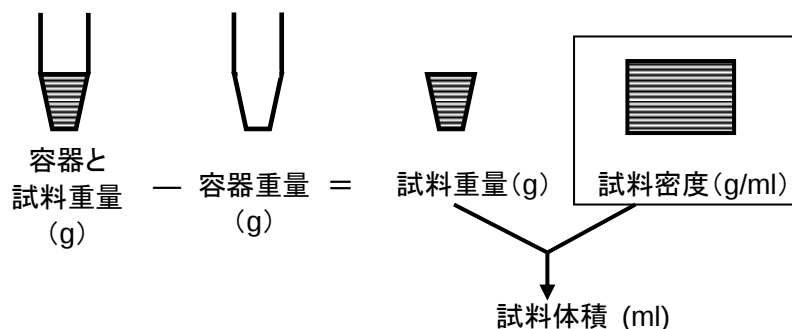
- イムノグロブリン画分をまとめてプールし、一部(**50 μ g** 蛋白質)を、実験 E のために分け取る。
- 残りを遠心法にて、限外濾過濃縮する。
許容される最大遠心力から最大遠心回転数を求める。
最大遠心力を超えて遠心してはならない。
(最大遠心回転数の 8~9 割が目安)
- 0.1ml 程度まで濃縮する。(分子量 30kDa カットオフ)
遠心の放置による極端な過濃縮を避けること⇒何故か？
- 次項に従って、濃縮液を回収する。



【イムノグロブリン濃縮画分の回収と、重量法による液量測定】

どんなに少量であっても、メスシリンダーなどの容器を使わずに、液体の重量・密度と、容器の重量により、非接触式に便宜的に体積を計算することが出来る。体積測定用の容器の移しかえに伴う、貴重な試料の損失も回避することが出来る。極めて実践的な方法として、以下、覚えておくと良い。

- 電子天秤を用いて DPBS の密度を測定する(*)。
- 予め、濃縮液を回収する空のマイクロチューブの重量(風袋)を秤量する(**)。
- このチューブに、濃縮ユニットからピペットで注意深く濃縮液を移す。
- 限外濾過ユニットの壁面やチップに残存する蛋白質溶液を、DPBS 100 μ l 程度で洗い込み、合わせて回収する。これを数回繰り返す(目分量で合計回収量が 0.5 ml を超えない程度)。
- 電子天秤を用いて、濃縮液を回収したマイクロチューブの重量を測定する。
マイクロチューブ風袋重量(**)を差し引き、液体重量を算出する。
液体(DPBS)の密度(*)を利用して算出される体積を、標品の体積とする。
(注:この溶液の密度は、厳密には DPBS とは一致しない。)
- 濃縮液の計算体積が 0.5 ml 未満の場合は、DPBS を添加し、全洗液を **0.5 ml** にする。



限外濾過操作で損失がないと仮定すると、濃縮溶液中の蛋白質濃度が計算出来る。
(→回収出来なかった蛋白質があるとすれば、どのような要因が考えられるか?)

【イムノグロブリン濃縮画分の保存】

- 蛋白質濃度、容量(**0.5 ml**)、班名等を記入したラベルを貼り TA に預け、
酵素免疫学的測定法(ELISA)実習の実験F実施日まで凍結保存する。

実験 E ドットブロット法による抗原の検出(精製 IgG の認識性の確認) (第二日)

【抗体溶液の準備】

- 実験 B の非結合画分「Protein G 素通り」のうち、ピーク画分より、**50 μ g** 蛋白質を採取、また、実験 D で採取した「イムノグロブリン画分」のうち、**50 μ g** 蛋白質を採取し、それぞれ 1%BSA-TBS 溶液を加えて、**100 μ g** 蛋白質画分/ml の溶液 **0.5 ml** を調製する。

【抗原 rhEPO を PVDF 膜上へ固相化】

メタノール処理中の PVDF 膜を TA が用意する。→なぜメタノールによる前処理が必要か？

- PVDF 膜を乾かさないう TBS 中に移し、3 分以上濡らして、十分にメタノールから置換する。
- 角の一部をカットした PVDF 膜を、簡易ブロッターのアクリル板に挟んでセットする。
- PVDF 膜をブロッターにセットしたまま、絶対量 **25 ng** の rhEPO を試料ウエルへ注入する。
- 液面が落ち着いたら、軽く陰圧で引きながら試料ウエルの溶液を吸引する。
- この時、吸引される溶液は PVDF 膜を通過し、溶液中の rhEPO は膜に吸着する。
- 膜面が乾かない内に、各試料ウエルへブロッティング溶液 1% BSA-TBS 溶液を注入する。
- ブロッティング以降、一次抗体染色後の洗浄までブロッターにセットしたまま進める。それ後は、15 ml チューブの染色槽へ移して進める(次ページに手順を示す)。

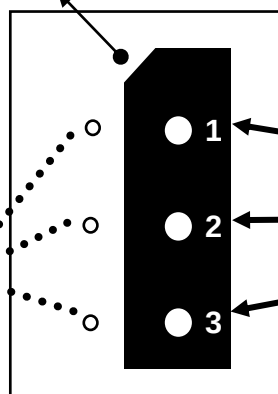
【簡易ブロッターについての補足説明】 研究室オリジナルの道具を本実習で用いる。

- 小ウエルと試料ウエルの液面高を一致させることによって、試料ウエルへ注入した溶液は保持される、この間に、PVDF 膜に固相化した分子と試料ウエル中の溶液を反応させることができる。
- 反応を終える場合は、陰圧源(アスピレータ)を用いて小ウエルから試料ウエルの溶液を吸引する。ただし膜を長時間乾燥させてはいけない。次に試料ウエルに注入する溶液が膜面に充分に行き渡らず、染色ムラの原因となる。

1. アクリル板の間に、PVDF 膜をセットする(黒色部分)。膜の角の一部をカットし、膜の方向の目印とする。

2. ブロッティングと洗浄が終了したら、それぞれのウエルへ試料を注入する。
(100 μ g 蛋白質画分/ml の標品を 0.2 ml 以下要する)

3. この小ウエルに陰圧源をつなげて吸引すると、試料ウエルの試料が吸引される。

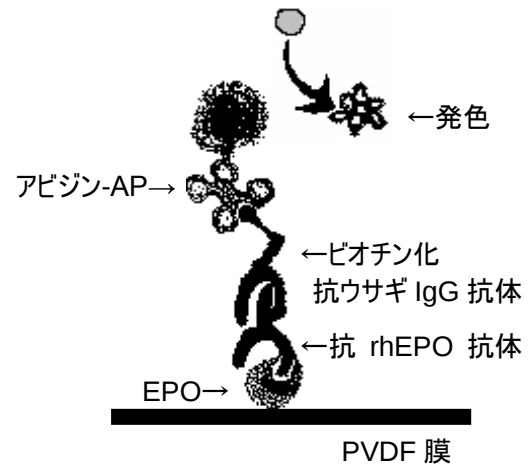


ウエル 1: 1%BSA-TBS 溶液(対照)

ウエル 2: ProteinG 素通り画分

ウエル 3: ProteinG 吸着画分

簡易ブロッター [上から見た図]



【ドットブロット法における免疫染色】

ブロッキング	10 分	1% BSA-TBS 溶液 (< 0.2 ml/ウエル)
		ブロッターにセットしたまま、小ウエルからゆっくりと吸引
洗浄	2 分 2 回	TTBS (0.2 ml/ウエル以上)
		ブロッターにセットしたまま、小ウエルからゆっくりと吸引 試料ウエルへ、一次抗体または対照溶液を注入 (< 0.2 ml/ウエル)
一次抗体染色	20 分	・試料ウエル 1: 1% BSA-TBS 溶液 ・試料ウエル 2: Protein G カラム素通り溶液 ・試料ウエル 3: イムノグロブリン画分溶液
		ブロッターにセットしたまま、小ウエルからゆっくりと吸引し、
洗浄	2 分 2 回	TTBS (< 0.2 ml/ウエル)
		洗浄後、二次抗体溶液を入れた 15ml チューブ (染色槽) へ PVDF 膜を移す。
二次抗体染色	30 分	ビオチン化抗ウサギ IgG ヤギ抗体 [1% BSA-TTBS 溶液] 市販品を 3000 倍希釈し 10 ml に調製
洗浄	3 分 3 回	TTBS (10 ml x 3)
		ここで、PP チューブ (染色槽) を同じもの 1 本にまとめる。
酵素標識	30 分	アルカリフォスファターゼ標識アビジン [1% BSA-TTBS 溶液] 市販品を 1000 倍希釈し 10 ml に調製
洗浄	2 分 2 回	TTBS (10 ml x 2)
洗浄	2 分 2 回	TBS (10 ml x 2)
基質添加 発色可視化		BCIP/NBT-Tris (100/1) 溶液 (10 ml)
風乾		

- それぞれの抗体の 2 枚のブロットをまとめて、ブロッキング剤の入った 1 本の 15 ml PP チューブにいれる。次いで、下記の通り、順番に染色工程を進める。
- コピー・写真等を取り、あるいはラミネートパウチ。元本は TA に提出する。

イムノグロブリン(Ig)の精製【総括討論と考察のポイント】

「イムノグロブリンの精製」のレポートでは

- ✓ 実験数値を整理し、適切にグラフ化し、結果をまとめた上で考察を展開せよ。
- ✓ 適切なグラフ(折線・棒・曲線・散布図)を選択し、凡例や軸名を適切に記載せよ。
- ✓ 以下の Q1 以降の解を検討し、実験原理の理解と、結果考察の能力を高めよ。

【分子】

- Q1 生体中の EPO 分子には、糖鎖が付加される。動植物の蛋白質に付加される糖鎖にはどのようなものがあるか？糖鎖の付加によって、分子の物理化学的あるいは生物学的な性質はどのように変化するのか？そのほか、翻訳後修飾にはどのようなものがあるか？
- Q2 一般に、糖鎖を抗原とする抗体産生は起こらず、抗体が認識する抗原分子はペプチド(ポリペプチド)である。それは何故か？しかし一方、糖鎖を認識する抗体は存在する。どのような抗体が知られているか？

【精製】

- Q3 透析法などに比較して、ゲルろ過法による溶媒交換の原理と、メリット・デメリットを挙げよ。
- Q4 アフィニティ精製法の原理や種類を挙げよ。
- Q5 抗体の精製にあたり、他の手法との比較を述べよ。
ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の「最適」な精製法についてはどうか？
Protein A と Protein G の特性の違いや、使い分けを説明せよ。
- Q6 クロマトグラフィーにおいて、UV 吸収、電気導電率、pH のモニタリングは、なぜ必要か？
- Q7 実験 B にて、なぜ溶出液の中和が必要なのか？
- Q8 蛋白質定量の実施において、配慮すべき諸点を挙げよ。
- Q9 Protein G カラムによる総蛋白質回収率を算定せよ。
- Q10 Ig は、血清総蛋白質中に、どれくらいの比率で存在すると言えるか？
そのうち、特異的に rhEPO を認識する抗体は、どのくらい存在すると考えてよいのか？
- Q11 rhEPO 特異抗体のみを精製したい場合には、どのような手段を適用すれば良いか？
- Q12 実験 C で、実験 A で溶出された BSA の定量の際、標準蛋白質にウシ IgG を用いた。
しかし、Bradford 法には蛋白質定量法の原理上、考慮すべき問題がある。それは何か？

【限外濾過法】

- Q13 実験 D では限外濾過法により濃縮した。実は限外濾過により溶媒交換も可能である。
その場合、「実験 F」ELISA における G-25 カラムの処理は省略出来る。
どうしたら良いだろうか？実際、結果的にそのようになった実験班もあるに違いない。
- Q14 限外濾過濃縮法の利点と、実験上の注意を述べよ。

【免疫染色法】

- Q15 ドットブロット法と ELISA 法、ウエスタンブロット法の違いと使い分けについて説明せよ。
- Q16 ブロッキングとは何か？なぜ必要か？
- Q17 アビジン-ビオチンの系は、様々な生物学実験で頻用される。その原理を説明せよ。

酵素免疫学的測定法

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA

【この実験の狙い】

- ドットブロット法, ウェスタン染色法に並び,
精製抗体を用いた生体因子の定量法として代表的な ELISA の手法を学ぶ。
- ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の特性や利用法の違いを理解する。
- 蛋白質修飾法の一例としてビオチン化を学び,
ポリクローナル抗体を用いた実践的な ELISA 構築を経験する。
- マイクロプレートを利用したポリスチレン樹脂固相化, 抗体反応手順の流れを理解する。
- 正確なマイクロピペット操作法を学び, さらに ng, pg といったサブ μg 量の単位に慣れる。
- ELISA 定量の手技を通じて, 物質定量のための代表的なデータ処理手順を会得する。
- 生命維持を担う造血因子の学問領域に馴染む。

【予め準備しておくこと】

- 抗原抗体反応の基本を調べておく。
- 目的を変えた Sephadex G25 カラムの利用が繰り返し登場する。円滑な手順実施・理解のために, イムノグロブリンの精製の実験結果の解釈, 特に, 実験 A の結果をまとめておく。
- マイクロソフト Excel 等を用いた表計算データ処理や, 多次回帰式の計算を勉強しておく。

【試薬】

遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチン (rhEPO; recombinant human Erythropoietin)

試料 X (rhEPO 濃度が未知である標品)

抗 rhEPO ウサギ血清イムノグロブリン画分 (前回の実験の精製保存標品)

50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 [Carbonate-Bicarbonate, pH 9.4] (固相抗体希釈用)

0.5 M Na_2HPO_4 (ビオチン化反応系 pH 調整用)

0.5 M Tris-HCl pH 8.2

活性化ビオチン: Biotin-AC₅-OSu 溶液 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DMSO (10 μl 分注) (同仁化学研究所)

($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}=454.54$)

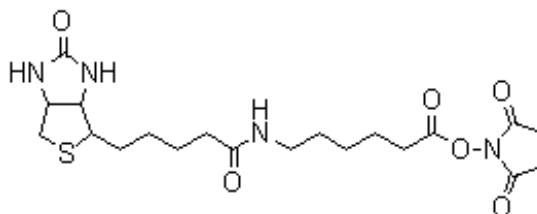
不活化しないよう保存に注意。用事調製が望ましい。

5-(N-Succinimidylloxycarbonyl)pentyl

D-biotinamide5-[5-(N-Succinimidyl

oxycarbonyl)pentylamido] hexyl

D-biotinamide



ブロッキング溶液(15ml): 0.2%ブロッケーヌ溶液(雪印乳業—大日本製薬)
10%ウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin: BSA) 溶液 (100mg/ml)

ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン (Bio-Rad 社)
TMBZ(ペルオキシダーゼ基質・停止液: 各 5ml) (住友ベークライト)

5 M NaCl, 20% EtOH, Tween 20 (Bio-Rad 社)
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
1 M Tris [hydroxymethyl] aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$ FW=121.1: TRIZMA BASE: Sigma 社)
Tween 20 (Bio-Rad 社)
TBS [10 mM Tris-HCl pH 8, 0.5M NaCl]
TTBS [0.1% Tween 20 TBS 溶液]

【器材・機器】

マイクロピペットチップ・マイクロチューブ(1.5 ml)
Sephadex G25 カラム [NAP5 カラム] (GE ヘルスケア バイオサイエンス社)
96 穴平底ポリスチレン マイクロアッセイプレート (Costar 社 #3591)
ポリプロピレン(PP)製 15ml 試験管 (染色槽として)
プレートミキサー, 多波長マイクロプレートリーダー等

実験 F イムノグロブリン(Ig)溶液の調製 (第一日)

「イムノグロブリンの精製」実験 D で得た Protein G カラム結合 Ig 画分の溶媒を,
「イムノグロブリンの精製」実験 A の結果に従って G-25 カラムを用いて, DPBS に置換する。

- カラムベッド体積の 3 倍以上の DPBS により平衡化した G25 カラムを用意する。
- 「イムノグロブリンの精製」実験Aの【条件決定】の結果を参照して,
解凍した Protein G カラム結合 Ig 画分 **0.5 ml** を添加し, DPBS 添加による溶出を行う。
蛋白質溶出画分に回収される抗 rhEPO 抗体の DPBS 溶液をチューブに採取する。

抗 rhEPO 抗体の DPBS 溶液:	体積		ml
	蛋白質濃度		mg/ml
	蛋白質量		mg

- この抗体溶液は, 次のように利用する。
 - **50~100 µg** 蛋白質分を, 実験 G「検出抗体の標識:ビオチン化」に進める。
 - **150 µg** 蛋白質分を, 実験 H「捕捉抗体を 96 穴マイクロプレート上に固相化」に進める。
 - 余剰の抗体は, TA が回収する。

このカラムは次に, 実験 H「抗体のビオチン化」に用いるので, 当日中に実施するならば,
G25 カラムは, カラムベッド体積の 3 倍以上の 1% BSA-TBS により平衡化する。
翌日以降に実施するならば, ベッド体積の 3 倍以上の 20%エタノールにより一旦, 平衡化保存し,
使用前に, カラムベッド体積の 3 倍以上の 1% BSA-TBS により平衡化する。

実験 G 検出抗体の標識:ビオチン化 (第一日)

実験 H と平行して実施しても構わない。

- 実験 F の Ig 画分の一部を, Biotin-AC₅-OSu により, 以下の手順でビオチン化する。
まず, 実験 F の Ig 画分より, **50~100 µg 分 (*)**をマイクロチューブに採取する。
* に対して, 概ね pH 8.5 となるような 0.5M Na₂HPO₄ の添加量を予め決定する。
- 0.5 M Na₂HPO₄ を滴下添加し, 反応溶液の pH を 8.5 に調整する。
必要に応じて, H₂O をさらに添加して, 最終体積を **495 µl** とする。
- Biotin-AC₅-OSu の DMSO 溶液 (**20 µg/µl**) を **5 µl** 添加する (体積合計は **500 µl**)。
- 穏やかに混和する。室温で 2 時間反応させる。
- 0.5 M Tris-HCl pH8.2 を **50 µl** 添加する (→ 反応の停止)。
- 「イムノグロブリンの精製」実験 A の分画結果の条件に従って,
反応液 **550 µl** のうち, **500 µl** を 1%BSA-TBS に溶媒交換する。

すなわち, 予め 1%BSA-TBS で平衡化した Sephadex G25 (NAP5) カラムに, 反応液 **500 µl** を添加する (この時の溶離液は不要)。次いで, **1 ml** の 1%BSA-TBS を添加すると同時に, 滴下するビオチン化抗体画分 (**1 ml**) を 15 ml 容量のポリプロピレン (PP) チューブに回収する。

未反応で遊離型活性化ビオチンは, 除去されるのと同時に, 活性がブロックされる。

- 次いで, ブロックエース含有 TTBS を **9 ml** 添加混合する。
最終濃度 0.2% ブロックエース含有 TTBS 溶液 **10 ml** となる。
この時点で, イムノグロブリン濃度は **5~10 µg /ml** になろう。
これを実験 J の「検出抗体」とする。
- G25 カラムは, ベッド体積 3 倍以上の 20% エタノールにより洗浄, 平衡化し保存する。

実験 H 捕捉抗体を 96 穴マイクロプレートに固相化 (第一日)

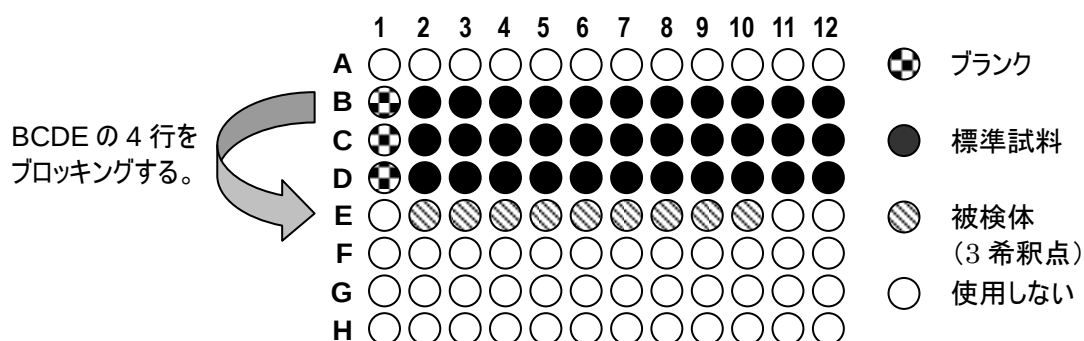
実験 G と平行して実施しても構わない。

実験 J では, 96 穴プレートののうち, 半数のウエル (48 ウエル) を利用し, 残りは利用しない。
これらのウエルに, 精製した抗 rhEPO 抗体を固相化 (コーティング) する。

- 実験 F のイムノグロブリン画分の一部 (合計 **150 µg** 蛋白質) をとり, 最終蛋白質濃度が **30 µg /ml** になるように, 50mM 炭酸ナトリウム緩衝液 pH 9.4 で希釈調製 (**5 ml**) する。
- これを 96 穴マイクロプレートの 48 穴に **100 µl** ずつ分注する。(次ページの図を参照)
- 各ウエルの接液部に抗体を吸着固定させるために, 室温で 4 時間以上静置, ないし, 室温で 2 時間, 次いで 4℃ で終夜静置する。(TA に適宜相談のこと)
- この後, 時間に余裕があれば, 第一日目に実験 J のブロッキングまで進むと良い。

この段階まで進んだら, 実験 J 「抗体染色」の作業手順を確認しておくこと。

マイクロプレート上の試料配置



実験 I ELISA の試料の準備 (第二日)

標品の凍結融解の繰り返しを避けるために、第二日に実施することが望ましい。

- 下表に従い、rhEPO 標準試料の希釈系列を調製する。すなわち、0.1%BSA(キャリア蛋白質)を含む DPBS(0.1%BSA-DPBS)溶液を希釈媒体とし、各濃度 3 ウエル分 300 μ l, ピペッティング操作余剰分 50 μ l, 合計 350 μ l づつ調製する。
- 試料 X は濃度が未知である。測定値を検量範囲におさめることを期待し、希釈系列を TA の指示に従って 3 点設定し、それぞれ 0.1%BSA-DPBS 溶液を調製する。各濃度 3 ウエル分 300 μ l, ピペッティング操作余剰分 50 μ l, 合計 350 μ l づつ調製する。

【標準試料の希釈系列】

試料ウェル位置		rhEPO 濃度		原液	0.1%BSA
行	列	ng/ml	IU/ml	10 ng EPO/ml (μ l)	DPBS 溶液 (μ l)
B・C・D	1	0.000	0.000	0.00	350
B・C・D	2	0.500	0.100	17.5	332.5
B・C・D	3	1.00	0.200	35.0	315
B・C・D	4	2.00	0.400	70.0	280
B・C・D	5	3.00	0.600	105	245
B・C・D	6	4.00	0.800	140	210
B・C・D	7	5.00	1.00	175	175
B・C・D	8	6.00	1.20	210	140
B・C・D	9	7.00	1.40	245	105
B・C・D	10	8.00	1.60	280	70.0
B・C・D	11	9.00	1.80	315	35.0
B・C・D	12	10.0	2.00	350	0.00

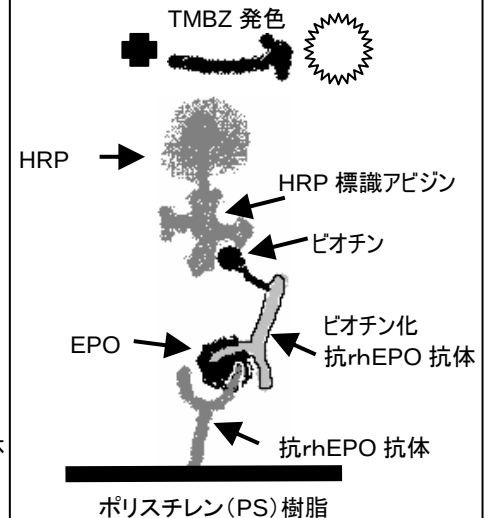
実験 J ELISA による未知濃度試料の測定（第二日）

- 酵素免疫反応の以下の工程を順次進める
 - ✓ 「攪拌」では、強すぎず弱すぎずプレートミキサーの回転数を調整し、10 秒程度で充分。
 - ✓ ブロッキング、抗体添加の工程では、指定より長くなって構わない(実時間を記録のこと)。
 - ✓ 洗浄の各工程では、ウェルを乾燥させなければ、指定時間以上静置しても構わない。

【酵素免疫反応手順】

第 1 日 捕捉抗体の固相化	実験 H の実施	室温 4 時間以上、ないし 室温 2 時間以上静置し さらに、4℃ で終夜静置
第 1 日または第 2 日 遊離余剰抗体の廃棄		ブロッキング直前に実施
第 1 日または第 2 日 ブロッキング	1 時間以上 300 μl/ウェル	0.2%ブロックエース TBS 溶液 (Tween 不含)
第 2 日 洗浄・攪拌	3 分 1 回 200 μl/ウェル	TTBS
試料の添加	1 時間 100 μl/ウェル	標準品および濃度未知試料 X の 0.1%BSA(キャリア蛋白質)溶液
洗浄・攪拌	200 μl/ウェル 2 分 3 回	TTBS
検出抗体	1 時間 100 μl/ウェル	実験 G で得たビオチン化一次抗体 ブロックエース・BSA・TTBS 溶液
洗浄・攪拌	2 分 3 回 200 μl/ウェル	TTBS
酵素標識	1 時間 100 μl/ウェル	HRP 標識アビジン 0.2%ブロックエース溶液 原液を 6000 倍希釈し 10ml に調製
洗浄・攪拌	2 分 3 回 200 μl/ウェル	TTBS
洗浄・攪拌	3 分 1 回 200 μl/ウェル	TBS
基質添加・発色	適宜 100 μl/ウェル	TMBZ 発色液（用時混合調製）を添加後、 穏やかに攪拌しながら、発色を観察する。
停止	適宜 100 μl/ウェル	適度な発色点に到達したら、 停止液を加える。
定量	λ ₁ = 450 nm λ ₂ = nm	マイクロプレートリーダーで吸光度測定。

本実験における 酵素抗体抗原複合体の模式図



実験 K データの処理

- 検量線を作成する。 $[EPO\ Conc] = a[Abs]^3 + b[Abs]^2 + c[Abs] + d$
3 次回帰式, 2 次回帰式 ($a=0$), 直線回帰式 ($a=0$ かつ $b=0$) の各々の近似式を求め、それらのうち、最適なカーブフィットが得られたものを検量線として用いる。
- 結果を表にまとめ、グラフを作成し、さらに濃度未知試料の検量値を算出する。

「酵素免疫学的測定法: ELISA」のレポートでは

- ✓ 実験数値を整理し、適切にグラフ化し、結果をまとめた上で考察を展開せよ。
- ✓ 適切なグラフ(折線・棒・曲線・散布図)を選択し、凡例や軸名を適切に記載せよ。
- ✓ 以下の Q1 以降の解を検討し、実験原理の理解と、結果考察の能力を高めよ。

【抗体の調製・ビオチン化】

- Q1 本実験では、透析チューブによる透析法に代えて、積極的に Sephadex G25 のミニカラムを溶媒交換の手段として用いた。特に試料量が少ない時に便利な方法である。しかしいずれの方法をとっても、試料濃度が稀薄である場合に注意すべきことがある。どのようなことか？
- Q2 ビオチン化反応停止に、Tris を用いた理由を述べよ。また、その「理由」により、反応系の構成成分に注意すべき点がある。本実験の手順では、どのように解決がなされているか？
- Q3 本実験のプロトコルでは、抗体の 1 分子当り、3~10 分子のビオチンが共有結合される。結合するビオチンが不足した場合、あるいはその逆に過剰な場合、ELISA に与える影響は？

【ELISA の原理】

- Q4 本実験では、固定化された捕捉抗体にポリクローナル抗体、そして検出抗体にもポリクローナル抗体を利用した手法(ポリクローナル抗体ーポリクローナル抗体によるサンドイッチ ELISA)を学んだ。この方法によれば、モノクローナル抗体を得る労を経ずして、ポリクローナル抗体さえ取得できれば、目的とする分子の定量が可能となる。しかし多くの研究では、捕捉あるいは検出のどちらか、あるいは両方の抗体にモノクローナル抗体を用いる。その理由は何か？
- Q5 「ポリクローナル抗体ーポリクローナル抗体によるサンドイッチ ELISA」では、抗原をどのように「サンドイッチ」するのか？「モノクローナル抗体ーモノクローナル抗体によるサンドイッチ ELISA」では、利用する二種のモノクローナル抗体の抗原認識特性はどうあるべきか？
- Q6 ELISA の検出感度を上げるために実際に行われている方法を述べよ。
- Q7 ELISA の発色反応の測定には、エンドポイント法以外に、どのような方法があるか？

【検体の測定】

- Q8 未知濃度の EPO 濃度は、正しく測定出来たか？不成功の場合は、理由・解決法は何か？
- Q9 本 ELISA の EPO 定量限界(Quantitation limit)、定量範囲(Quantitation Range)、95%信頼区間(confidence interval)、検出限界(Detection limit)などの統計値算定に挑戦してみよ。
- Q10 本 ELISA は、ヒト健常人の EPO 血中濃度を測定するために十分な感度をもつか？不十分である場合、どのような対策が必要か？検体前処理、ELISA の感度向上の両面から考案せよ。
- Q11 血液中の EPO、細胞培養上清中に分泌された EPO など、試料の溶媒や共存溶質が異なると、測定値が変化することがある。どのようにしたら、真値を保証することが出来るか？補正をかけるにはどうしたら良いか？
- Q11 検体中に、EPO の可溶性受容体(Soluble Receptor)が共存しているとする。この場合、EPO 濃度の定量測定に、どのような影響があると考えられるか？