

C213

イムノ PCR 法によるオープンサンドイッチ免疫測定法の高感度化

(東大院工・化生) ○ (正) 董金華・(学) シャリフ ハサン・(正) 上田 宏*

1. 緒言

免疫測定法は特に疾病の診断において重要な役割を担っている。伝統的なサンドイッチ免疫測定法では多くの抗原を高感度に測定できる反面、2種類の抗体を用いた最低2回の反応が必要な難点がある。また小分子抗原の検出のためには競合免疫測定法が行われるが、必要な感度と濃度域を得るためには綿密な条件検討が必要な難点がある。一方、オープンサンドイッチ免疫測定法 (Open Sandwich Immunoassay, OS-IA)は抗体の抗原認識部位を構成する重鎖可変領域(V_H)と軽鎖可変領域(V_L)のみを用いる方法で、これら従来法と比較し、小分子でも非競合的に測定でき、測定時間も短縮されるなど多くの利点がある。今回我々は OS-IA の一層の高感度化を目標に、検出ステップを定量的 PCR (Q-PCR)と組み合わせた OS イムノ PCR 法の検討を行った。

2. OS イムノ PCR 法

OS イムノ PCR 法の原理を Fig. 1 に示す。OS フェージ ELISA 法では、 V_L (或はそのコンジュゲート) を固定化し、 V_H を提示するフェージと抗原の混合物を添加して、その後、抗フェージ抗体を用いて、 V_L と抗原を介して固定化されたフェージの量を測定する。OS イムノ PCR 法は、OS 原理に基づき、 V_L 及び抗原を介して固相化された、 V_H を提示したフェージの DNA を抽出して、PCR 法により V_H 遺伝子を増幅させ、その DNA の量によって、元々のサンプルに含まれる抗原 (或は小分子物質) の量を算出する方法である。この方法で微量のフェージでも検出でき、また、 V_H 遺伝子特異的プライマーを用いることで、感度と特異性の向上が期待できる。またサーマルサイクラーで多数のサンプルを同時処理することで、診断のスループット向上も期待される。

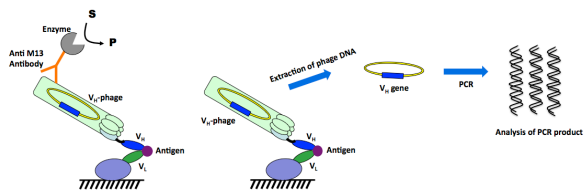


Fig.1 Principle of OS-immuno PCR

3. 実験方法

モデル抗体として今回は骨代謝の診断マーカーであるオステオカルシン (Bone Gla Protein, BGP) 認識抗体 KTM219¹⁾およびその変異体 R4A10²⁾を用い、BGP の C 末端ペプチドの検出感度向上を試みた。抗体 KTM219 軽鎖可変領域 V_L は大腸菌細胞質でマルトース結合蛋白質 (MBP) と融合させて発現、精製した。R4A10 の V_H を提示するフェージは大腸菌 TG-1 とフェージミド pIT2VH およびヘルパーフェージ KM13 を用いて調製し、終濃度 10^{10} cfu/ml で用いた。まず $10 \mu\text{g/ml}$ の MBP- V_L をマイクロプレートに固定化、ブ

ロッキングし、その後 V_H を提示したフェージと種々濃度の抗原を混合し、ウェルに添加した。室温 1 時間反応後洗浄を行い、一部のウェルに抗フェージ抗体を添加しフェージ ELISA を行った。また、他のウェルに固定化されたフェージ由来 DNA を純水中 95°C , 10 分の熱処理で抽出した。抽出液を用いてフェージ DNA 中の V_H 配列の PCR 増幅を行い、更に同じプライマーと SYBR Green を用いて Mini Opticon (Bio-Rad) で Q-PCR を行いフェージ由来 DNA 量を定量した。

4. 結果

1) PCR による増幅確認 抽出された DNA 溶液をテンプレートにし通常の PCR を行った。Fig. 2 に示すように固定化 V_L がない場合に増幅された DNA 量が最も少なく、 V_L 存在時には抗原濃度の増加に従い、増幅された DNA の量が増加した。

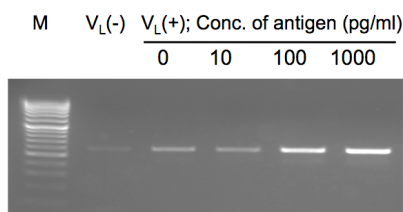


Fig. 2 Amplification of V_H sequence. M: 100 bp ladder
2) OS イムノ PCR と OS フェージ ELISA 更に Q-PCR によりフェージミド DNA の定量を行った。算出された DNA 量及びフェージ ELISA で得られた吸光度に基づき、それぞれ抗原濃度の検量線を作成した (Fig. 3)。その結果、低濃度領域 ($10\text{-}100 \text{ pg/ml}$) で OS イムノ PCR はバックグラウンドと比較して有意に高い値を示し、測定感度の向上が示唆された。

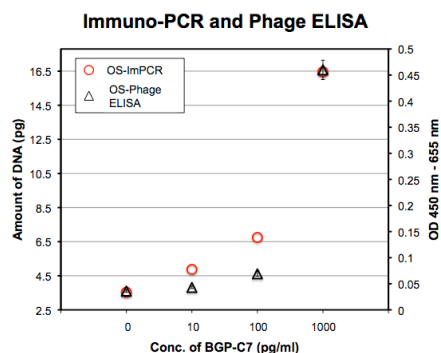


Fig. 3 Comparison of OS Immuno-PCR and OS phage ELISA

5. 結言

本法によって BGP ペプチドの検出感度向上が示唆された。今後、他の抗原の測定でさらにこれを確認したい。

参考文献

- 1) S.-L. Lim et al., *Anal. Chem.* **79**, 6193-6200, 2007.
- 2) H. Iwai et al., *PEDS*, in press, 2010.

*Email: hueda@chembio.t.u-tokyo.ac.jp