

## キットを用いたモノクローナル抗体の迅速・簡便なペルオキシダーゼ標識法

広田次郎，清水眞也\*

(平成16年8月5日 受付)

### Introduction of protein labeling kit.

Jiro HIROTA, Shinya SHIMIZU\*

イムノアッセイは免疫学をはじめ組織学，臨床，分子生物学，生化学等の分野で多用されており，抗原等の検出，定量に欠かせない分析法となっている。抗原と結合したモノクローナル抗体 (mAb) やポリクローナル抗体の検出には一般的に標識された二次抗体が使用されている。この理由として，標識された抗体が多数販売されている。抗体に直接酵素や蛍光物質を標識する技術は高度で熟練を要する。標識過程で特異性の減少や失活が生じることが挙げられる。しかし，直接標識には，実験手順の簡略化，多重染色の可能性が広がる，二次抗体の影響の排除等，多くの利点があるため，簡易な直接標識技術が求められている。

本稿では，簡便な手技で，約三時間で標識が可能であり，ペルオキシダーゼ (POD) 標識過程でもmAbが失活することのないキット (株同仁化学) を用いた結果を報告する。ブルータングウイルス抗原に対するmAbを，本キットあるいは過ヨウ素酸改良法により標識し，mAb結合活性の比較を行ったところ，従来法では顕著な失活が見られたのに対し，キットで標識した抗体は高い活性が維持されており，mAbの標識に非常に有用であることが確認された。

#### はじめに

イムノアッセイは，目的物質の認識に抗原-抗体反応を利用した高感度で特異性の高い方法で，ホルモン，遺伝子や遺伝子産物，特異抗体，抗原やタンパク質あるいは病原体等を検出，定量するために欠くことのできない分析法として，免疫学，臨床をはじめ組織学，分子生物学，生化学等の分野で多用されている。

イムノアッセイには，様々な手法が開発されており，ELISA，イムノプロットング，免疫組織化学法などがよく用いられている。特に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，定量する酵素抗体法は，ラジオイムノアッセイと同程度の感度を有し，取扱いの危険性もないことから，検出系として広く用いられている。

実験室レベルにおいても，イムノアッセイに用いるモノクローナル抗体やポリクローナル抗体は多数作製され，様々な解析に用いられている。作製された抗体の検出には，標識された二次抗体を使用するのが一般的である。この理由としては，二次抗体に用いる多種類の標識抗体が市販されている上に，抗体に直接酵素や蛍光物質を標識する技術は高度で熟練を必要とし，一般的に研究室レベルでは実施しにくい。さらに，外部委託する場合，一回あたり多量の抗体が必要であり，時間も数週間必要である点が挙げられる。また，モノクローナル抗体で顕著に表れる現象であるが，酵素などを標識する過程で抗体の特異性が著しく減少したり，失活したりすることがある。

特異性や活性を損なうことなく抗体に直接酵素や蛍光物質を標識することができれば，実験手順を一部簡略化

動物衛生研究所免疫研究部免疫病理研究室  
Department of Immunology, Immuno-pathology section,  
National Institute of Animal Health

\* Corresponding author; Mailing address: Department of Immunology, Immuno-pathology section, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan Tel&Fax: +81-(0)29-838-7833. E-mail: shimizux@affrc.go.jp

し, 多重染色が可能となり, また, 二次抗体の影響を排除することができる。一方, 抗体以外のタンパク質を同様に標識することができれば, タンパク質間相互作用の解析や, 種々の解析の精度の向上を図ることも可能となる。このため, タンパク質等への酵素や蛍光物質の簡易な標識法のメリットは大きく, 要求性の高い技術である。

現在, 抗体のペルオキシダーゼ標識は, グルタルアルデヒド一段階法, グルタルアルデヒド二段階法, 過ヨウ素酸法, 過ヨウ素酸改良法, マレイミド法が一般に用いられている。これらの方法は, 開発の歴史はかなり古いにもかかわらず, 抗体の標識を外委託した場合に, 現在でも多く用いられている方法である。表1に各方法

表1 各種ペルオキシダーゼ標識法の比較

標識法名	手 順	特 徴	問題点
グルタルアルデヒド一段階法 (1)	酵素と抗体の混合液にグルタルアルデヒドを加え, 室温で1~2時間放置することで標識する。	手法が簡便である。	IgGが重合して巨大分子となり, 抗体活性が著しく損なわれることがある。
グルタルアルデヒド二段階法 (5)	酵素を過剰のグルタルアルデヒドで処理した後, ゲルろ過によって未反応のグルタルアルデヒドを除去する。次にこのグルタルアルデヒドと結合した酵素と抗体を反応させて標識する。	グルタルアルデヒド一段階法と比較して標識抗体の重合が起こりにくい。	酵素を過剰グルタルアルアルデヒドで処理するため, ペルオキシダーゼでは活性が30~50%減少することがある。(2, 3, 4)
過ヨウ素酸法 (7)	ペルオキシダーゼのアミノ基をすべて1-fluoro-2,4-dinitrobenzene(FDNP)によりブロックする。次いでこのDNP化されたペルオキシダーゼの糖の部分を過ヨウ素酸で酸化し, 酸素分子に結合したアルデヒド基を作り出す。ペルオキシダーゼのアルデヒド基と抗体のアミノ基を反応させ, シッフ塩基を形成させて標識する。	効率的にペルオキシダーゼを抗体に標識することができる。	標識抗体がself-couplingにより重合しやすくなることがある。また, すべてのアミノ基をブロックしても活性が失われない酵素以外には適応できない。
過ヨウ素酸改良法 (8, 9)	過ヨウ素酸法での, FDNPの使用を止め, pHを4~5に保った状態でペルオキシダーゼと過ヨウ素酸ソーダを反応させる。	過ヨウ素酸法では, その35%がself-couplingによってdimerとなるのに対し, 過ヨウ素酸改良法ではdimerは5%程度に抑えることができる(9)。	アミノ基をブロックしても活性が失われない酵素以外には適応できない。
マレイミド法 (6)	酵素等をN-hydroxysuccinimide ester (N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) 等で処理し, マレイミド基を導入する。次いでこの酵素と還元型抗体とを反応させる。	pH中性域の温和な条件で反応が進行する。マレイミド基やチオール基はタンパク質のアミノ基や水酸基等とはほとんど反応しないため, self-couplingを起こさない。タンパク質にチオール基が無い場合には, アミノ基が存在していれば, これを利用してチオール基を導入することができるため, 多くのタンパク質に標識が可能である。	詳細な条件検討が必要である。

の概要を示す。

これらの標識法を行うには、一連の試薬をそろえ、条件検討を行い、標識後に精製および濃縮が必要である上に、抗体の活性低下や失活の問題もあり、通常の研究レベルでは実施しにくい技術である。また、専門業者に標識を依頼する場合でも、最低数mgの抗体が必要であり、価格は十万円から二十万円（抗体10mg当たり）と高価である上、二週間以上の時間がかかる。しかし、研究室レベルでは一般的に100 µg程度の抗体があれば通常の実験を行うことができるため、少量の抗体での簡易標識法の開発が望まれている。今回私たちは、簡便な手技で、モノクローナル抗体が失活することなくペルオキシダーゼ標識できる手法を評価したので、その結果を紹介する。

今回評価したキットは、(株)同仁化学研究所製の Peroxidase Labeling Kit - SH（以下 - SHキット）および Peroxidase Labeling Kit - NH<sub>2</sub>（以下 - NH<sub>2</sub>キット）である。- SHキットは抗体の - SH基に標識するキットであり、同梱の還元剤を使用することでヒンジ領域のジスルフィド結合を開裂して標識することができる。この還元剤は、抗体のL鎖とH鎖の解離が生じないように、条件検討されている。- NH<sub>2</sub>キットは抗体の - NH<sub>2</sub>基に標識するキットで、従来の酵素標識法に比較して、抗体活性の低下を招く抗原結合部位への酵素標識は少なく押さえられている（同仁化学研究所の開発者）。

これらのキットの共通の特徴は、標識に必要な抗体量は50～200 µgであり、精製および濃縮に Filtration Tubeを用いるので、ゲルろ過や透析の必要もなく、標識に要する時間は三時間程度と短い点である。

Filtration Tubeは、特定の分子量以下の分子を通過させるフィルターと、そのフィルターを支えるチューブにより構成されている。抗体はFiltration膜を通過できず、膜上に保持されるので、遠心することにより未反応試薬やアジ化ナトリウム、バッファー類の低分子化合物の分離を行ったり、抗体の濃縮を行うことができる。

## 方法

### 抗体

モノクローナル抗体はブルータングウイルス抗原に対する（8A3B.6, IgG2b）を腹水より精製したものをを用いた。

### 酵素標識法

ペルオキシダーゼ標識は、グルタルアルデヒド二段階法、過ヨウ素酸改良法、(株)同仁化学研究所製

Peroxidase Labeling Kit - SHおよび Peroxidase Labeling Kit - NH<sub>2</sub>により行った。標識手順はグルタルアルデヒド二段階法（5）、過ヨウ素酸改良法（7）は文献に従い、- SHキット、- NH<sub>2</sub>キットは添付マニュアルに従った。

4種類の手法により作製したペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の活性を以下に示す手順で比較した。

### 酵素標識抗体の活性比較

各ペルオキシダーゼ標識抗体は280 nmにおける吸光度（A<sub>280</sub>）を測定し、タンパク質濃度を求めた。各標識抗体について、10 µg/ml、5 µg/ml、2.5 µg/ml、1.25 µg/ml、0.625 µg/ml、0.313 µg/ml、0.156 µg/mlの希釈列を作製した。

プレート（MAXISORP, Nunc）に不活化ブルータングウイルス抗原を37 °Cで60分吸着させ、次いで20%のBlock Ace（大日本製薬）で37 °Cで60分ブロッキングした。このプレートに各標識抗体の希釈系列を分注し、37 °Cで60分反応させた。反応終了後ペルオキシダーゼ基質液（ABTS, Sigma）を分注し、37 °Cで30分インキュベーションを行い、プレートリーダーにて405nmでの吸光度を測定した。なお、プレートの洗浄は各行程ごとに行った。

### 結果および考察

- SH、- NH<sub>2</sub>キットおよび過ヨウ素酸改良法によるペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体のPOD活性を図1に示した。なお、グルタルアルデヒド二段階法によりペルオキシダーゼ標識したモノクローナル抗体は、抗原への反応性が全く確認されなかったため、図には表示していない。

図1に示すように、- SHキットによる標識抗体では、低い抗体濃度でも高いIOD値を示した。0.625 µg/ml以上のタンパク質濃度では測定限界以上に達したため、検出限界以上のOD値は2.0として示した。この結果は、マレイミド法がヒンジ部への特異的な標識であり、また方法上self-couplingが少なく、pH中性域での温和な反応であるために、抗体およびペルオキシダーゼの活性がほとんど損なわれなかったためであると考えられた。

次に、- NH<sub>2</sub>キットによる標識抗体では、同じタンパク質濃度でのOD値が- SHキットによる標識抗体と比べ、約1/2であった。この理由として- SHキットでは、IgG（分子量150,000）は還元型IgG（分子量75,000）となり、この還元型IgG分子にペルオキシダーゼが標識さ

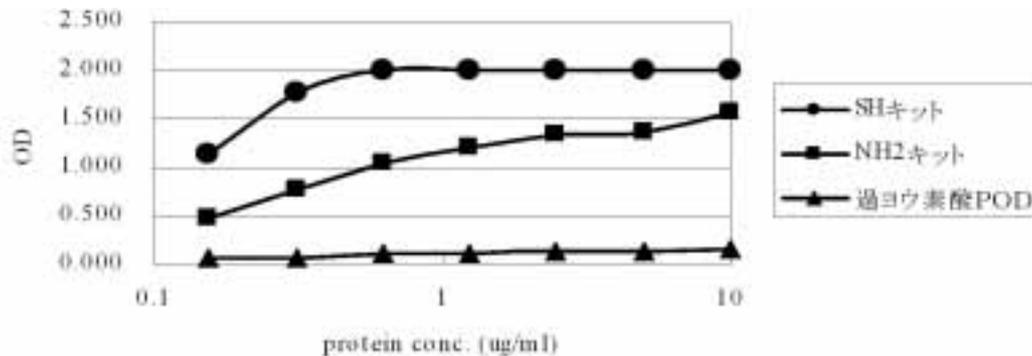


図1 3種類の作製法で作製したPOD標識抗体の蛋白濃度当たりの酵素活性

れる。これに対し、-NH<sub>2</sub>キットではIgG分子にペルオキシダーゼが標識される。このためタンパク質量あたりのペルオキシダーゼ分子数は、-SHキットで作成したものの方が-NH<sub>2</sub>キットで作製したものの2倍近くとなるためであることが考えられる。また-NH<sub>2</sub>法では、-SH法とは異なり抗体の特定部位に酵素がラベルされるわけではない。このため、抗原認識部位にも標識され、OD値が低下するとも考えられる。

過ヨウ素酸改良法で標識した抗体では、-SHキットや-NH<sub>2</sub>キットと比べて著しくOD値が低く、操作の過程でモノクローナル抗体の活性が大きく低下したと考えられた。ポリクローナル抗体では、グルタルアルデヒド二段階法や過ヨウ素酸改良法により酵素標識した場合でも、抗体の活性は充分使用可能な範囲であることが多い。しかし、抗原を認識する部位が単一であるモノクローナル抗体では、pHの影響などで抗体の活性が著しく低下、あるいは失活することが知られている。今回用いたモノクローナル抗体においても、グルタルアルデヒド二段階法で標識した抗体は抗原との反応性をほぼ失い、過ヨウ素酸改良法においても抗原との反応性は著しく低下していた。モノクローナル抗体の種類により失活の程度は異なると考えられるが、モノクローナル抗体への標識にグルタルアルデヒド二段階法や過ヨウ素酸改良法は適当ではないと思われた。

モノクローナル抗体への標識には、pH中性領域での温和な反応であり、抗原認識部分とは無関係なヒンジ部のSH基に選択的に標識可能なマレイミド法が適している。特にこのマレイミド法を利用した-SHキットは、詳細な条件検討を必要とせず、モノクローナル抗体を失活させることなく迅速・簡単に標識することができることから利用価値の高い優れたキットであると考えられる。

また本キットでは、抗体に限らずタンパク質一般を標識することも可能であり、タンパク質間相互作用やプロテオーム解析などさまざまな分野に有効なキットであると考えられる。

現在のところ、(株)同仁化学研究所による標識キットは、アルカリフォスファターゼやペルオキシダーゼをSH基又はNH<sub>2</sub>基に標識するキット、ビオチンやFITC、Oyster-dyeをNH<sub>2</sub>基に標識するキットが発売されている。なお、FITC標識キットで私たちが試用した結果、今回と同様の手順で、抗原結合性の低下もなく簡便・迅速に蛍光標識可能であった。

#### 引用文献

- 1) Avrameas, S. : Coupling of enzymes to protein with glutaraldehyde. Use of the conjugate for the detection of antigen and antibodies. *Immunochemistry*, 6:43-52, (1969).
- 2) Boorsma, D.M., and Kalsbeek, G.L. : A comparative study of horseradish peroxidase conjugates prepared with one-step and two-step method. *J. Histochem. Cytochem.*, 23 :200-207, (1975).
- 3) Boorsma, D.M., and Streefkerk, J.G. : Peroxidase-conjugate chromatography. Isolation of conjugate prepared with glutaraldehyde or periodate using polyacrylamide-agarose gel. *J. Histochem. Cytochem.*, 24 : 481-486, (1976).
- 4) Boorsma, D.M., Streefkerk, J.G. and Kors, N. : Peroxidase and fluorescein isothiocyanate as antibody marker. A quantitative comparison of two peroxidase conjugates prepared with

- glutaraldehyde or periodate and a fluorescein conjugate. *J. Histochem. Cytochem.*, 24 : 1017-1025, (1976).
- 5) Engvall, E., and Perlmann, P. : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8:871-874, (1971).
- 6) Kato, K., Hamaguchi, Y., Fukui, H., and Ishikawa, E.: Enzyme-linked immunoassay I. Novel method of synthesis of the insulin- $\beta$ -D-galactosidase conjugate and its applicable for insulin assay. *J. Biochem*, 78 : 235-237, (1975).
- 7) Nakane, P.K., and Kawaoi, A. : Peroxidase-labelled antibody. New method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 1084-1091, (1974).
- 8) Nakane, P.K. : Preparation and standardization of enzyme-labelled conjugates. PP.81, in :R.M. Nakamura, W.R. Dito and E.S. Tucker, (eds.) :*Immunoassay in the Clinical Laboratory*, Alan R. Liss Inc., New York, (1979).
- 9) Wilson, M.B., and Nakane, P.K. : Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase(HRPO) to antibodies. pp.215, In : W.Knapp, K. Holuber and G. Wick(eds.) : *Immunofluorescence and related staining techniques*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, (1978).