

わずか 15 分で完了する「Capturem テクノロジー」を用いた抗体標識



はじめに

抗体標識は、蛍光色素やビオチンなどで抗体を標識する技術です。主に免疫化学研究で利用され、特に成長が著しい抗体-薬物複合体 (Antibody-drug conjugate, ADC) の医薬品研究において重要な役割を担っています。しかし従来の抗体標識技術は、精製や長時間のインキュベーションが必要で、時間と労力がかかるという問題点がありました。タカラバイオではこの問題点を改善するために「Capturem テクノロジー」を採用し、その結果、カラム上で標識を行うことで未精製の抗体を直接利用できるようになり、わずか 15 分での抗体標識を可能にしました。

ご紹介する実施例 1 および 2 では、「Capturem テクノロジー」を使用して蛍光色素とビオチンで標識された Cas9 をターゲットとしたマウス IgG 抗体が、問題なく抗原を認識していることが示されています。

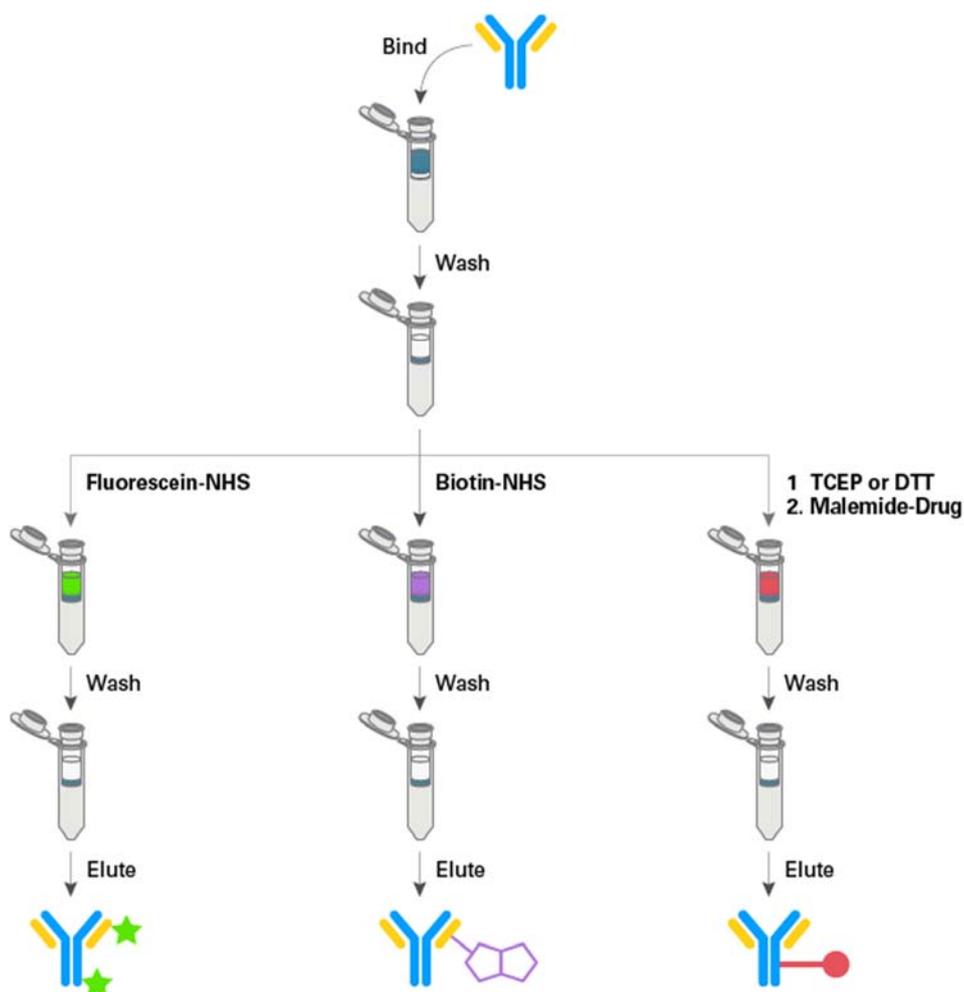


図 1. 抗体を直接、迅速に標識するフローの概略

まず、抗体を Binding buffer で希釈し、カラムを Binding buffer で平衡化します。次に、希釈した抗体をカラムにロードし、Wash buffer で洗浄します。使用する標識試薬を適切なバッファーに溶解し、カラムに通して抗体の標識プロセスを完了します。標識された抗体を回収するために、もう一度カラムを洗浄し、適切な Elution buffer で抗体を溶出します。抗体標識の全プロセスは 15 分以内に完了します。

実施例 1 : 抗体の蛍光標識

蛍光色素-NHS で、Cas9 検出用マウス IgG 抗体を標識する実験を行いました。スタートサンプルはマウス IgG 抗体を含んだハイブリドーマ培地を用いた。まず、抗体 150 μg をカラムにロードし、蛍光色素-NHS 複合体を流した後に洗浄し、2 回溶出した。その結果、蛍光色素で標識された抗体が 40 μg 得られた。

A280、A493 の吸光度を測定し、蛍光色素 : 抗体のモル比を測定した。加える蛍光色素-NHS 複合体の量を変えることで (12 eq.、20 eq.、50 eq.、または 100 eq.。eq.はモル当量を表す。)、抗体 1 分子あたりに結合する蛍光色素-NHS 複合体の数が 2.97~3.3 個となった。反応液中の蛍光色素-NHS の量を増加させると、標識される抗体の割合がわずかに上昇し、最も良い反応条件は 12 eq.と 20 eq.であった。大量の蛍光色素 (50 eq.や 100 eq.) を加えると、溶出したサンプル内に遊離した色素が過剰に生じている (図 2)。

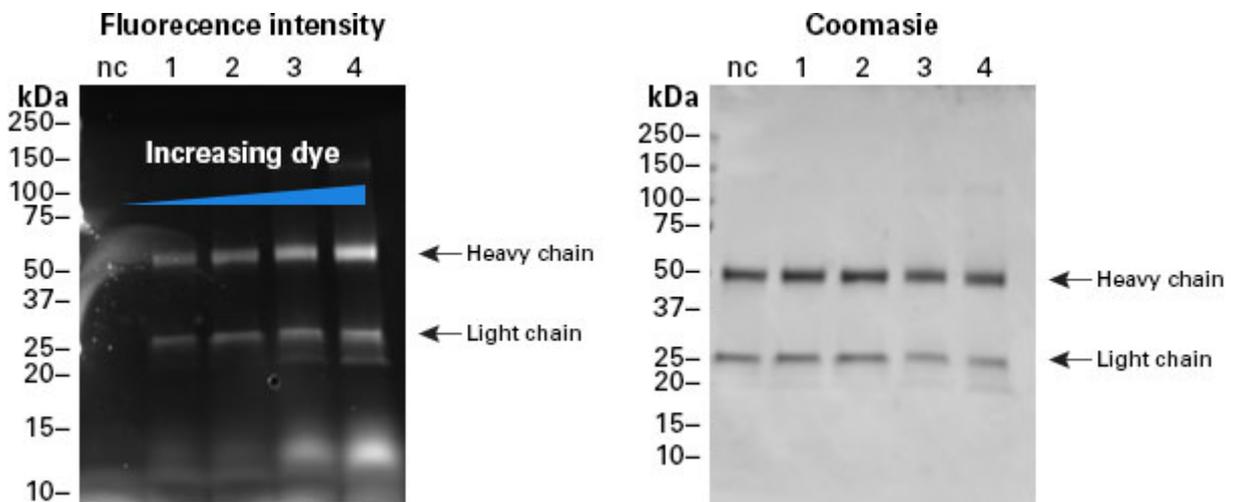


図 2. 標識反応における蛍光色素濃度の上昇は、抗体あたりの蛍光色素の高い比率を示す

左のゲル写真は、ウェルごとの蛍光色素のシグナル強度を示しており、標識反応における抗体あたりの色素分子の割合が上昇するにつれて、蛍光色素のシグナル強度が増加していることを表しています。右側のクマシー染色したゲルから、各ウェルには当量の抗体が含まれていることがわかります。nc : ネガティブコントロール、レーン 1 : 12 eq.、レーン 2 : 20 eq.、レーン 3 : 50 eq.、レーン 4 : 100 eq.の蛍光色素-NHS 複合体を加えた反応。

実施例 2：抗体のビオチン化

ビオチン標識抗体は、FACS やイメージング、または ELISA 実験など様々なアッセイの一次または二次抗体としてよく使用する。

今回、ビオチン-NHS を用いて Cas9 検出用マウス IgG 抗体の標識を行った。方法は蛍光標識と同様のプロトコールで行いました (図 3)。

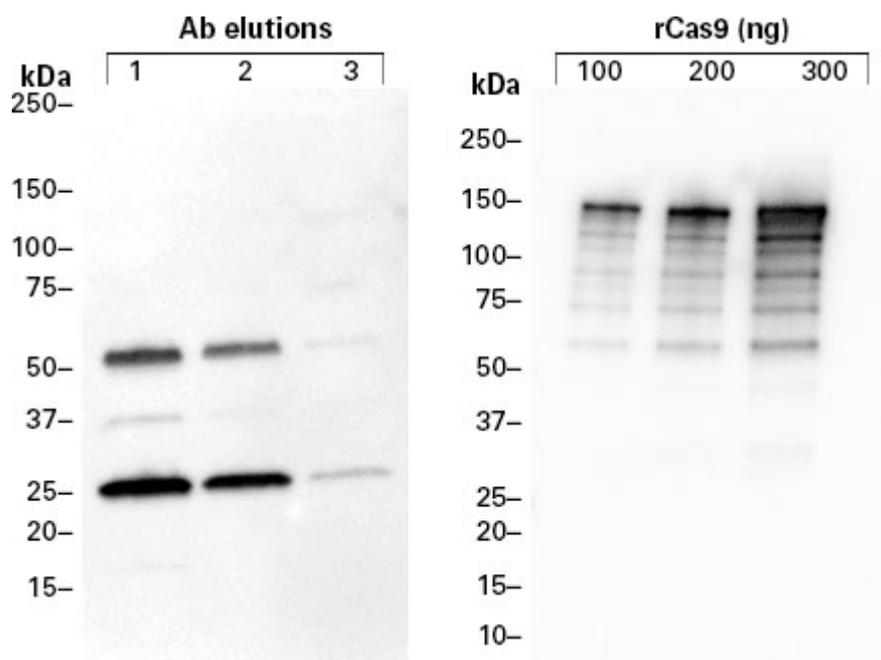


図 3. カラムから溶出された抗体のウェスタンブロット (左) と溶出されたビオチン化抗体を用いたりコンビナント Cas9 (rCas9) のウェスタンブロットによる検出 (右)

ビオチン化された抗体の 90%以上が 1 回目と 2 回目の溶出ステップで溶出されました (左側写真)。右側のウェスタンブロットでは、各レーンに 100~300 ng の Cas9 をロードし、Cas9 を検出するために、ビオチン化抗 Cas9 抗体を用いました。この結果、Capturem Protein G Miniprep Columns を使用して標識・溶出した後でも、結合しているエピトープが活性を維持していることが示されました。

標識のプロトコール

詳細なプロトコールは、下記ウェブサイトの左側にあるフォームに必要事項をご記入いただくと、ご覧いただけます。モバイルをご利用の場合は、メニューボタン内にフォームがあります。

<https://www.takarabio.com/learning-centers/protein-research/capturem-rapid-purification-technology/rapid-antibody-labeling-with-capturem-technology>

すべての標識反応は Capturem Protein G Miniprep Columns (製品コード 635725) を用いて行いました。EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Cat. No. 21335) と fluorescein-NHS (Cat. No. 46410) は Thermo Fisher

TECH NOTE

Scientific 社のものを使用し、ビオチン-NHS は自製しました。Cas9 検出用抗体は [Guide-it Cas9 Monoclonal Antibody \(Clone TG8C1\)](#) (製品コード 632628) を使用しました。

関連製品

製品コード	製品名	容量
635725	Capturem™ Protein G Miniprep Columns	10回

Capturem Protein G Miniprep は、カラム 1 本あたり 50~100 µg の精製抗体を得ることができます。抗体の収量はサンプル、生物種、抗体のアイソタイプに依存します。本カラムは動物の血清、腹水、細胞培地などから抗体を精製することに適しています。

(注 本カラムの使用は一回限りで、再利用はできません)

本紙で紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。タカラバイオの承認を得ずに製品の再販または譲渡、およびこれらのための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。本紙に記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。