

483

表面プラズモン共鳴を用いたエイズウイルス外膜タンパクgp41抗体の検出 (広島県立大・生物資源) ○宇田泰三、窪田就彦、一二三恵美

【目的】エイズ感染の有無は血清中に含まれる抗エイズ抗体の存在を凝集反応や酵素免疫測定法により定性あるいは定量することにより判定されている。現実に行われている酵素免疫測定法は検出時間が長い(半日～1日)ため多数検体の測定には不向きである。これを解決するには自動分析が可能なエイズセンサーの構築が必要である。そこで、今回は、まず、エイズウイルス外膜タンパクgp41に対する抗体の検出を取り上げ、免疫反応が実時間で追跡可能であり、短時間で測定が出来る表面プラズモン共鳴を用いたエイズセンサの検討を行ったので報告する。

【方法および結果】フロータイプに改良した表面プラズモン共鳴装置のセンサーチップの金薄膜上(厚み: 50nm)にgp41の抗原決定領域および保存領域である19merペプチド RGPDRPEGIEEEGGGERDRDを化学固定し、OVAあるいはHSAでブロッキングの後、抗体の導入を行った。プラズモンの共振曲線は実験の途中で適当に取り直した。20ug/mlの抗gp41モノクローナル抗体の導入によりreflectance信号は2-3分で飽和に達し、約0.02RUの変化が観測された。この後、Glycine-HCl (pH=1) bufferを導入すると抗原抗体複合体の解離が可逆的に起こり、信号は元に戻った。この実験を各濃度の上記抗体とbufferとで繰り返すと再現性良い応答が見られ、この時の検量線は検出範囲1-20ug/mlでほぼ直線となった。また、信号の立ち上がりから容易に免疫反応のkineticsが得られ、親和性定数は0.27/ μ Mとなり、ELISAによる結果とほぼ同じ値であった。

Sensing of the antibody against HIV envelope protein gp41 using a surface plasmon resonance apparatus.

○Taizo Uda, Naruhiko Kubota, Emi Hifumi (Dept. Bioresources, Hiroshima Pref. Univ.)

【Key Words】SPR, HIV, sensor, antibody, gp41

484

抗ヘミンモノクローナル抗体の抗原認識部位の解析

(広島県立大・生物資源) ○森原史子、石丸正則、一二三恵美、宇田泰三

【目的】ヘミンは酸化反応を行なう機能性タンパク質の補欠分子族として重要な役割を果たしている。我々はすでに、天然型のポルフィリンであるヘミンに対するモノクローナル抗体を作製した¹⁾。この抗体の可変領域の抗原認識を分子レベルで解析するために、遺伝子解析や、特に抗原認識に関与している超可変領域(CDR)に注目し、解析を行ったので報告する。

【方法および結果】抗ヘミンモノクローナル抗体産生細胞1D3からmRNAを抽出し、RT-PCR法により抗体の可変領域を増幅させた。アガロースゲル電気泳動で約350bpの増幅物を確認後、精製し、M13あるいはpGEM-Tベクターに組み込み、ジデオキシ法により塩基配列を決定した。KabatのデータベースからサブグループはH鎖がII(A)、L鎖がIIIであると分った。次に、H鎖について各CDRにあたるペプチドを合成し、蛍光消光法により抗原との反応性を測定すると、CDR-2の親和性定数は約 10^5 /Mとなった。完全抗体も同様に測定すると約 10^6 /Mであった。このことから、CDR-2単独でも抗体の1/10の強さで抗原と反応するという興味ある事実が分った。またH鎖についてAbM(Oxford molecular社)を使用してコンフォメーション解析を行ったところ、特にCDR-1と-2はCDR-3に比べて近接していた。これらのことから、主にCDR-1と-2が共同で抗原の分子認識に関与しているのではないかと推測された。

1) T. Uda et al., Chem. Lett., 1923-1926(1993)

Analysis of antigen recognition site for anti-hemin monoclonal antibodies.

○Fumiko Morihara, Masanori Ishimaru, Emi Hifumi, Taizo Uda, (Dept. of Bioresources., Hiroshima Pref. Univ.)

【Key Words】Hemin, Monoclonal antibody, RT-PCR, CDR