

マイクロチップ型高速ウエスタンブロットシステム の開発

高山喜好** 関根正裕*

Development of High Speed Western-Blot System Micro-tip type

TAKAYAMA Kiyoshi**, SEKINE Masahiro*

抄録

水晶発振子マイクロバランス測定法 (QCM) を応用した微量タンパク質検出技術「ウエスタンブロット法」のマイクロチップ化の可能性について検討した。測定にはフロー型QCMセルを使用し、予め、水晶振動子のAu膜に抗DANCE抗体を吸着させブロッキング処理を行った後、セルに13、65、325 μ g/mlの抗マウスIgG抗体溶液を導入し、共振周波数変化 ΔF を調べた結果、タンパク濃度に比例した ΔF を得た。QCMの応用によりウエスタンブロット法と同等の検出感度を有し、煩雑な手作業のない微量タンパクの検出が可能なが示された。

キーワード：高感度タンパク質分析、ウエスタンブロット、QCM、抗DANCE抗体、IgG抗体

1 はじめに

バイオテクノロジー分野においては、ゲノム、タンパク質、細胞の機能やその量的変化を測定する基本原理はほぼ確立された。21世紀に入り、DNAシーケンサー、Real-Time PCR、DNAマイクロアレイなどゲノム関連の測定機器分野で比較的安価かつ大量サンプルの高速自動測定が可能なが分析機器が市場に登場した。これらの機器は、研究の効率化を促すとともに、これまでになかったバイオ技術を用いた医療、産業分野での応用を可能にした。他方、タンパク質関連の汎用測定機器については、大量サンプルの高速自動測定を可能にする機器はほとんどみられない。特にウエスタンブロット法はバイオ、医療、食品検査において世界中で利用されるタンパク質検出手法であり、学術論文のデータベースで“ウエスタンブロット”

を検索すると、119,000件以上の論文で採用される重要かつ一般化された検出手法である。

図1にウエスタンブロットの試験フローを示した。タンパク質のSDS-PAGE電気泳動による分離、PAGEから専用膜への転写、特定タンパク質を同定する抗体反応など、様々な工程と機器を必要とする。また、様々なタンパク質情報が得られる一方、精度の高いデータを出すためには熟

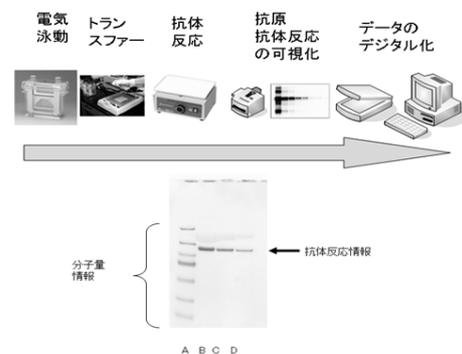


図1 ウエスタンブロットの試験フロー(上段)とデータ例(下段)
オボアルブミン (アレルギー検査抗原) を検出した結果
A：分子量マーカー、B,C,D：オボアルブミン抗原

** 株式会社エヌビー健康研究所

* 生産技術部

練を必要とする。さらに、本手法は発明以来25年以上経過しているが、定量データの試験間、施設間で互換性のある標準化方法は確立されていない。このような背景から、ウェスタンブロットを自動化する安価な機器の登場が強く望まれている。ウェスタンブロットの高速自動化に際しては、近年開発されているラボチップテクノロジーを応用する。この技術は実験室で行う生体試料の前処理、分離、検出試薬との反応、検出の各工程を小さなチップ上に集積し、測定の高速自動化を可能する^{1~4)}。ラボチップテクノロジーを応用したタンパク質関連の自動測定機器も一部開発販売されているが、ウェスタンブロットのマイクロチップ化を成功している例は見当たらない。そこで、近年、水晶振動子を利用した超微量分析技術として注目されているQCM測定を応用し、ウェスタンブロット法のマイクロチップ化の可能性について検討した。

2 実験方法

2.1 QCM 装置

水晶振動子バイオセンシング装置 QCM934 (セイコー・イージーアンドジー社製) を用いた。QCM では、図2に示した水晶振動子表面に蒸着した Au 膜に物質が吸着したときの重量変化を共振周波数変化から求める。水晶振動子に電極に直径5mm (電極面積 0.196cm²) の Au 膜を付した QCM センサーを使用した。電極への試料吸着方法としては容量 90 μl のフロー型 QCM セル QCM934-510 を使用した。

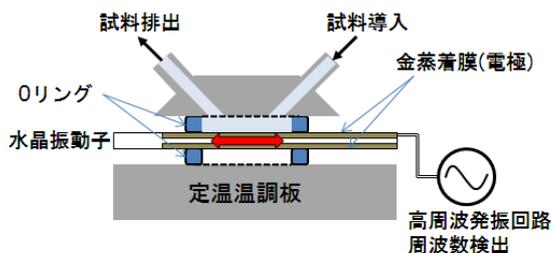


図2 QCMの測定

2.1 抗原抗体反応測定

QCMセル上における抗原抗体反応の測定原理

を図3に示した。今回の研究では、吸着する抗体として、マウス抗ヒトDANCE抗体産生細胞を大量培養し、Protein A 精製した抗DANCE抗体を使用した。ブロッキング剤として、ウシ血清アルブミン (以下、BSA) を使用した。抗原として、本来ヒトDANCEタンパク質を用いることが適切ではあるが、大量に使用するため、仮想的な抗原-抗体反応のモデルとして、市販品の抗マウスIgG抗体 (以下、抗IgG抗体) を使用した。抗DANCE抗体と抗IgG抗体の反応は通常の抗原抗体反応と同じ結合様式であるため、今回の検討はそのまま全自動化機器開発の基礎データとできる。

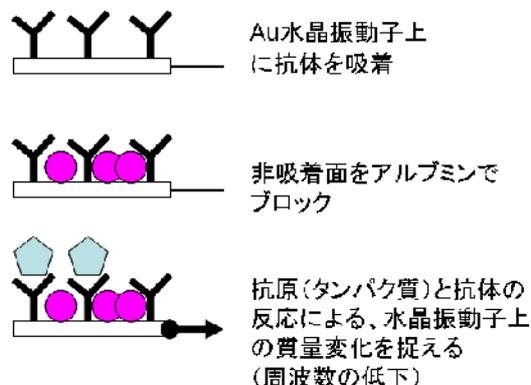


図3 水晶振動子上における抗原-抗体反応

吸着、洗浄用溶液には、Phosphate buffer saline (以下、PBS) を用い、ペリスターポンプにより流速 0.3ml/分で試料、洗浄液をセル内に送液導入した。吸着用抗体 (抗 DANCE 抗体) は 0.3mg/ml、BSA 溶液は 3mg/ml、反応サンプル (抗 IgG 抗体) を濃度 13 μg/ml、65 μg/ml、325 μg/ml に調整し、各 0.5ml を QCM セルに導入した。

3. 結果と考察

QCM 上の抗体抗原反応と共振周波数の変化を図4に示した。はじめに、Au 電極分に吸着用抗体 (抗 DANCE 抗体) を添加すると、速やかに共振周波数の微小減少が観察され、 ΔF は 300Hz に到達した (図4左)。その後、緩衝液による洗浄により変動は認められなかった。その後、3mg/ml の BSA 溶液を、非特異的吸着防止のため添加するとさらに共振周波数の微小減少が観察され、 ΔF

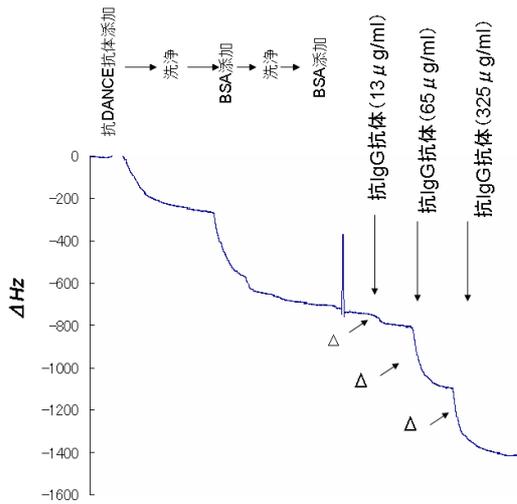


図4 QCM上の抗原抗体反応と共振周波数変化
QCM上にマウス抗DANCE抗体(0.3mg/mL, 500 μL)を吸着後、BSA(3mg/mL)でブロッキングし、抗マウスIgG抗体を13、65、325 μg/mLの順に添加

は約 400Hz であった。さらに緩衝液による洗浄したのち、再度 3mg/ml の BSA 溶液を同様に添加しても有意な共振周波数の微小減少は観察されなかった。すなわち Au 電極表面でのタンパク質の吸着が飽和状態であること、また抗 DANCE 抗体への BSA の吸着が無いことを示した。ここではデータを示さないが、ELISA 法により抗 DANCE 抗体が BSA と反応しないことを予め確認した。その後、反応サンプル液(抗 IgG 抗体)を 13 μg/ml、65 μg/ml、325 μg/ml の順に吸着させたところ、共振周波数の微小減少が観察され、タンパク濃度に応じて ΔF も増加した。325 μg/ml 濃度の反応サンプルでは 65 μg/ml に比べて、タンパク質あたりの ΔF が小さいのは、電極上の抗体が飽和状態に達したためと推定される。以上の結果、QCM 上に吸着した抗体がサンプル液中の抗原(反応サンプル)をトラップし、抗原-抗体反応を速やかに完了させることが示された。また、抗原-抗体反応による微小質量変化を共振周波数変化量による数値データに反映できることが確認された。本法により、従来法ウエスタンブロット反応のステップを飛躍的に短縮化することができることが分かった。特に、従来法ウエスタンブロットの最終 2 ステップを完全に省略することができた。また、従来法では可視化したバンドの濃淡を用いて半定量的にタンパク質量を決定していたが、今回の方法では、 $\Delta F = k \Delta m$ の関係式を用いて、より正確

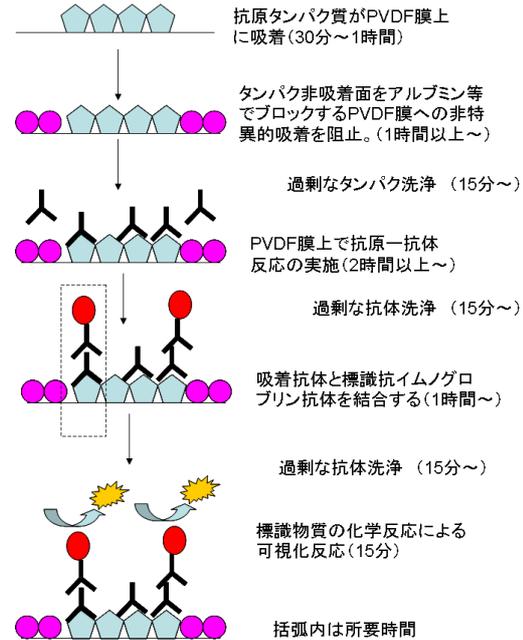


図5 ウエスタンブロットにおける抗原抗体反応定量ステップ

な定量が可能となった。

上述の検討で、QCM 技術を自動化ウエスタンブロット法に適用できることを見出すことができた。これまで抗体-抗原反応の検出には比較的長い反応時間を要する(例えば ELISA 法、従来型ウエスタンブロット法では少なくとも数時間)と考えられていたが、QCM ではシンプルなステップによりわずか数分で検出できた。QCM と従来型ウエスタンブロットの違いを下図にまとめた。標識 2 次抗体や標識物質による化学反応が不要であることが QCM の大きな特徴といえる。

表1 QCMとウエスタンブロットの違い

	QCM	ウエスタンブロット
固相化する物質	検出用抗体	サンプルタンパク質
固相化した物質に反応させる物質	サンプルタンパク質	検出用タンパク質
標識2次抗体	不要	一般に必要
抗原-抗体反応の検出	微量質量変化	標識物質の化学反応による可視化

さらに、従来のウエスタンブロット法ではポリアクリルアミドゲルより変性したタンパク質を電気的に溶出しPVDF膜に吸着していたが、その際にサンプルタンパク質の特徴に合わせて複雑な溶出条件等を検討する必要があった。また特定のタンパク質は十分にPVDF膜に吸着されない等の問題点

もあり、ウエスタンブロット法の施設間や実験間における定量性の問題点のひとつと考えられた。一方、QCMでは固相化するものが検出用抗体であり、検出する物質に対して使われる抗体は様々であるがタンパク質としての基本的性状は極めて類似と考えられる。また吸着方法もAu電極分に添加するだけであり、吸着量を決める要因は吸着時温度、時間、吸着液濃度、吸着用緩衝液組成と比較的容易に制御できる。また、従来法では、抗原/抗体複合体を可視化するため、標識物質の吸着した2次抗体を用いて抗体、抗原の複合体量を間接的に定量している。2次抗体反応やその後の発色反応の諸条件は抗原/抗体複合体を検出するまでに複雑な影響を与え、再現性に影響するものと推察される。

QCMでは、微小質量変化 Δm と共振周波数の微小変化 ΔF の間に、Sauerbrery式が成立し、 $\Delta m/\Delta F = K$ (k は電極ごとの定数)の関係式から絶対量に近い値を算出でき、定量性や再現性の飛躍的向上が期待できる。さらに、特筆すべきことは、QCM電極上で抗体の抗原への反応チャンスを飛躍的に向上させることができることである。これまでのELISA法やフローサイト法、免疫染色法といった手法で有用な抗体がウエスタンブロット法では検出できないものがあった。原因として、SDS-PAGE電気泳動によりタンパク質が変性し、抗体に認識されなくなることやPVDF膜に吸着した側に配置した抗原のエピトープ(抗体が認識する部位)の反応が妨げられることなどが考えられる。QCMを利用すれば反応サンプル(抗原)を水溶液中に分散し天然型の高次構造を維持したまま抗体と反応するため、これらの問題は生じない。

以上の結果から、QCMを利用することにより、ウエスタンブロット法と同等の検出感度を有し、煩雑な手作業のない微量タンパク質検出システムの構築が可能となり、マイクロチップ化も視野に入れた装置開発への可能性が示された。

参考文献

- 1) Stone H A, Stroock, A D, and Ajdari, A. :Engineering flows in small devices, Microfluidics toward a lab-on-a-chip (2004), Annual Review of Fluid Mechanics, **36** (2004) 381
- 2) Figeys D, and Pinto D. :Lab-on-a-chip: A revolution in biological and medical sciences, Analytical Chemistry, **9,72** (2000) 330A
- 3) Mitchell P. : Microfluidics - Downsizing large-scale biology. To what extent has microfluidics technology fulfilled life science researchers' expectations of creating a viable "lab-on-a-chip"?, Nature Biotechnology, **8,19**, (2001) 717
- 4) Dittrich P S, and Manz A. : Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery, Nature Reviews Drug Discovery, **3, 5**, (2006)210