生体分子分析化学
イムノアッセイ

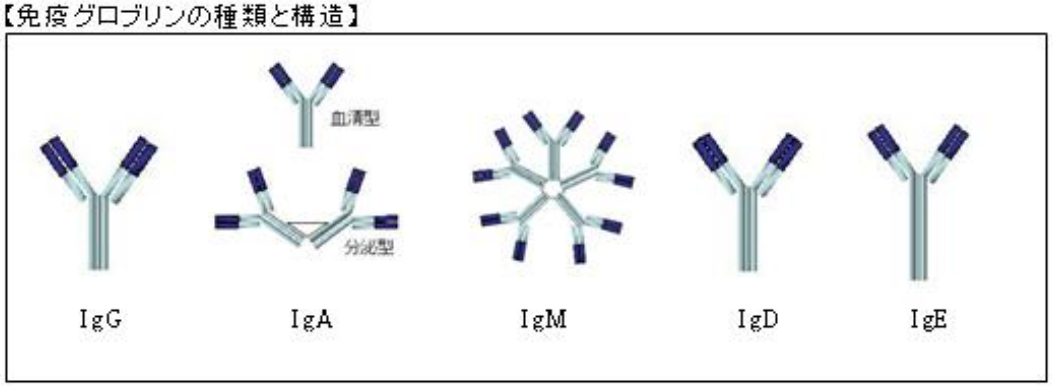
担当:梶原　将

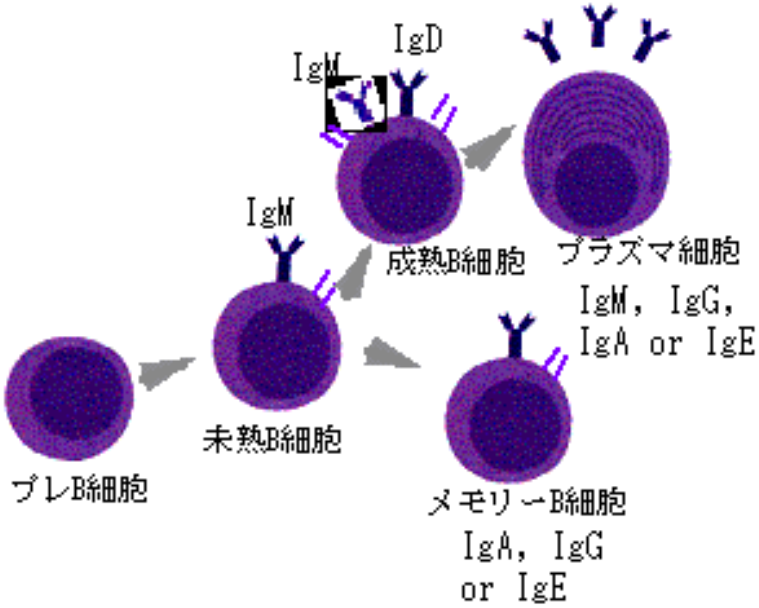
免疫：抗原と抗体

- 体液性免疫

  多能性造血細胞（造血幹細胞） → B細胞へ分化

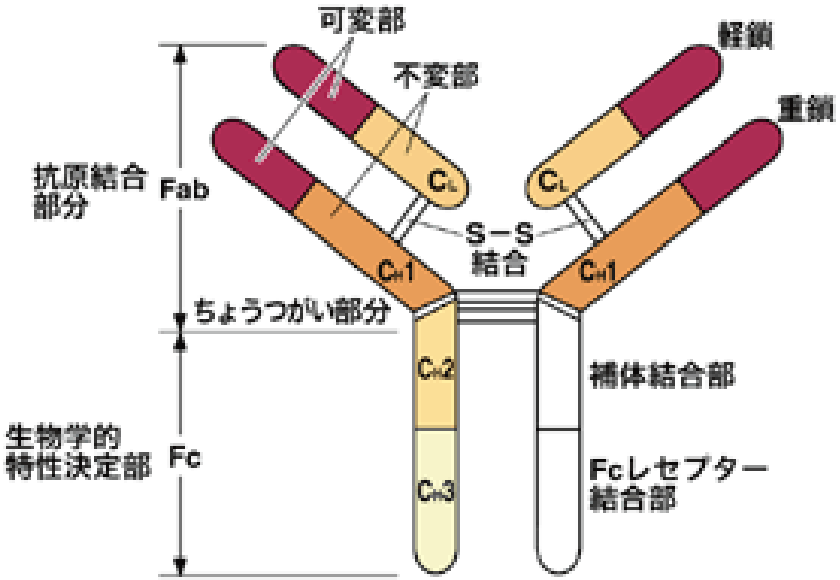
  免疫グロブリン(Immunoglobulin:Ig)を産生



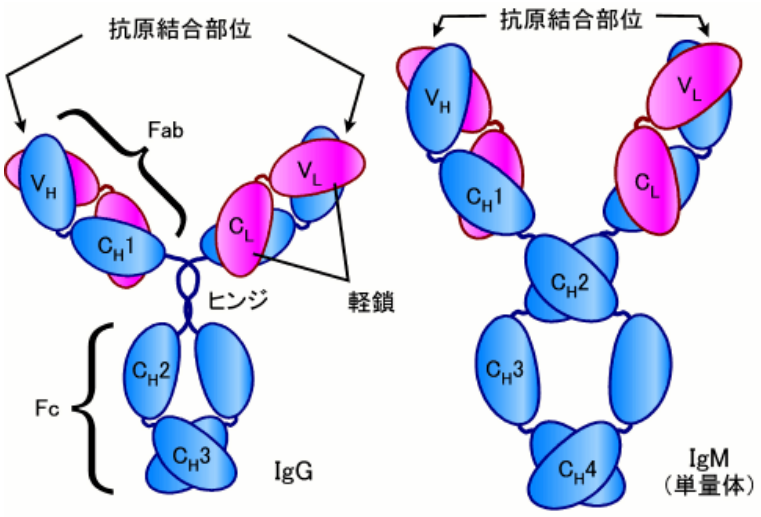


抗体の構造

- 2本　H鎖(Heavy chain)　ポリペプチド　と　2本のL鎖(Light chain) ポリペプチド
- 鎖間と鎖内にジスルフィド結合
- H鎖とL鎖ともに可変領域と定常領域を有する
- H鎖は柔軟性に関わるヒンジ部も有する
- 可変領域（Fab:抗体結合フラグメント）　→　抗体の認識
- 定常領域（Fc:結晶性フラグメント）　→　細胞表面受容体との相互作用



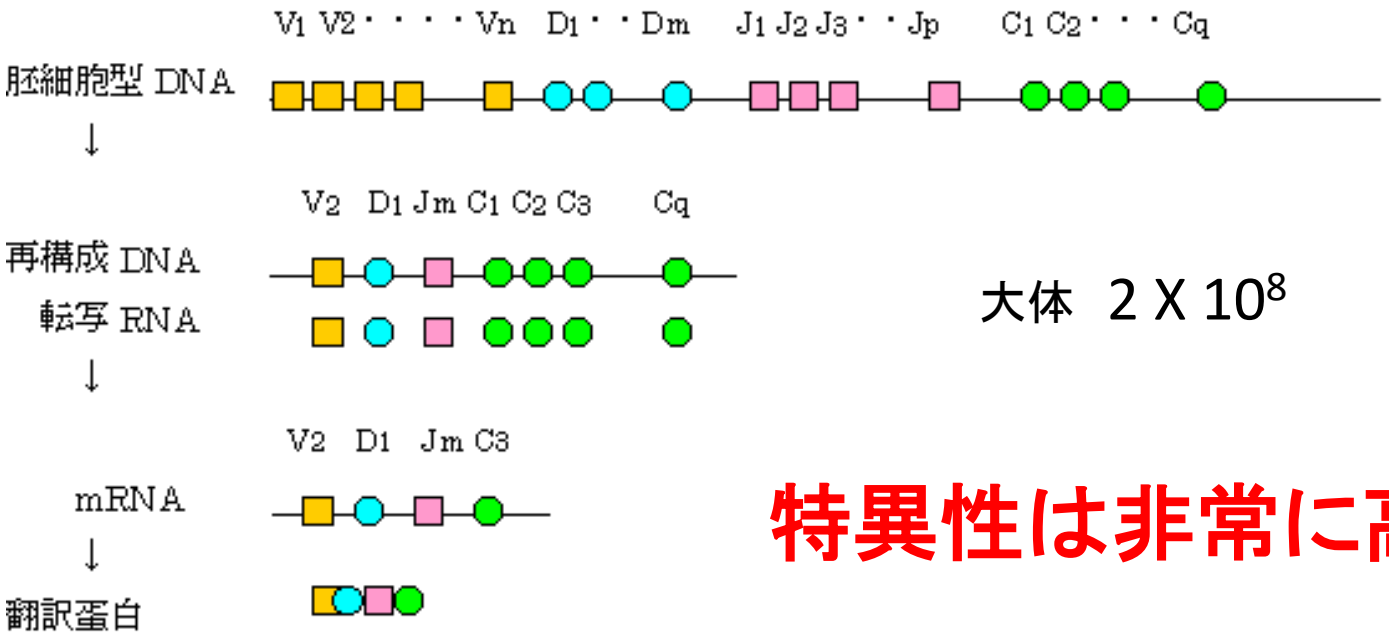
CDR (Comlementarity Determining Region)



免疫グロブリン遺伝子の再構成

H鎖のV_H領域はV_H, D, Jの3つのセグメントに分けられる。
生殖細胞　V_Hが50種、Dが20種、Jが6種　　6000通り

L鎖のV_L領域はV_L, Jの2つのセグメントに分けられる
　それぞれ大体200種、160種位が存在する。　　32000通り

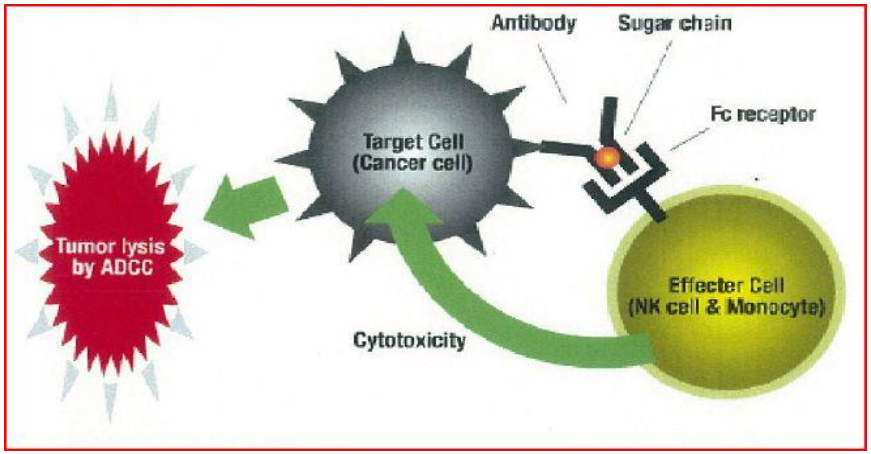


大体　2×10^8

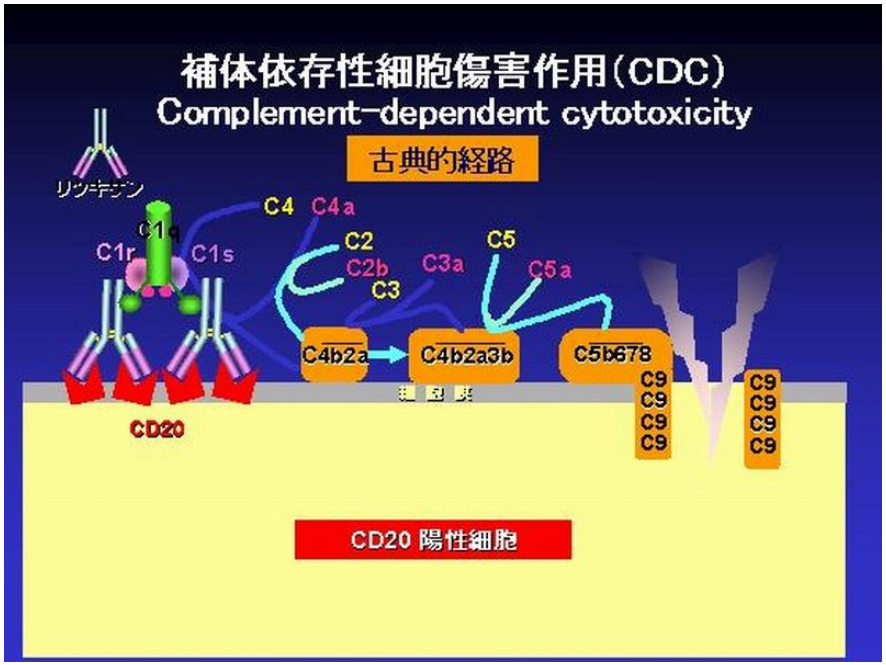
特異性は非常に高い

定常領域の働き

・ 抗体依存性細胞性細胞障害活性
ADCC（Antibody-dependent cellular cytotoxicity）活性



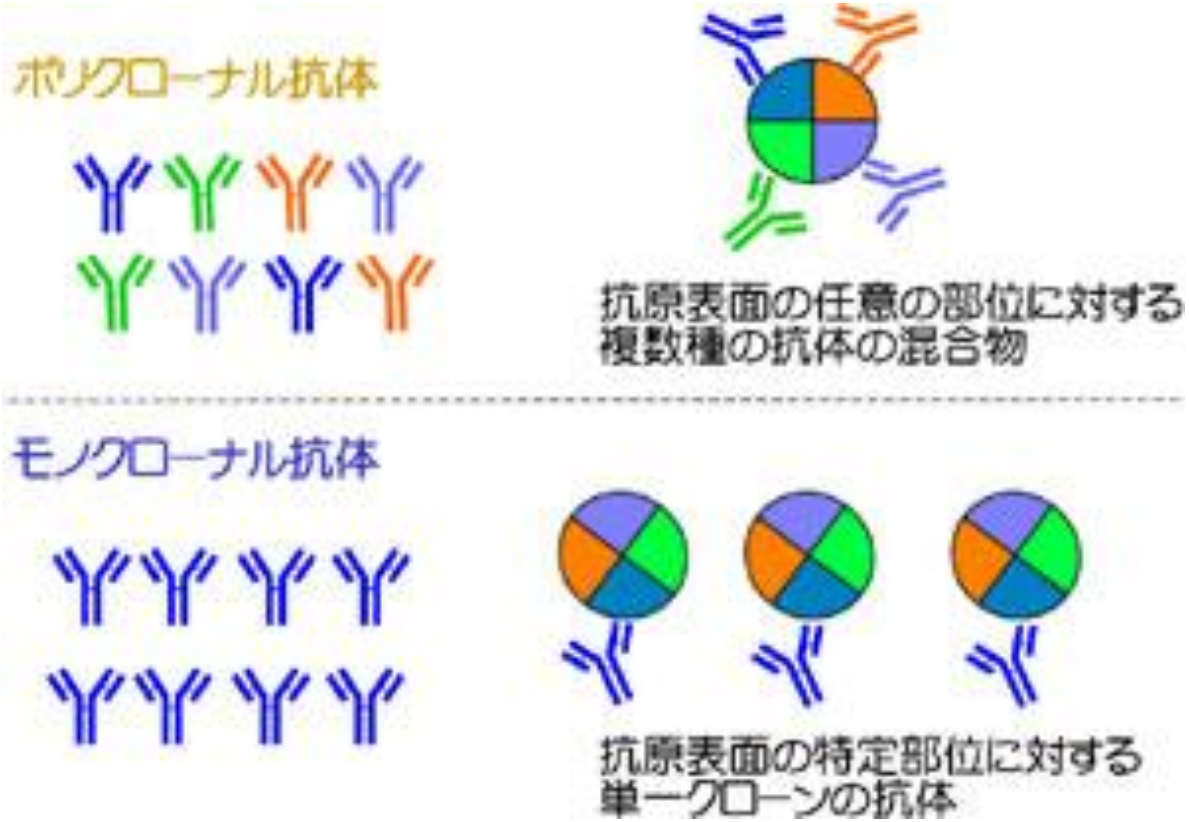
・ 補体依存性細胞障害活性
CDC（Complement-Dependent Cytotoxicity）活性



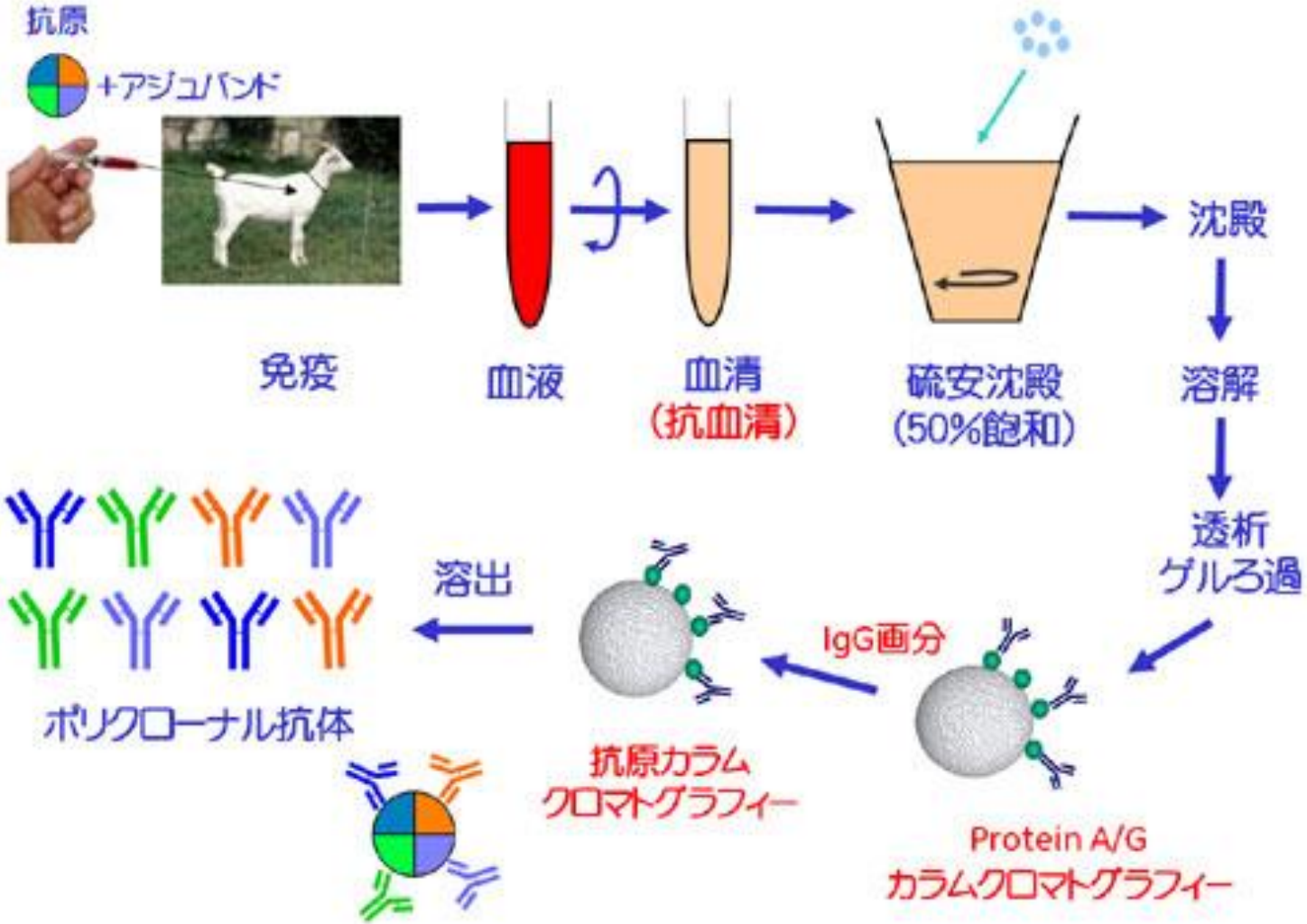
抗原

抗体の抗原が結合する部分　パラトープ
抗体が認識する抗原分子の領域　エピトープ

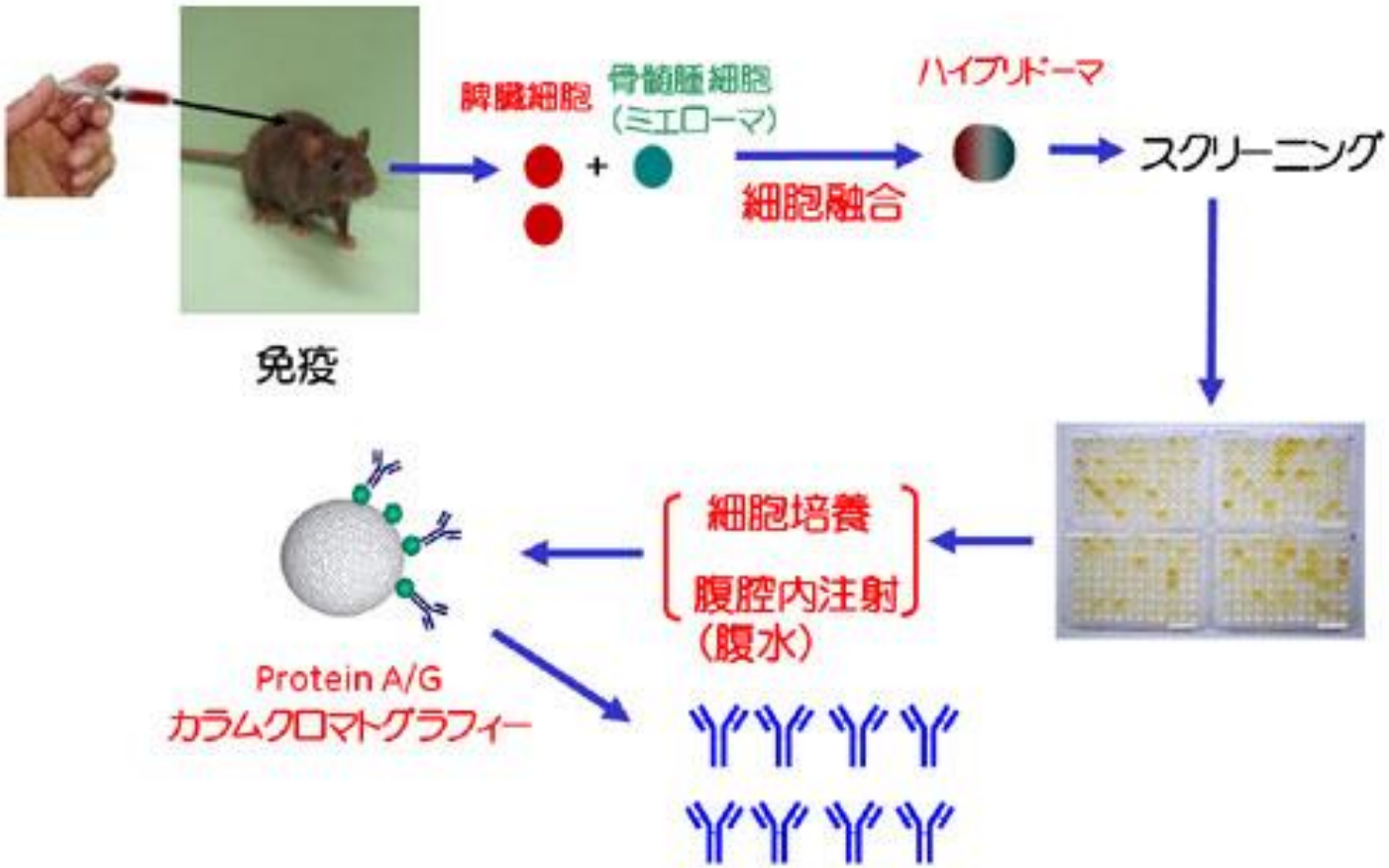
抗体作製



ポリクローナル抗体の作製方法



モノクローナル抗体の作製方法



アミノプテリン

↓

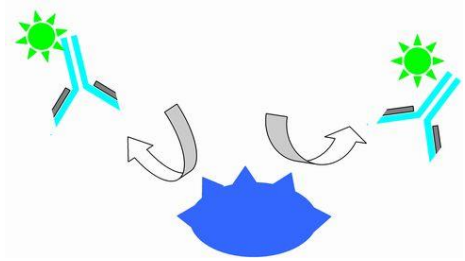
*de novo*系

サルベージ系

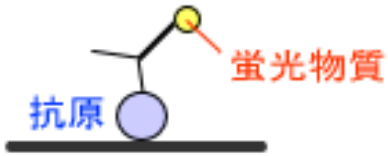
注意事項

- 交差反応
- 非特異的結合
- 実験工程で生じる非特異的結合
- 抗体の標識

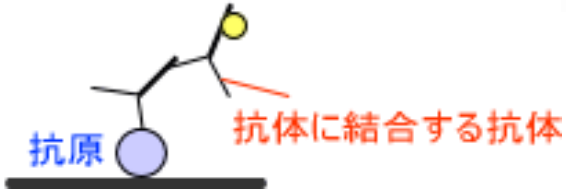
抗体の標識方法



直接蛍光抗体法



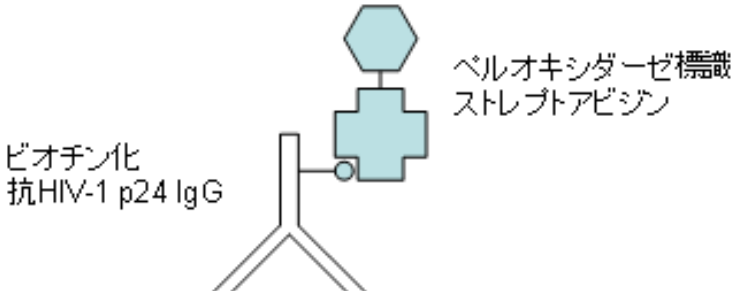
間接蛍光抗体法

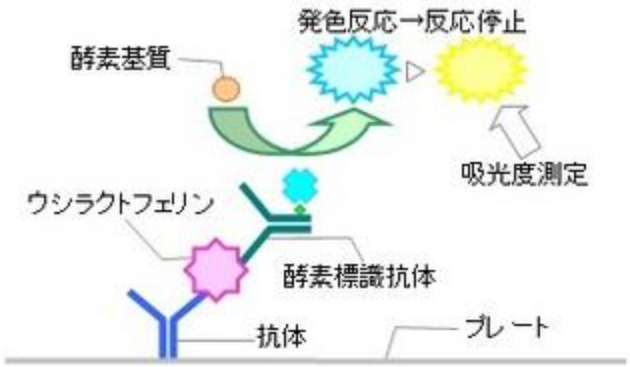


- 蛍光標識（フローサイトメトリー、共焦点レーザー顕微鏡など）

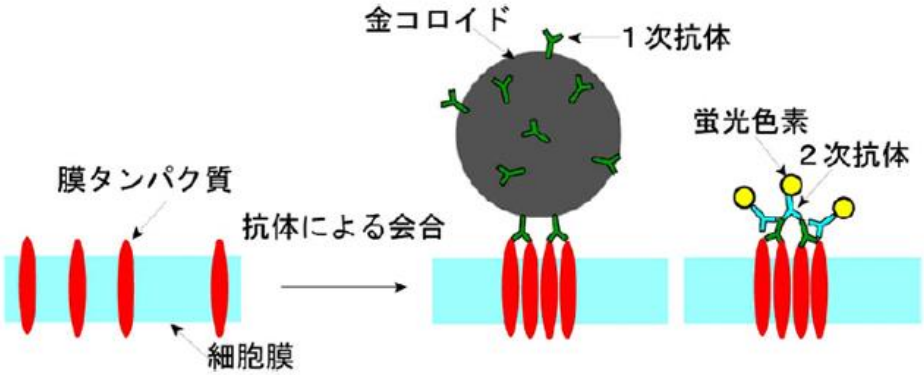
レーザー	蛍光検出器名	蛍光色素	
488nm 固体レーザー	Green	FITC	Alexa Fluor 488
	Yellow	PE	
	Red	PE-Cy5	PerCP
	Far Red	PerCP-Cy5.5	
	Infra Red	PE-Cy7	
633nm HeNe レーザー	Red	APC	Alexa Fluor 647
	Far Red	Alexa Fluor 700	
	Infra Red	APC-Cy7	
405nm 半導体レーザー	Blue	Pacific Blue	Alexa Fluor 405
	Cyan	AmCyan	

- 酵素標識（ELISA、ウエスタンブロットなど）





・金コロイド標識（電子顕微鏡）



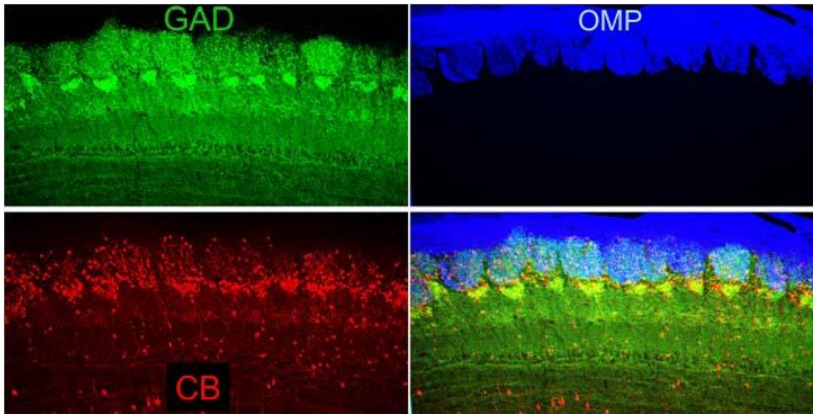
抗体を使った分析法

- 免疫染色
- タンパク質精製
- 免疫沈降、ELISA
- ウエスタンブロット
- フローサイトメトリー
- その他、新しい分析法

目的分子の量、局在性、構造変化、機能など

免疫組織染色法

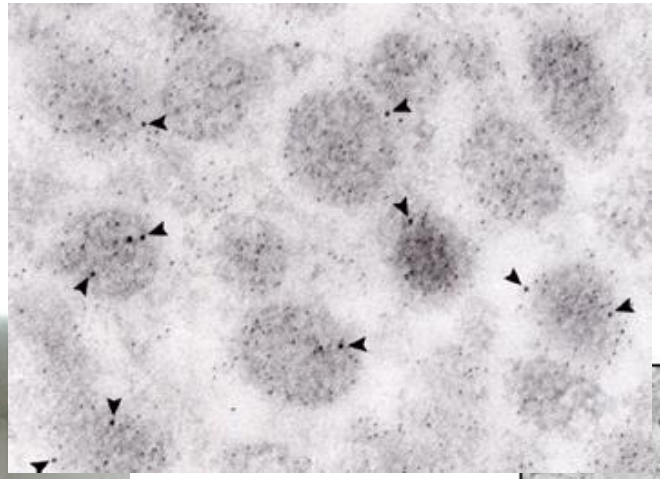
- 抗体の特異性を利用して、標識した抗体を特定のタンパク質に結合させて可視化する方法



共焦点走査型レーザー顕微鏡

電子顕微鏡での金コロイド標識抗体検出

透過型電子顕微鏡(TEM)



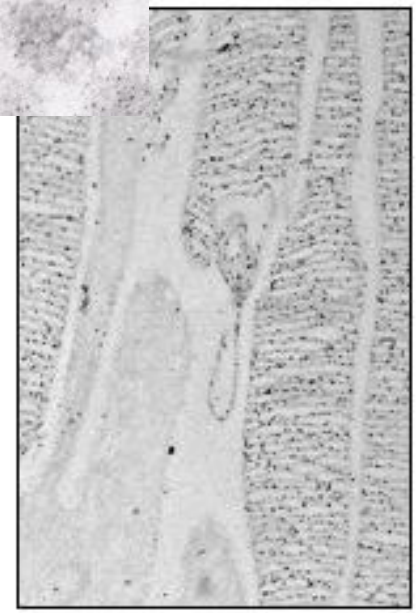
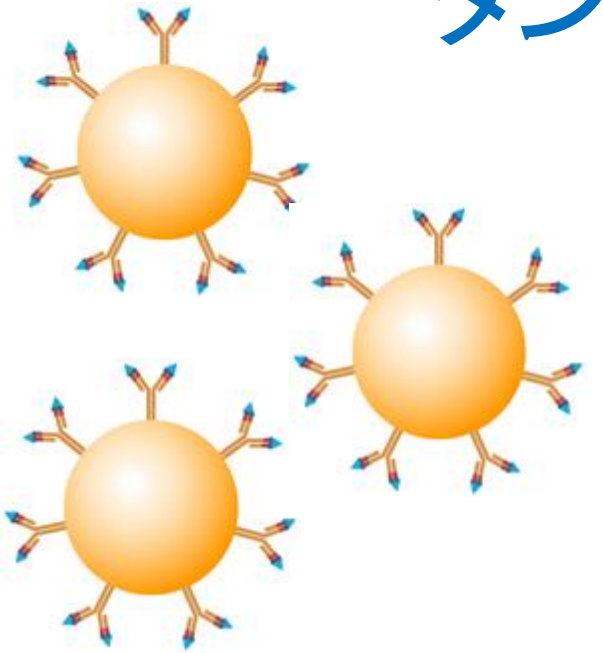


図2: マウス視細胞外節をオプシン抗体で標識し、金コロイド二次抗体で可視化した電子顕微鏡写真

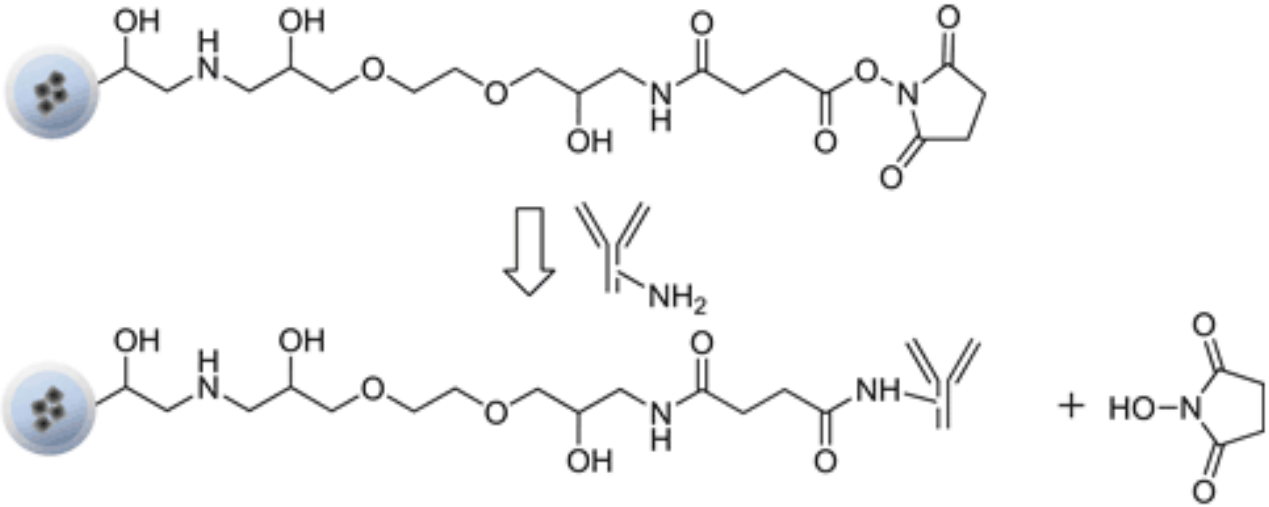
(注)
オプシンが円板膜(Disc membrane)に存在することがよくわかる。

タンパク質精製



抗体結合法

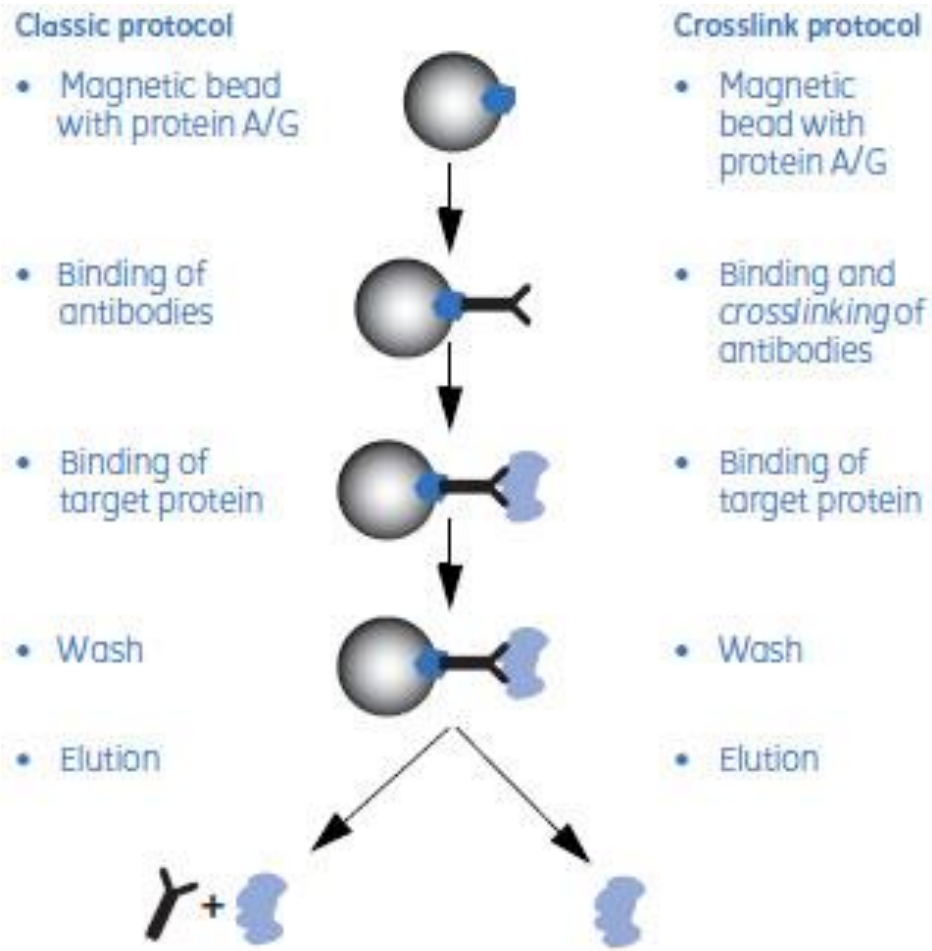
①活性化型アフィニティー担体
　長所：直接カップリング（下図）、安価
　欠点：抗原結合活性が変化
②リガンド結合型アフィニティー担体
　長所：プロテインA/Gにより結合、簡便
　欠点：非特異的結合、高価
③活性化抗体結合型アフィニティー担体
　長所：糖鎖やビオチンとの結合を利用、容易
　欠点：作製が多段階で複雑



免疫沈降

プロテインA
黄色ブドウ球菌
(*Staphylococcus aureus*)の
細胞壁成分の5%を占める1本鎖のポリペプチドで、数種のIgG抗体のFc部位を介して分子内の4つの結合サイトで特異的に結合する。

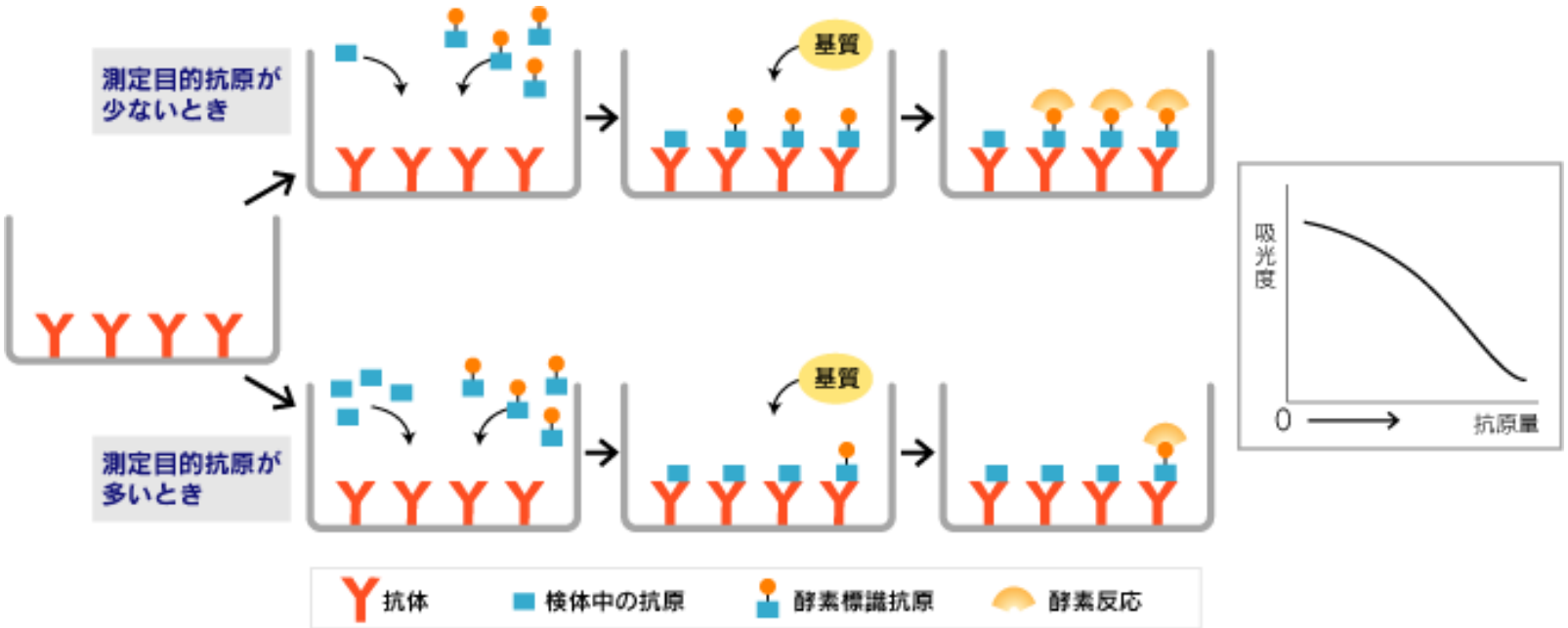
プロテインG
連鎖球菌（*Streptococcus* グループG）の細胞壁由来タンパク質で、殆どの哺乳動物IgGの主にFc部位に結合に結合する。



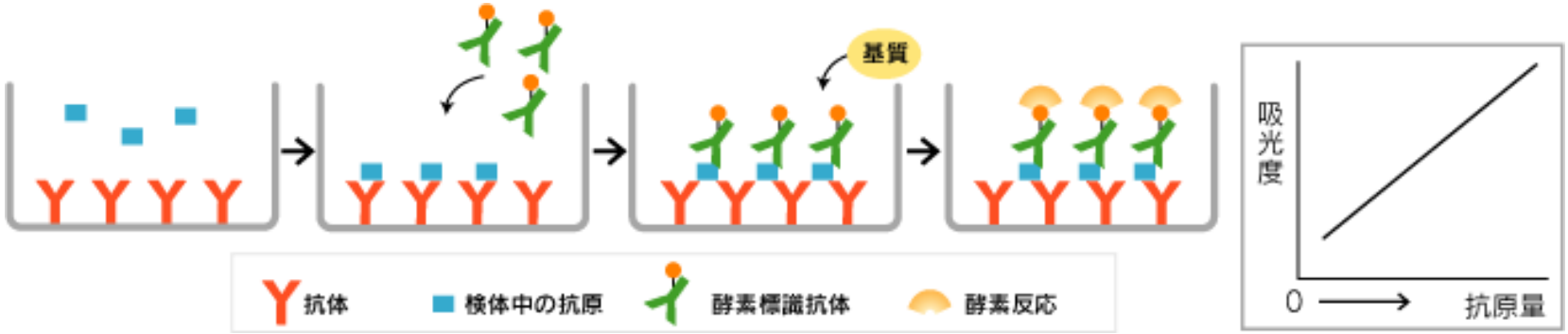
ELISA

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) は、試料中に含まれるある物質（タンパク質）の濃度を検出・定量する際に用いられる方法

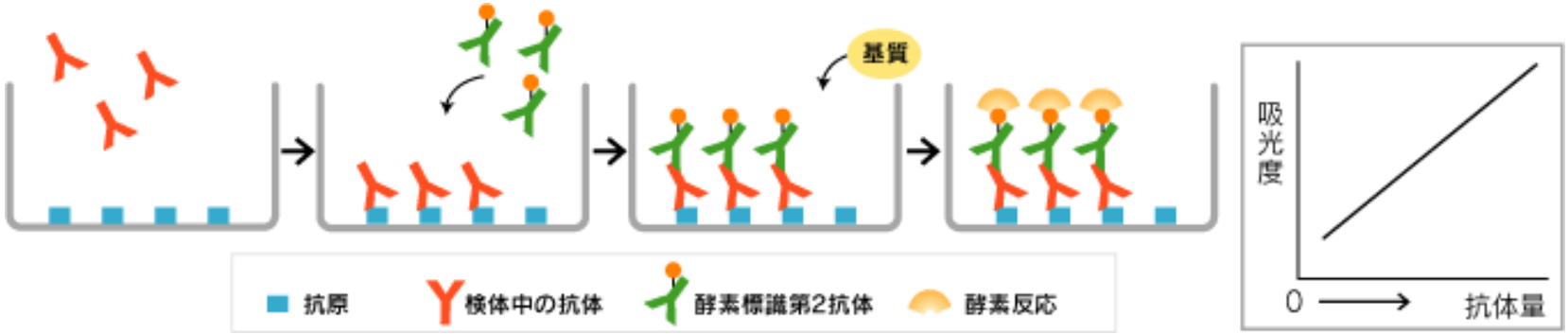
抗原測定　競合法



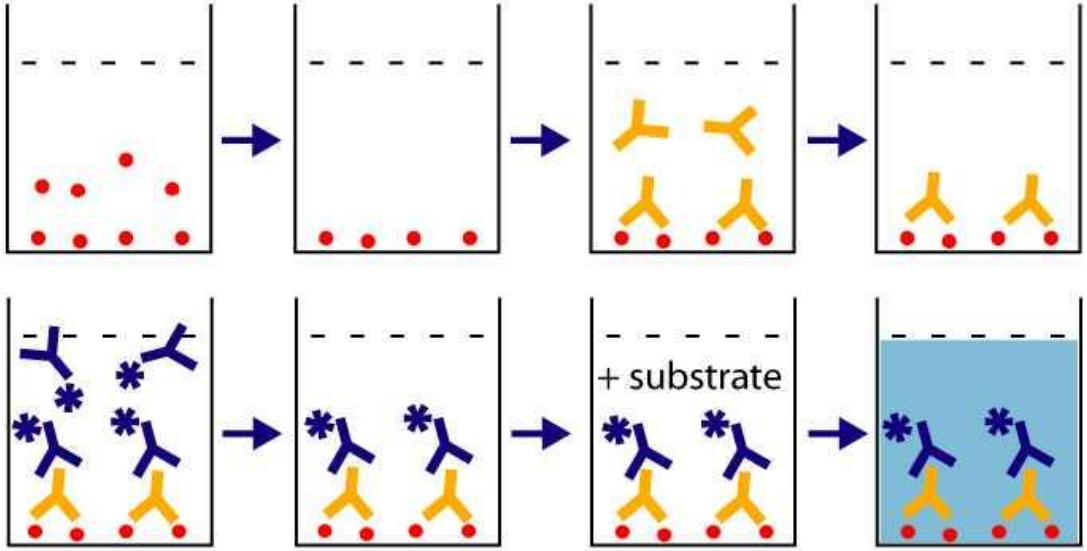
抗原測定　サンドイッチ法

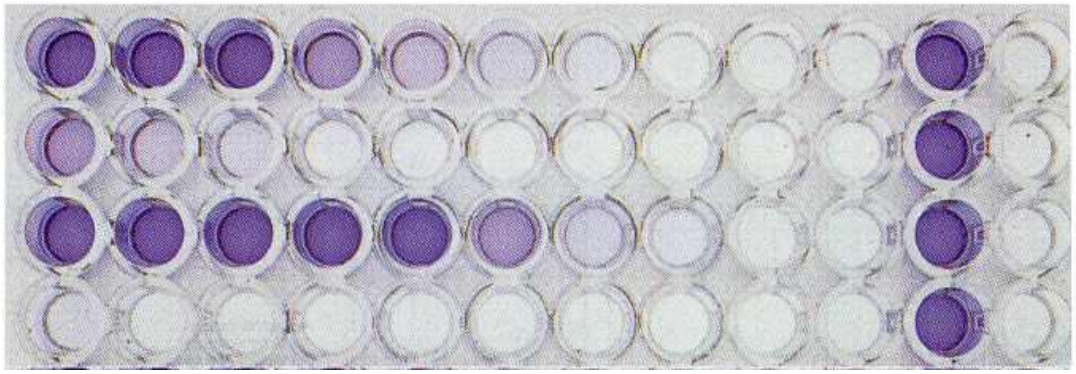


抗体測定



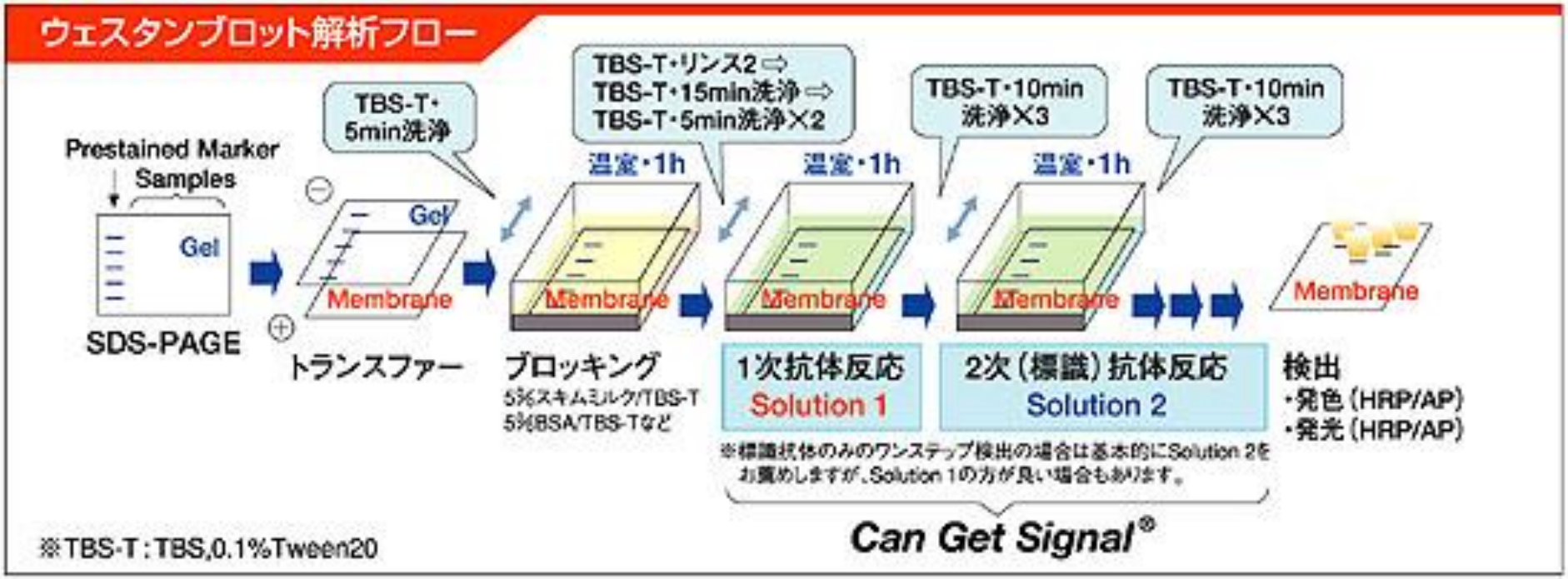
ELISA実験例



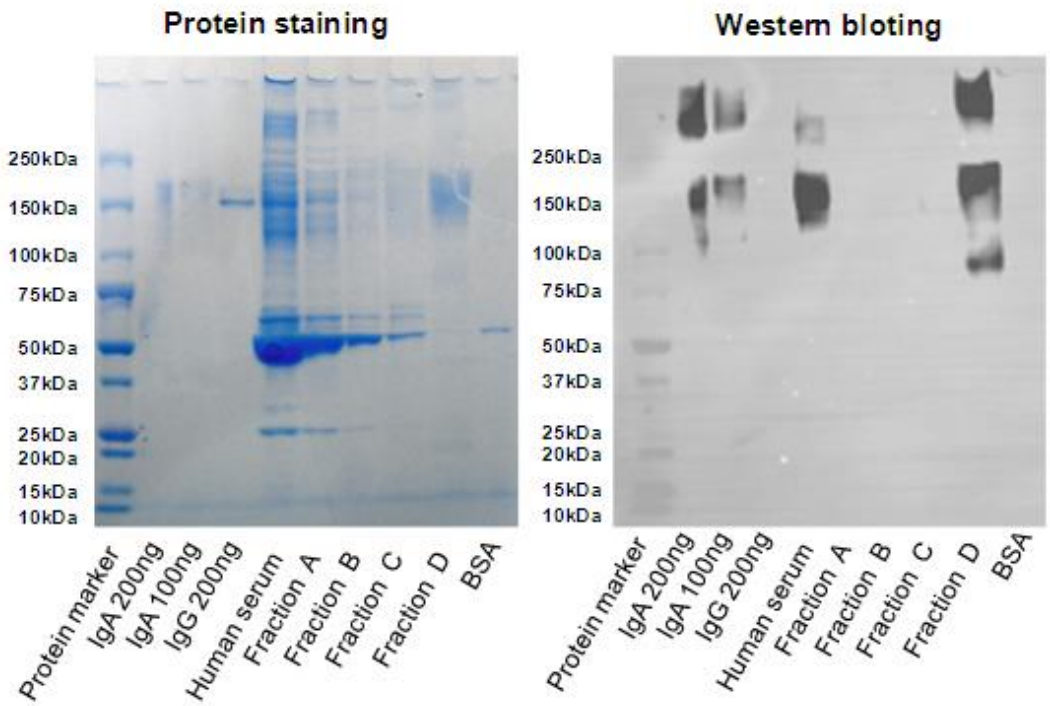


ウエスタンブロット分析

電気泳動の優れた分離能と抗原抗体反応の高い特異性を組み合せて、
タンパク質混合物 から特定のタンパク質を検出する手法

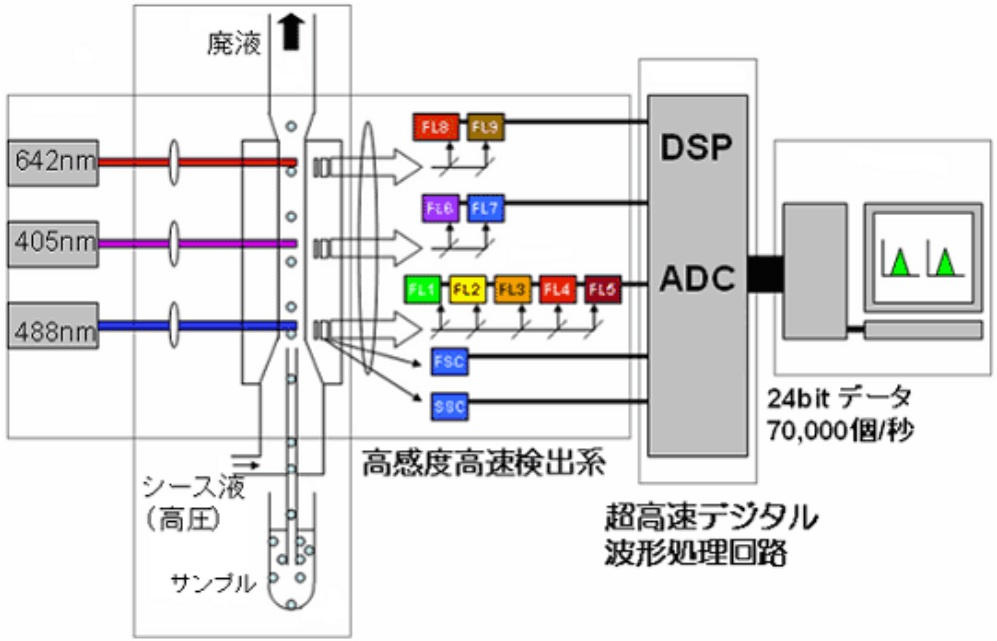


ウエスタンブロット分析例

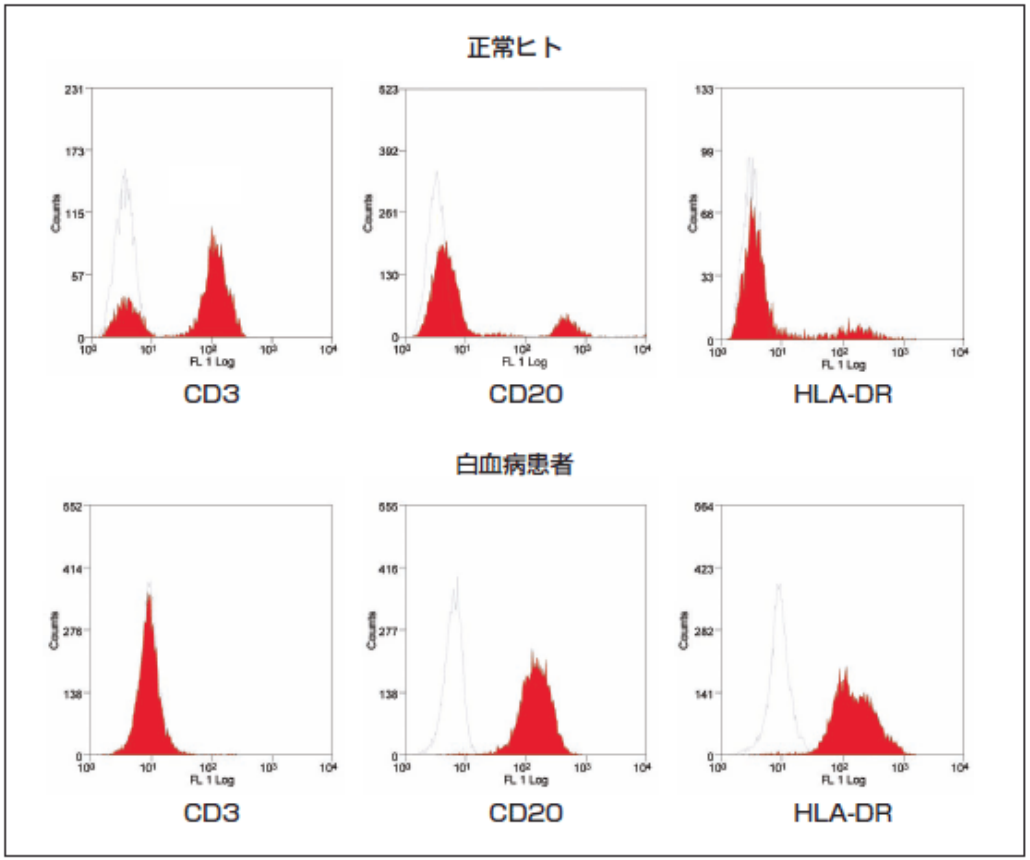


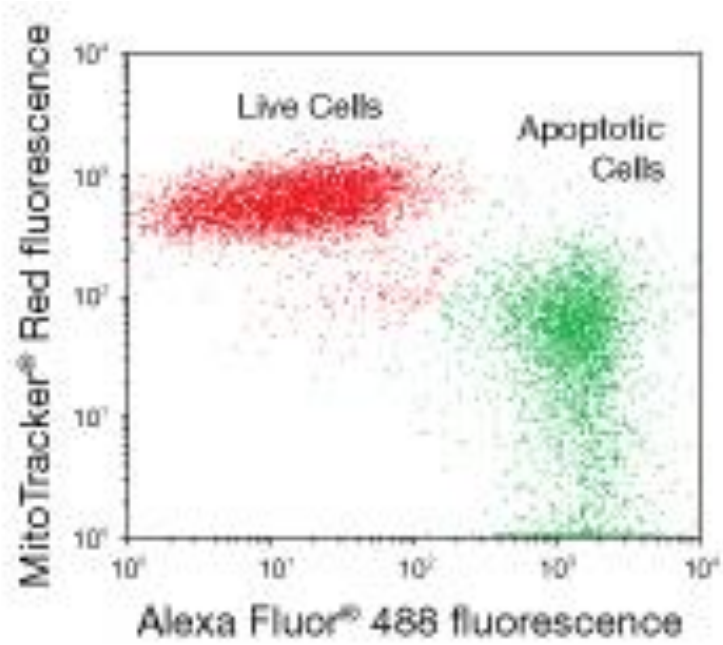
フローサイトメトリー

非常に細い流液中に細胞などの微粒子を高速度で流し、これにレーザー光を照射し、これら微粒子に当たって散乱する光や、蛍光物質を標識した微粒子が発生する蛍光を測定し、細胞数や細胞の種類、細胞に含まれる核酸(DNAやRNA)などの定量や、細胞表面や細胞内の抗原を蛍光抗体法を用いて検出するために用いられる。特定の細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体を用いてリンパ球の種類を同定する際に用いられる。また特定のパラメーターを持つ細胞を検出すると同時に分離回収することができる装置を、セルソーターと呼ぶ。

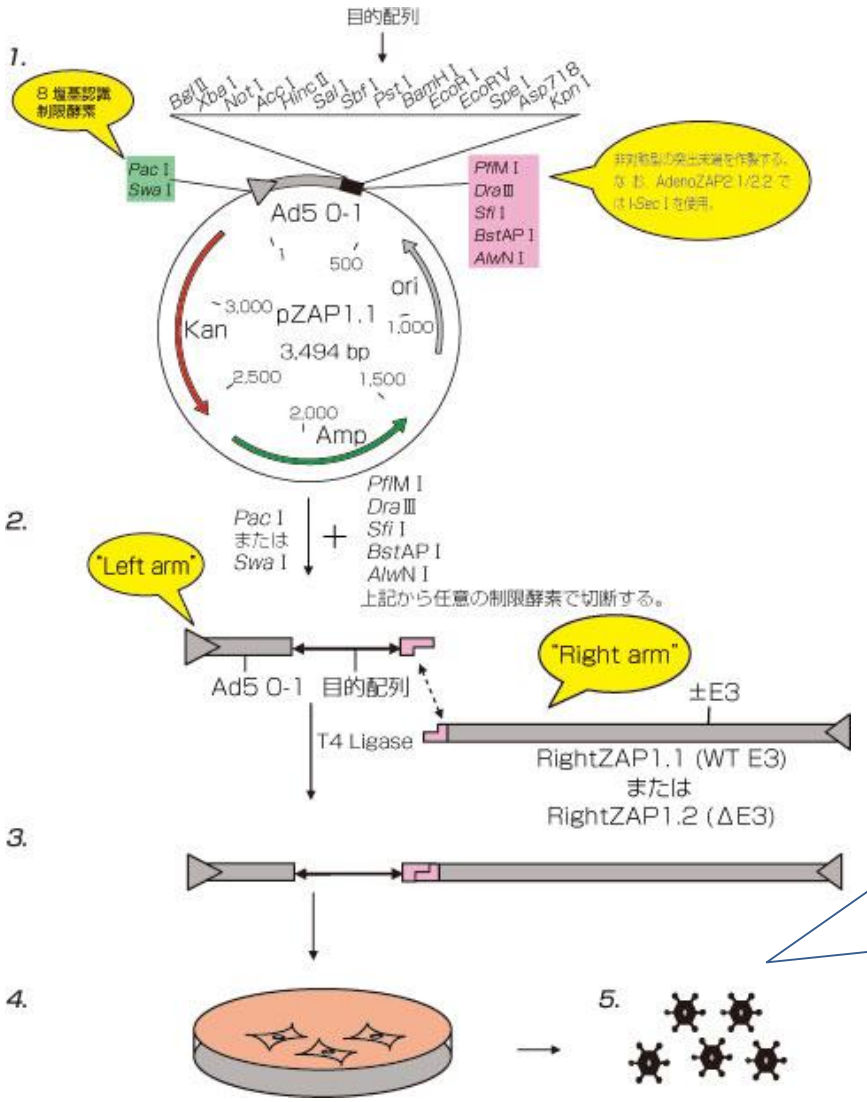


フローサイトメトリー分析例





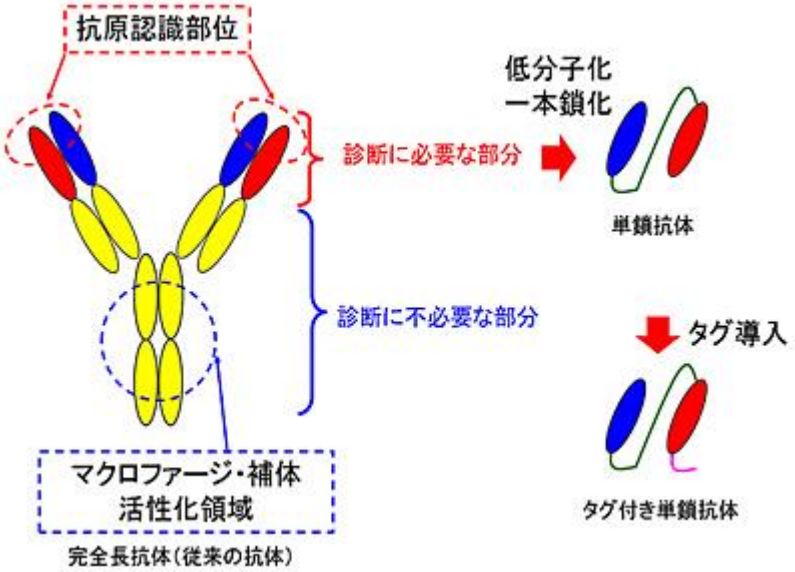
遺伝子クローニングへの応用

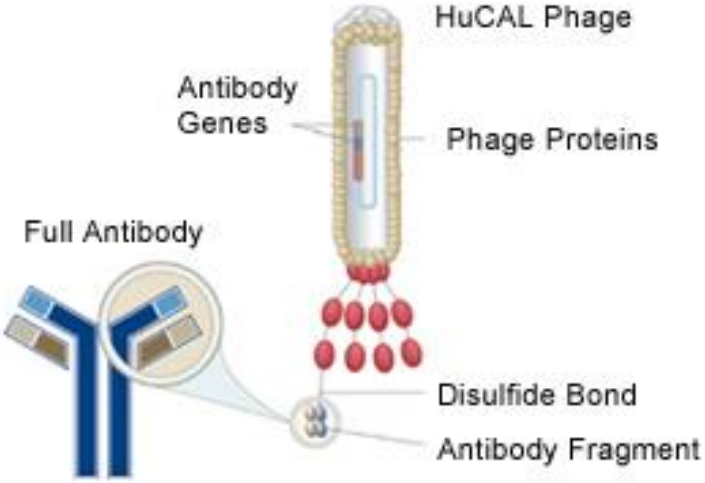


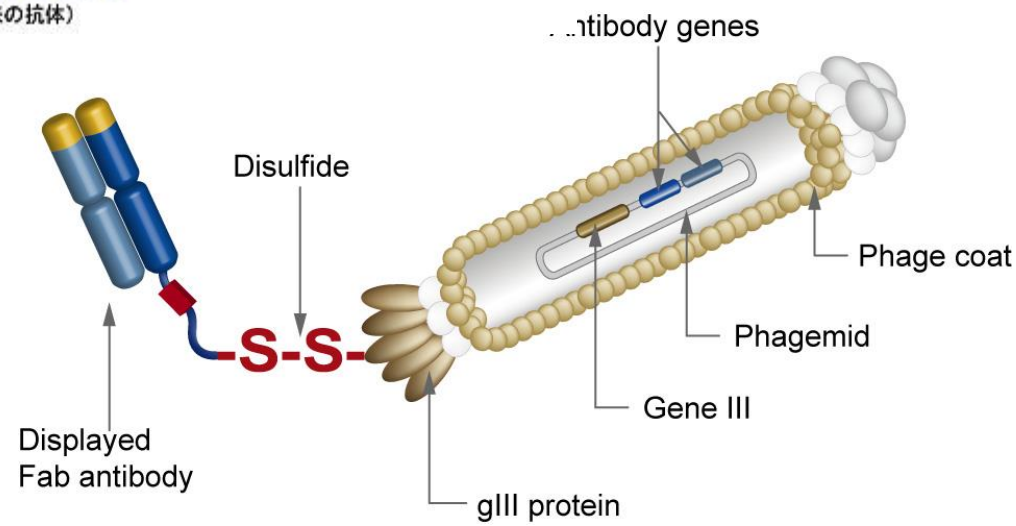
目的タンパク質
スクリーニングに
抗体を利用

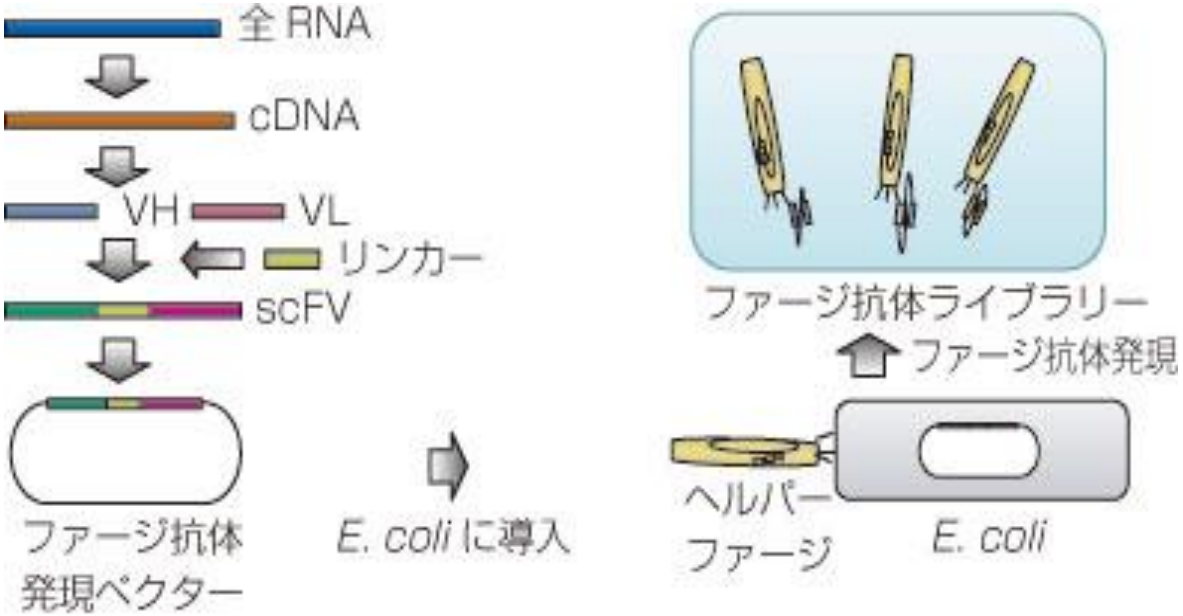
抗体エンジニアリング

ファージライブラリーによるヒト抗体ディスプレイ

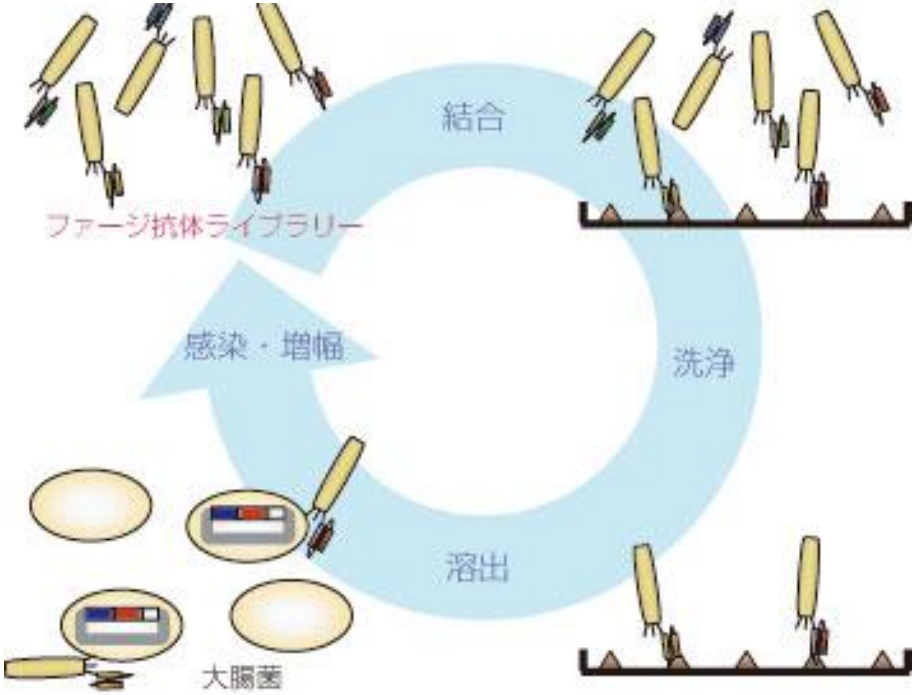








ヒト型モノクローナルミニ抗体作製法



パニング法の原理