

コスモ・バイオ 抗体作製ハンドブック

第2版

抗原の調製から抗体解析まで



人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社

コスモ・バイオの抗体作製サービス



Step 1 抗原調製

▶p.4~

ペプチド

エピトープデザイン

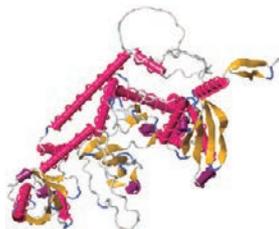
キャリア
コンジュゲーション



リコンビナントタンパク質

発現系

タグ



Step 2 抗体作製

▶p.7~

免疫動物・免疫方法を選択

宿主動物種



免疫方法/仕様

ポリクローナル抗体

モノクローナル抗体

Single B Cell

ファージディスプレイ

ライブラリスクリーニング
(*in vivo* / *in vitro*)



Step 3 抗体精製・加工 ▶p.16~

精製方法

- Protein A/G・KLHカラム
- アフィニティー精製
- ウェスタンブロット(WB)、ELISA評価

加工・最適化

- 断片化
- 修飾(蛍光、Biotin化など)
- 検出系の構築(ELISA・イムノクロマトグラフィー)



Step 4 抗体評価・機能解析 ▶p.17~

- エピトープマッピング
- ペプチドアレイ
- タンパク質結晶化・構造解析
- 可変領域のシーケンス解析
- 分子間相互作用解析
- バッファースクリーニング

関連技術およびサービス ▶p.19~

- 質量分析
- 3Dプリンター
- 細胞内導入ペプチド
- *in situ* hybridization (RNAscope™)
- 核酸アプタマー

抗体作製サービスのQ&A ▶p.22~

●**お願い/注意事項** 記載の社名・商品名等の名称は、弊社または各社の商標または登録商標です。

(参考価格・希望販売価格)当社Webページ記載の価格は2024年12月1日現在の価格で、予告なく改定される場合があります。また、「参考価格」・「希望販売価格」は販売店様からの実際の販売価格ではございません。ご注文の際には販売店様へご確認くださいませようお願い申し上げます。表示価格に消費税は含まれておりません。

(使用範囲)記載の商品およびサービスは全て、「研究用」です。人や動物の医療用・臨床診断用・食品用等としては使用しないよう、十分ご注意ください。



抗原調製 ▶ 利用目的に適した抗原の選択

リコンビナントタンパク質を抗原とする場合のポイント

- 抗体の利用目的に合わせて調製

例：

WB

- 抗原の状態：直鎖状
- 発現系：大腸菌でも可



ELISA・免疫染色

- 抗原の状態：立体構造を保持
- 発現系：哺乳細胞



タンパク質

メリット：

- ✓ 立体構造を形成
- ✓ Nativeに近い

ペプチド

メリット：

- ✓ 短納期
- ✓ 安価
- ✓ エピトープ選択が可能

VS

成功率

タンパク質 > ペプチド

エピトープ選択の自由度

タンパク質 < ペプチド

時間・コスト

タンパク質 < ペプチド

ペプチドを抗原とする場合のポイント

- 合成が困難な配列は避ける
- 高純度品を用いる

例：

合成難易度が高くなる要因

- 高疎水性
- 同一のアミノ酸が連続する
- 修飾アミノ酸が複数含まれる

デザインのポイント

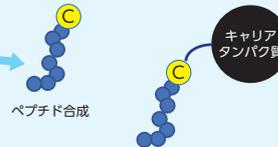
- タンパク質の表面上に露出する領域
- 配列内部にシステインを含めない
- 2次構造を形成しない領域

抗原全体



エピトープ部位 抗体

キャリアタンパク質結合



ペプチド合成

キャリアタンパク質

こちらのデータはSWISS-MODELを使用して作成したデータの一部改変しました。
このデータはクリエイティブ・コモンズ・ライセンス (表示・継承4.0国際)のもとに提供されています。

抗原調製 ▶ ペプチド

抗原にペプチドを選択
 ●スピーディ ●安価
 ●調製困難な抗原に対応

▶ コンサルティングデザインサービス： MODELAGON™

- マルチプルアライメントの結果を考慮した予測
- 対象タンパク質が膜タンパク質である場合、細胞内あるいは細胞外領域を指定して解析可能

AI搭載ペプチド抗原デザインシステム MODELAGON™ (モデラゴン) とは

●合成ペプチドとネイティブ構造の差を生じさせない

- ▶ Linearな構造で表面上に露出している部分を選択
- ▶ disorder領域にも着目
- ▶ PDBの立体構造情報と組み合わせて解析の正確性が向上
- ▶ ペプチド結合アクセシにも対応

●スピーディ

- ▶ ノートPCによる解析で対面で対応可能
- ▶ 数秒で解析完了
(条件変更・再解析の回数制限なし)
- ▶ マルチプルアライメントの条件解析も可能

●個人差を出さない

- ▶ 人工知能を実装



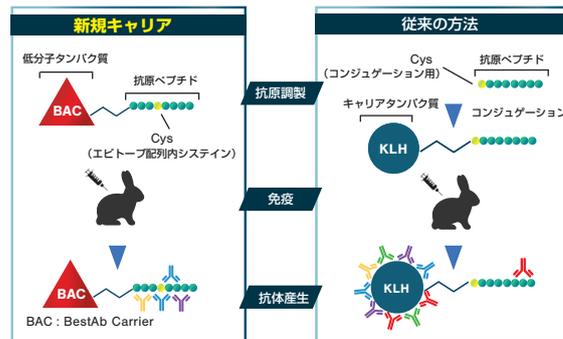
この露呈部位を
抗原に選定

WEBの記事ID ▶ 35607 検索

HOT ▶ キャリアコンジュゲーション： BestAb Carrier (BAC)

- キャリアタンパク質に対する抗体産生を低減
- エピトープアミノ酸配列の自由度UP (内部システイン可)
- KLH由来の低分子タンパク質を使用

KLHに代わる新規キャリアの選択肢 BestAb Carrierとは



抗インテグリンβ1 (ITGB1) ペプチド ウサギポリクローナル抗体の作製事例

KLHに比べBACでは、より抗原ペプチド特異的な抗体が産生されていた。





リコンビナントタンパク質

抗原にリコンビナントタンパク質を選択

- ネイティブに近い立体構造を保持
- 抗体作製時の成功率が高い

対応可能な発現系一覧

発現系	特徴	アプリケーション例	納期
大腸菌	 <ul style="list-style-type: none"> ・生産コストが低い ・迅速に発現精製が可能 ・封入体形成により精製が困難な場合がある ・翻訳後修飾がほとんどない 	<ul style="list-style-type: none"> ・微生物由来のタンパク質 ・抗原タンパク質 ・サイトカイン等の因子 ・酵素 	1~2カ月
昆虫細胞	 <ul style="list-style-type: none"> ・サイズの大きい遺伝子にも対応 ・哺乳細胞に近い翻訳後修飾 ・煩雑な培養条件 ・ウイルスの利用が必要 	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞質、核タンパク質 ・分泌タンパク質 ・膜タンパク質 ・ウイルス由来のタンパク質 	2~3カ月
哺乳類細胞	 <ul style="list-style-type: none"> ・大部分の翻訳後修飾を網羅 ・一過的もしくは安定発現のどちらも利用可能 ・収量が低い ・煩雑な培養条件 	<ul style="list-style-type: none"> ・分泌タンパク質 ・膜タンパク質 ・リコンビナント抗体 ・部分抗体 	1~2カ月
無細胞発現	 <ul style="list-style-type: none"> ・標的遺伝子のPCR産物のまま発現が可能 ・毒性タンパク質にも対応 ・収量が低い ・収量あたりのコストが大きい 	<ul style="list-style-type: none"> ・毒性タンパク質 ・変異体、非天然アミノ酸をもつタンパク質 ・RI標識タンパク質 	1カ月

対応可能なタグ一覧

タグ	分子量 (kDa)	由来	特徴
His	0.8	人工配列	<ul style="list-style-type: none"> ・尿素やグアニジウム塩酸塩で変性させたタンパク質の精製も可能 ・タグが小さいため、組換えタンパク質に対する影響が少ない ・比較的低コスト
FLAG	1.0	人工配列	<ul style="list-style-type: none"> ・親水性のため融合タンパク質の表面上に存在しやすい ・エンテロキナーゼによって切断可能
HA	1.1	ウイルス	<ul style="list-style-type: none"> ・親水性のため融合タンパク質の表面付近に存在しやすい ・アポトシスで活性化されるカスパーゼ3/7により切断され、免疫反応性を失う
IgG-Fc	40	IgG抗体	<ul style="list-style-type: none"> ・目的タンパク質の安定性や可溶性を向上 ・Protein A/Gアフィニティー担体により簡単に精製可能
GST	26	寄生虫	<ul style="list-style-type: none"> ・発現タンパク質の可溶性が増加する ・分子量が大きく、タンパク質の構造・機能を阻害する可能性がある

モデルケース

発現系：哺乳類細胞 (CHO, HEK293)

Step1:

遺伝子合成
発現ベクターの構築
小規模発現検討試験

価格例：30万円～
納期：8週間～

サービス内容：

- ・コドンの最適化
- ・適したタグの選定
- ・発現精製の条件検討

Step2:

本培養・発現精製

価格例：100万円～
納期：4週間～

サービス内容：

- ・300 mLスケールでの培養および発現
- ・任意のタグを利用したタンパク質の精製

WEBの記事ID ▶ 44338 検索

- *他にもプレビパチルス菌やジオパチルス菌を用いた分泌発現等も承っています。
- *価格や納期につきましては一例となり、タンパク質やご希望の容量等によって異なります。



抗体作製サービス一覧

コスモ・バイオではトライしやすい価格帯から高難易度の抗体作製の実績が豊富です。長年、抗体を取り扱ってきた経験から多様なニーズにお応えするプランをご用意しています。※**権利・知財：完全譲渡**

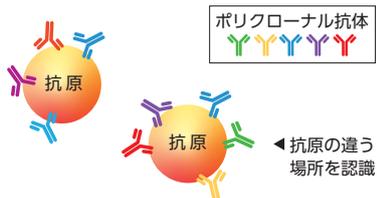
抗体仕様決めガイド

抗体タイプ選択

抗体には大きく分けてポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の2種類があります。

▶ポリクローナル抗体

- 抗原の複数カ所を認識する
- 多様な特異的抗体を含む抗体群
- ロット間の差が大きい
- 様々なアプリケーションで使用できる可能性がある



ラインナップ



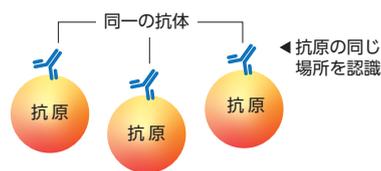
対応可能な宿主動物例：

ウサギ、モルモット、ミニブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、アルパカ

▶モノクローナル抗体

- 抗原の一カ所のみを認識する
- 単一クローンの特異的抗体
- ロット間の差が無い
- 定量的な研究にも使用可能

ラインナップ

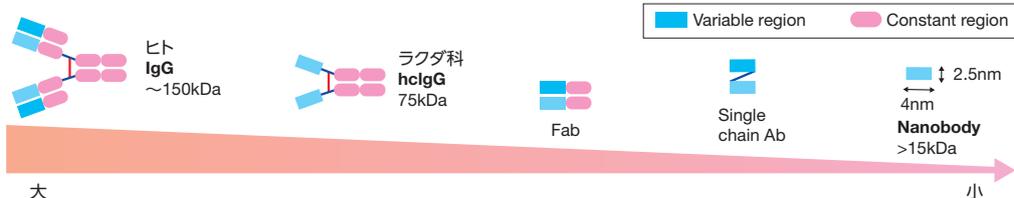


リコンビナント抗体(組換え抗体)

- ・ VHH抗体
- ・ Fab/scFv抗体
- ・ 二重特異性抗体 (Bispecific抗体)
- ・ キメラ抗体
- ・ ナイーブライブラリ
- ・ CDR配列をベースとしたIgG, IgMなど多様なサブタイプ抗体



抗体サイズの違い



ポリクローナル抗体

低コストで自分だけのオリジナルの抗体を作製することが可能です。既製品として販売されている抗体と同じタンパク質に対する抗体の作製はもちろん、販売されていない生物種の抗体についても作製可能です。

ファースト抗体(プラス)



抗原をお持ちでない場合でも、最適なエピトープのデザイン解析から対応可能なプランです。低価格でありながら、免疫動物の死亡保証や力価保証(持込み抗原を除く)も含まれます。

項目	ファースト抗体	ファースト抗体プラス
純度	≥ 50%	≥ 70%
収量	5 mg	5 mg
オプション(有償)	—	修飾/MIX 免疫/プレブリード
中間採血・ELISA	—	○
力価/死亡保証	○	○
ペプチド抗原	納期：3カ月～ 価格：¥63,000～	納期：3カ月～ 価格：¥90,000～
持込み抗原	納期：2.5カ月～ 価格：¥58,000～	納期：2.5カ月～ 価格：¥82,000～

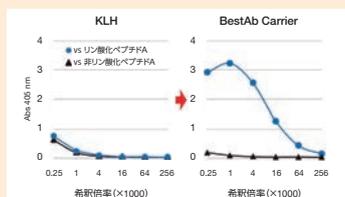
WEBの記事ID▶17262 検索

PICK UP

従来のキャリアタンパク質の問題点を解決！

▶ オプションサービス：BestAb Carrier (BAC)

リン酸化特異的な抗体を取得！



KLHコンジュゲーション抗原とBestAbCarrier (BAC)を用いた抗原で作製した精製抗体のELISA評価では、KLHを用いた抗体はカラム精製後に大部分の抗体が消滅し、特異性は認めらなかった(左)。BestAbCarrier (BAC)を用いた抗体では大部分の抗体がリン酸化ペプチドAに対してのみ反応し、高力価であることが示された(右)。
詳細は▶p.5

カスタマイズ抗体



▶ 抗リン酸化抗体作製プラン

抗原ペプチドのデザインから合成・ウサギ2羽での免疫、リン酸化ペプチドによる精製とリン酸化を含まないペプチドによる精製(吸収)までの全てを含んだサービスです。

• 力価保証プラン

ファースト抗体と同様に、抗原ペプチドに対する力価を保証します。リン酸化部位への特異性は保証されませんが、安価にチャレンジできます。

納期：約4.5カ月 参考価格：370,000円～

• 特異性保証プラン

抗原ペプチドのリン酸化部位に対する特異的な力価を保証します。

納期：約4.5カ月 参考価格：598,000円～

そのほかメチル化・アセチル化・ユビキチン化などの翻訳後修飾抗体の作製もご相談ください。

▶ 異種動物免疫プラン

対応可能な宿主動物例：

モルモット、ミニブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ

免疫動物種の違いにより、取得する抗体の特性が大きく異なりますので、同じ抗原でも成功率をあげるために効果的です。

また、2種の動物免疫が必要なサンドイッチELISAをご検討の場合、本プランがおすすめです。



WEBの記事ID▶17263 検索

仕様例・作製フロー

1. エピトープ解析



エピトープ部位

Rank	Position	Length	Sequence (N-C)	m.w	ai/h	c/d	Hits
1	128-144	17	YLNRFESSEEQARAVQ	2056.19	-1.083	0.389	1
2	44-60	17	RQPLTSSERIDKQIRYI	2103.41	-0.933	0.444	1
3	79-91	13	ESSKEALAEENLN	1418.46	-0.914	0.429	1
4	162-174	13	DAITTPDPTNAS	1303.35	-0.479	0.286	1
5	196-212	17	RSFKEFLQSSLRALRQM	2081.46	-0.394	0.389	1

こちらのデータはSWISS-MODELを使用して作成したデータを一部改変しました。
このデータはクリエイティブ・コモンズ・ライセンス(表示・継承4.0国際)のもとに提供されています。

ペプチド鎖長は15残基前後程度、タンパク質の表面上に露出し、合成ペプチドでの再現性が高い領域を選定します。Isoform共通領域や断片化末端などの特定の領域を検討することも可能です。

2. エピトープペプチド設計・合成

構造例：C-RQLKKAQWNVVEY-(NH₂)

キャリアタンパク質との結合部位として末端にシステインを導入します。
タンパク質内部の領域をエピトープとした場合には、末端のアミノ酸の荷電はアミド化やアセチル化により処理することで天然型を模倣し、細胞透過性の向上や非特異的抗体の産生を防ぐことが可能です。

3. 抗原調整

キャリア
タンパク質

-C-RQLKKAQWNVVEY-(NH₂)

抗体が産生される抗原性を得るためには、分子量1万以上が必要とされています。
合成ペプチド(15残基程度)では、抗原性が弱いため、高分子量で抗原性の高いキャリアタンパク質と結合させます。キャリアタンパク質には様々なものがありますが、一般的には最も高分子で抗原性の高いKLHが使用されます。

4. 免疫・採血

免疫動物：ウサギ



	28日免疫		49日免疫		77日免疫	
	抗原投与	予備採血	抗原投与	予備採血	抗原投与	予備採血
Day0	抗原投与	予備採血	抗原投与	予備採血	抗原投与	予備採血
Day14	抗原投与		抗原投与		抗原投与	
Day21		中間採血		中間採血		
Day28		全採血		全採血	抗原投与	
Day35						
Day42					抗原投与	
Day49						
Day56					抗原投与	
Day63						中間採血
Day70					抗原投与	
Day77						全採血

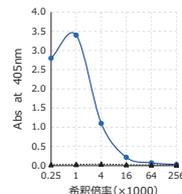
一般的には、49日免疫(3-4回免疫)で行いますが、抗原の種類や期待する血清量等を加味して免疫日数を選択します。
抗原性の高い抗原であれば28日免疫でも十分な力価が得られる可能性があります。

5. 血清の精製・評価

-C-RQLKKAQWNVVEY-(NH₂)



抗原ペプチドをリガンドとしたアフィニティカラム



ペプチド抗原を免疫したポリクローナル抗体の場合、得られた抗血清中には抗キャリアタンパク質由来の抗体と免疫動物由来の抗体が多く含まれているため、精製が必要です。
その際に抗原ペプチドをリガンドとしたアフィニティ精製が、最も高純度が期待できる精製方法です。1種類の精製方法で改善されない場合には、他の精製方法と組み合わせることで改善されることがあります。

ファースト抗体サービス使用

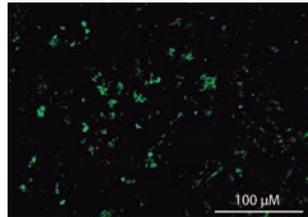
抗体取得例

TMEM106Bを検出するためのポリクローナル抗体を作製

データ提供：東北医科薬科大学 医学部 薬理学教室/東北大学 原田 龍一先生

サービスの利用目的：

前頭側頭型変性症の剖検脳において低分子化合物が反応する主要なミスフォールディングタンパク質陰性のアストロサイト様構造物を観察した。その主要な構成タンパク質の同定を目的に研究を進めていたが、2022年にクライオ電子顕微鏡解析から新しいアミロイド線維としてTransmembrane protein 106B (TMEM106B) が同定された。そこで、化合物が反応した構造物がTMEM106Bであるかを検証するために抗体を作製した。



実験条件

サンプル：

ヒト凍結切片 (FTLD-TDP-A (GRN))

固定：4% PFA

抗原不活化処理：オートクレーブ (10 mM EDTA, pH6, 121°C, 10分)、98%ギ酸 (2分)

一次抗体：TMEM106B抗体 (1:2000)

ビオチン標識二次抗体：Rabbit IgG (H+L)

蛍光標識：Streptavidin, AlexaFluor™ 488 conjugate

コスモバイオのエピトープコンサルティング

当社ではオリジナルのエピトープ予測ツールなど複数の情報を用い、専門のスタッフが最善の抗原ペプチドをご提案します。

- エピトープ予測ツール
- 全自動ペプチド抗原デザインシステム MODELAGON™ (詳細は ▶ p.5)
- タンパク質DB情報 (Uniprot / NCBI / AlphaFold etc.)

1つのタンパク質につき5配列程度*をご提案します。

*タンパク質によっては5配列以下のご提案になる場合もございます。

YSIRK-typeを検出するためのポリクローナル抗体を作製

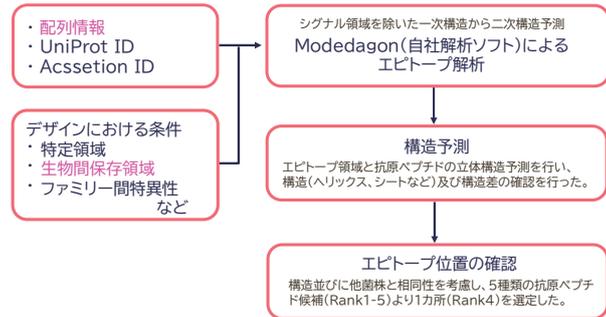
データ提供：北里大学 薬学部 微生物学教室 伊藤 雅洋先生

サービスの利用目的：

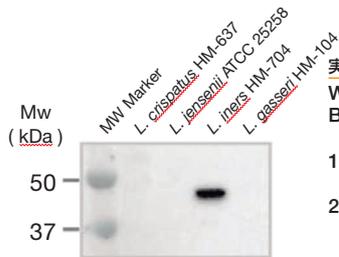
約30%の日本人女性は、腔内最優勢細菌として *Lactobacillus iners* を有している。なぜ *L. iners* が腔粘膜に定着できるのかを明らかにするため、菌体表面タンパク質に着目した。市販抗体はなかったため抗体作製サービスを利用し、得られた抗体を用いて解析を行った。

WBと免疫染色に利用可能な抗体の作製を目的とし、他菌株と相同性のある領域を選択してエピトープデザインを行った。

エピトープの選定方法



結果：WBに使用可能な抗体が得られた (以下結果データ参照)



実験条件

Wash Buffer：0.1% Tween 20 / TBS
Blocking：5% skim milk / 0.1% Tween 20 / TBS, 60 mins

1次抗体：YSIRK-type (Rank4：131-143) / Blocking, 1/250, O/N

2次抗体：Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody / Blocking, 1/10000, 60 mins

モノクローナル抗体

最適な抗原をお持ちでない場合や、過去に良い抗体が得られなかった抗体作製の再チャレンジについてもご相談承ります。
免疫やスクリーニング方法のカスタマイズ、種々のオプションの選択が可能です。

脾臓法



- マウス/ラット脾臓法
- 高親和性
- ステップごとにELISA評価

脾臓から単離したリンパ球を用いてハイブリドーマを作製します。免疫過程と1次・2次スクリーニング時にELISA評価試験を行います。低分子での実績もあり、他社で実施できなかった案件もご相談ください。

腸骨リンパ節法



- マウス/ラット腸骨リンパ節法(短納期)
- 多様性
- 各ステップ全作業終了・ELISA陽性ウェル取得保証

脾臓法よりも陽性クローンの取得数が多く、納期が早くなります。ステップバイステップ(ステップごとにご発注とご請求)で作業を進め、各ステップの全作業終了とELISAスクリーニングの陽性ウェル取得を保証しています。

DNA免疫法



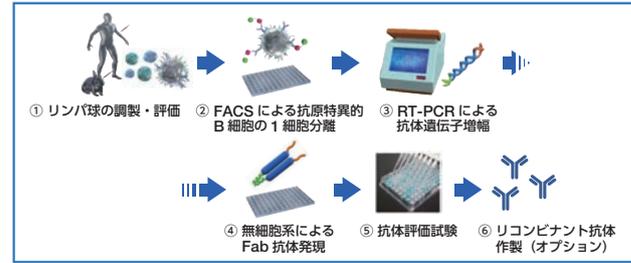
目的タンパク質を発現ベクターに組み込み、マウス・ラットに遺伝子導入して体内で発現をさせ、その目的タンパク質を抗原分子として抗体を作製します。
従来の方法では取得が難しかった膜貫通型タンパク質に対する抗体をはじめ、高度なアプリケーションに対応する抗体を得ることができます。

Single B cell法



- ウサギ/ヒトモノクローナル抗体取得
- 抗原特異的B細胞をFACSで網羅的に単離
- ➔ 無細胞タンパク質合成系でFab抗体発現 ➔ ELISA評価

ハイブリドーマの作製・増殖過程がない方法のため、B細胞の本来の多様性を維持したまま特異抗体レパートリーを取得することができます。



抗体取得例

《ウサギ抗体》

- ・低分子化合物
- ・病原性微生物
- ・毒素関連タンパク質
- ・動物病原性ウイルス

《ヒト抗体》

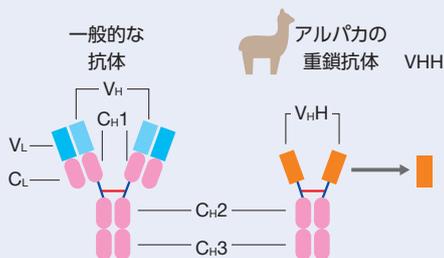
- ・ヒト病原性ウイルス
- ・がん組織・がん細胞
- ・自己免疫疾患の原因
- ・自己抗原、関連自己抗原

モノクローナル抗体

作製可能なリコンビナント抗体

リコンビナント抗体は高いロット間の一貫性をもち、継続的な供給が可能です。また、*in vitro*での発現のため、アニマルフリー製造を実現します。従来の抗体製品・作製サービスで課題だった再現性を確保するために選ばれています。

VHH抗体

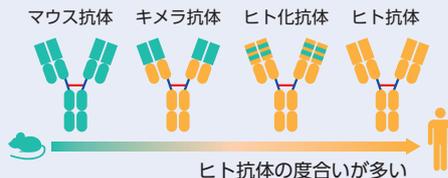


アルパカ等に見られる重鎖抗体の変可領域のみを取り出した抗体です。

以下のような特長が知られています。

- ・小型かつ高い安定性
- ・改変や修飾が容易
- ・大腸菌などで大量発現が可能

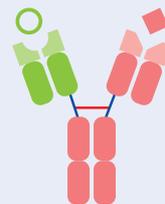
キメラ抗体



マウスなどの免疫動物から得られた抗体は、ヒトに対し重篤な免疫応答を引き起こしてしまうことが知られています。

CDRの配列だけを保持し、他をヒトに置き換えた抗体(キメラ抗体、ヒト化抗体)とすることで免疫応答を回避することが可能です。

二重特異性抗体

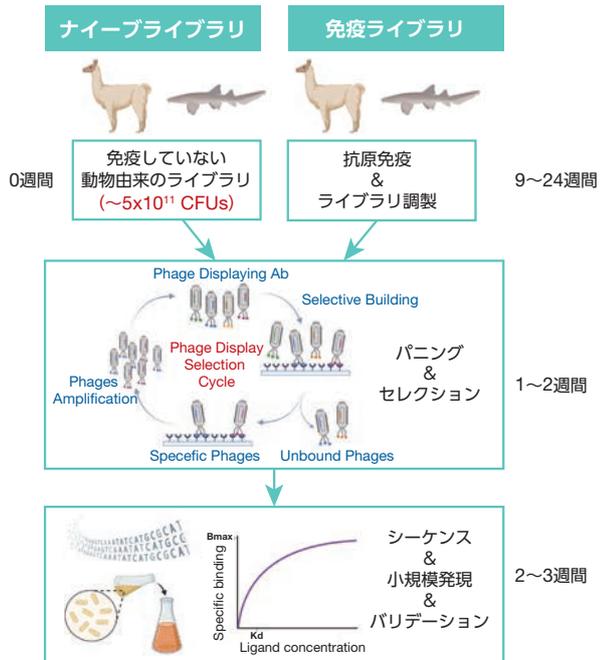


異なる二つの抗原に結合する抗体です。がん細胞とエフェクター細胞それぞれの抗原に結合する抗体によりがん免疫療法の治療効果を促進することが可能です。

他にも既存抗体の親和性の向上や、CDR配列をベースとしたIgG、抗体のデザインと発現など、遺伝子改変をベースに多様な抗体作製に対応しています。

VHH抗体プラン

サービスフロー



ナイーブライブラリは免疫過程が不要なため、免疫ライブラリに比べ、よりスピーディーなスクリーニングが可能。

VHH抗体作製の実施例

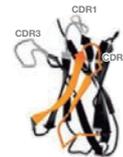


研究領域	ターゲット
細胞生物学	GFP, mCherry, MBP, FKBP, AKT1, Testosterone
がん	PD-L1, HER2, EGFR, VEGFR, p53, TRIM28
感染症	Influenza A, SARS-CoV2 spike, VSG, HIV-1 integrase
毒性	Cry1Ac, Cry1B, BoNT, Shiga Toxin, SEB
炎症	TNFR1, Adiponectin, ApoE, TNF α , procalcitonin
神経科学	Tau, TMEM30A, β 2AR, amyloid-beta 42, GFAP
食品・環境	Allergenic Pistachio Protein, Caffeine

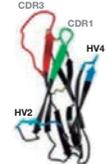
サメ由来の重鎖抗体 -vNAR抗体-

ラクダ科動物だけでなく、サメなど一部の軟骨魚類も独自の重鎖抗体 (vNAR) を持っています。ラクダ科のVHHに比べ、サメのvNARは以下の特性があることが示されています。

アルバカ由来VHH



サメ由来vNAR



▶ vNAR 抗体の特性

- ヒト抗原の検出に適した抗体が得られやすい
- 多様な抗原への反応性を示す、特徴的なパトープ構造を持つ
- pH、温度、有機溶媒に対し、高い耐性を持つ

- VHH抗体の作製可能な動物種：アルパカ、ラマ、ラクダ、サメ、動物不使用(アニマルフリー)
- ナイーブライブラリ：抗原性の低い物質や毒物にも対応、免疫ライブラリに比べ短納期
- 一般的な抗体ライブラリスクリーニングに比べ安価

NEW

完全アニマルフリー *in vitro* VHH抗体

近年、動物福祉の観点から実験動物を使用しない動物実験代替法による研究開発が求められており、免疫動物を使用しない抗体作製技術として選択可能です。



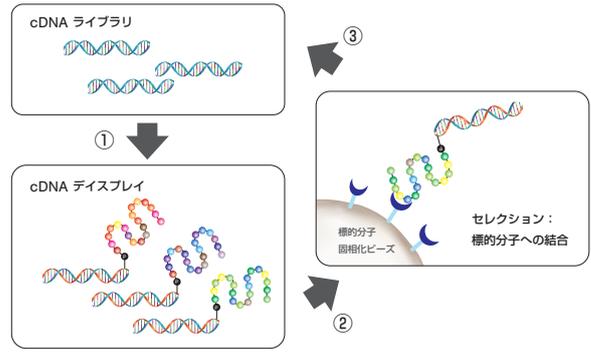
▶ cDNAディスプレイ法スクリーニング

cDNA ディスプレイ法とは、 $10^{12} \sim 10^{13}$ という膨大なライブラリサイズを扱える利点があり¹⁾、これによって高い結合力を持つ目的VHHの獲得が可能になります。また、*in vitro*でセレクションを行うため、毒性物質を標的としたり、一定濃度の有機溶媒存在下でセレクションすることも可能です。

【参考文献】

- 1) 根本直人他(2013) cDNA displayによる分子デザイン —mRNA display (*in vitro* virus) からcDNA displayへ—、生物物理53(5)、250-253

サービスフロー



1. cDNAディスプレイ (cDNAと翻訳されたVHHの連結体)の調製。
2. 標的分子に結合するcDNAディスプレイのセレクション。
3. cDNAのPCR増幅

1～3のサイクルを繰り返して、目的VHH cDNAを収斂させる。

▶ 作業内容例

- 標的分子固相化ビーズ調製
- cDNAライブラリセレクション(3～5ラウンド)
- セレクション後cDNAのクローニング

Seq.解析、VHH合成、評価



ディスプレイ技術の比較

	cDNA display	mRNA display	Phage display
Library size	★★★★	★★★★	★
Stability	★★★★	★	★★★★
Diversity	★★★★	★★	★★

表：メスキュージェナシス株式会社HP (<https://www.mescuejanusys2.com/>) から転載



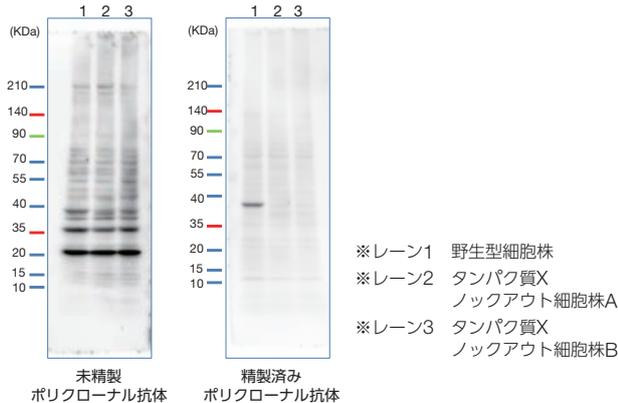
抗体精製

- 抗体調整(マウス腹水、培養上清調整)
- アフィニティー精製 → 実施例 下部参照
- ProteinG、A、KLHカラム

PICK UP

▶アフィニティー精製の実施例 -抗体特異性の向上(シングルバンド化)-

アフィニティーカラム精製前後の抗血清を用いたウェスタンブロットのシグナルを比較した。



データ提供：旭川医科大学 病理学講座 腫瘍病理分野 高澤教授

未精製の抗血清では多数の非特異的の反応が見られるのに対し、精製後はレーン1の野生型細胞株ライセートサンプルでシングルバンドが得られました。



抗体精製とは

ポリクローナル抗体は多様な抗体を含むことから、未精製のままでの使用は非特異的な反応の要因となります。特にペプチド抗原で作製した血清には、キャリアタンパク質由来の抗体が多く含まれるため、精製工程の必要性が高まります。

精製方法は実験結果の状況により、適切に選択する必要がありますが、一般的には下記の手法から選択または組み合わせます。

Protein G / A カラム

血清中の全IgGを結合します。濃縮効果も期待でき、カラムの種類も多いため、使いやすい方法です。その一方で、動物種によっては結合しないものがあるので注意が必要です。

アフィニティーカラム

抗原(タンパク質、ペプチド)をゲルに結合させ、抗原に結合する抗体を回収する方法です。最も高純度に精製することができ、特にペプチド抗原の場合には、特異性の高い抗体が得られます。まれに溶出効率が悪い場合があります。

KLHカラム

キャリアタンパク質(KLH)をゲルに結合させたカラムで、抗キャリアタンパク質抗体を回収します。溶出した抗体には抗キャリアタンパク質抗体が含まれていないので、抗原抗体のロスを抑えつつ抗体純度を上げることが可能です。

▶ハイブリドーマから抗体産生

- ハイブリドーマの培養・精製

▶抗原に対する抗体産生の確認

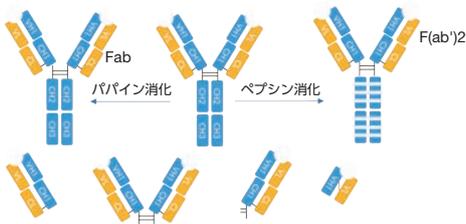
- WB、ELISA



抗体加工

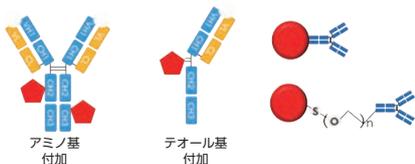
▶断片化

- 非特異的な反応の低減
- 結合する際の構造障害を低減
- 高感度化



▶修飾

- 標識 (蛍光、酵素、Biotin)
- 固定化 (パーティクル、プレート)



▶検出系の構築

●ELISA構築・測定

お客様がお手持ちの抗体または市販抗体を用いて、ELISAキットを構築します。

●イムノクロマトグラフィーキットの開発・作製

イムノクロマトグラフィーは抗原抗体反応を利用した検査方法です。判定ラインにおける発色の有無によって結果を目視で確認することができます。



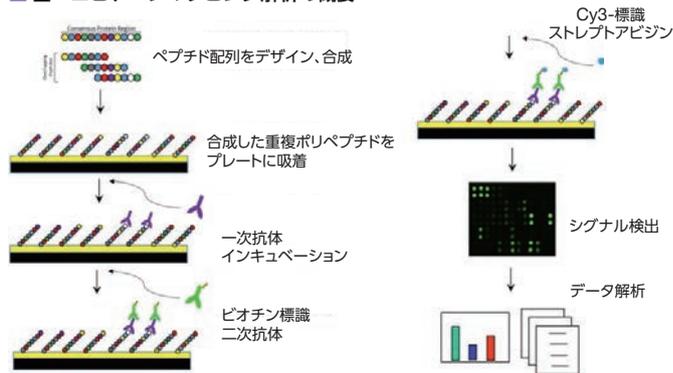
抗体解析関連サービス

▶エピトープマッピング／ペプチドアレイ

エピトープマッピングは、抗体の結合領域の同定や標的タンパク質の結合配列のスクリーニング解析などに非常に有用です。

通常、10～15アミノ酸長の合成ペプチドを使用し、各ペプチドは、1から3アミノ酸がフレームシフトした配列を推奨しています。

■図 エピトープマッピング解析の概要



メンブレン上にペプチドを合成したペプチドアレイを納品することも可能です。スクリーニングの目的に応じて、様々なアレイフォーマットでの作製も承っております。



抗体解析関連サービス

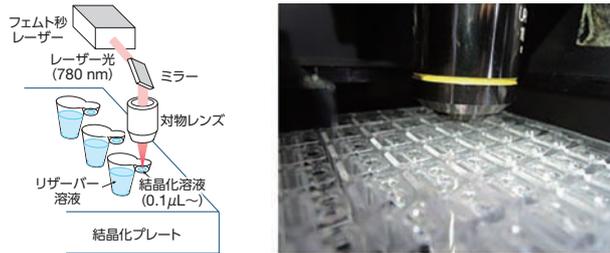
PICK UP

- 抗体のH/L鎖の配列確認 → 可変領域のシーケンス解析
- 相互作用解析 → MST等による結合評価
- 安定性評価 → nanoDSF

▶ タンパク質の結晶化および構造解析

結晶構造の形成が困難な分子に対して、独自のレーザー照射技術(LIGHT)などを用いることで結晶化と構造解析を実施します。

医薬品の研究等で特に重要となる抗体と抗原の共結晶など、難易度の高い結晶に対しても豊富な実績があり、高い成功率を誇っております。

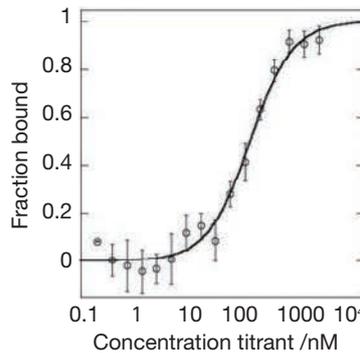


LIGHT: Laser Irradiated Growth Technique 原理図

▶ 可変領域のシーケンス解析

抗体可変配列の取得により、組み換え抗体の作製をサポートします。ハイブリドーマ株の細胞ペレットを提供いただき、抗体のH/L鎖それぞれの変領域のみアミノ酸配列を決定します。

▶ 相互作用解析

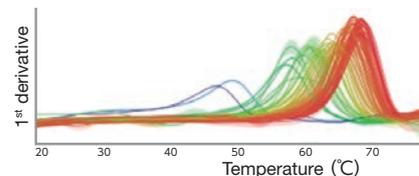


MSTやGCI(高感度SPR)、BLI、ITCなど、複数の手法で抗体と抗原との、あるいは化合物等との結合評価が可能です。

■ 図 ERK2タンパク質と抗体の結合評価
MSTで評価した結果、Kd値は137.9 ± 23.3 nMであった。

▶ バッファースクリーニング(安定性評価)

nanoDSFにより熱依存的な抗体のunfoldingをスループットよく評価します。抗体医薬品で用いられているバッファのライブラリと組み合わせることで、よりスピーディにバッファの最適化が可能です。



モノクローナル抗体1種について、96種のバッファ下で熱安定性を評価したところ、Tm値は46.7°Cから68.4°Cと幅広い値を示した。

PICK UP

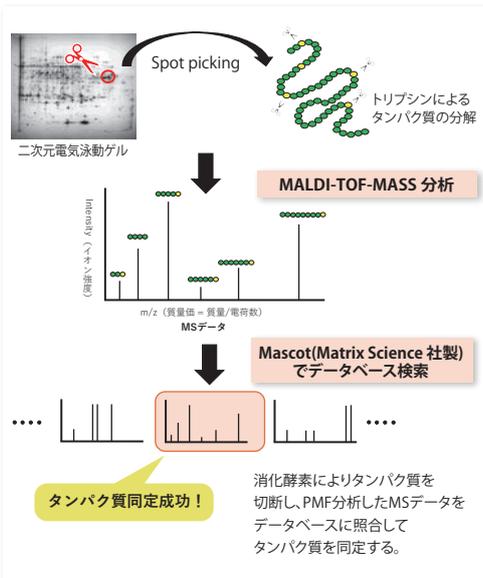


関連技術およびサービス

- ノンスペシフィックなバンドの確認 → 質量分析
- ターゲットの分子模型作製 → 3Dプリンター

▶ 質量分析

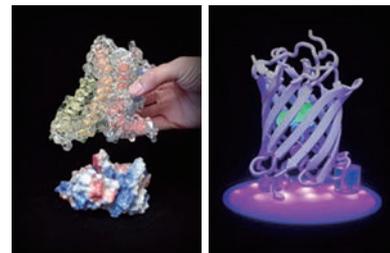
MALDI-TOF MASSによるPMF解析は切り出したSDS-PAGEのシングルバンド等をトリプシン処理によって切られたペプチドフラグメントの質量を分析し、これをMascotサーチすることによりタンパク質を同定する解析法です。非特異的なバンドの評価に有用です。



MALDI-TOF MASSによるPMF分析の概要

▶ 3Dプリンターを用いた分子模型作製

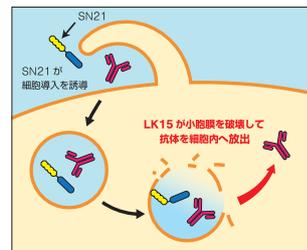
3Dプリンターにて分子表面をかどった模型や2次構造模型などを製作します。ユニットごとに分割した出力や磁石を埋め込むなどのギミック、異素材を組み合わせたモデルなど、様々な表現により今までにない分子模型を製作します。



分子模型例

▶ 生体高分子の高効率細胞内導入ペプチド

京都大学 化学研究所の二木史朗教授らが開発した細胞内に生体高分子を効率良く導入することができるペプチド「SN21-LK15」は、抗体や生体活性タンパク質、核酸等と共に培地に添加することで、これら生体高分子を効率的に細胞内に導入することができます。



細胞に導入できる生体高分子例：
抗体、ペプチド、核酸等

抗原調製

抗体作製

抗体精製・加工

抗体評価・機能解析



関連技術およびサービス

PICK UP

▶ *in situ* hybridization (RNAscope™)

WEBの記事ID ▶ 9056 検索

RNAscope™は、FFPE組織、凍結組織、培養細胞等のサンプル中のmRNAを、独自のRNA *in situ*ハイブリダイゼーション (ISH)法により検出・視覚化する技術です。発色および蛍光染色用の多様なキットがあり、お客様の目的に応じてご選択いただけます。製品の販売だけでなく、本試薬キットを用いた受託サービスも提供しております。

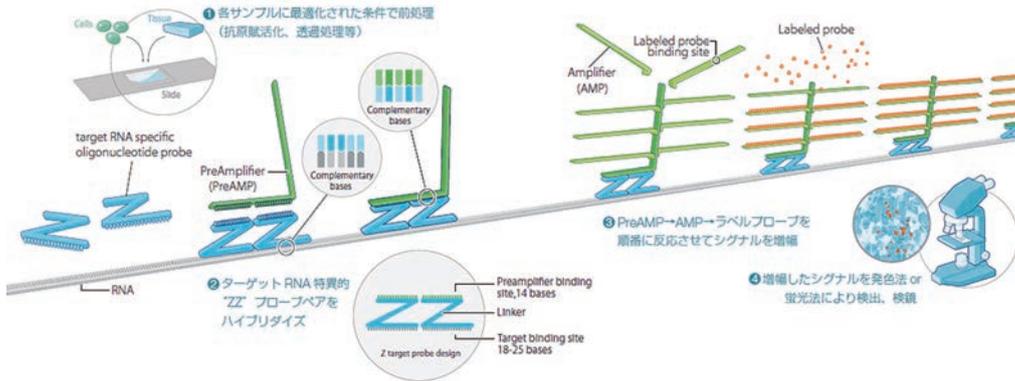
おすすめ研究分野/解析

- 発現量の低い遺伝子の解析
- 新規バイオマーカーの探索 (がん)
- 幹細胞研究・神経科学研究
- 抗体を用いた免疫組織染色 (IHC) の検証
- Non-coding RNAの解析
- HPVなどのウイルスの検出

使用文献数
9600報
突破しました!!

RNAscope™ワークフロー

シンプルなワークフローで約8時間で検出

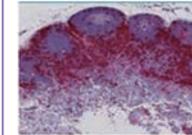


RNAscope™の特長

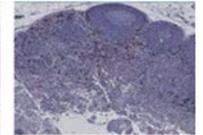
● 超高感度

従来のDigoxigenin-ISH法よりも100倍以上の感度で、1分子のRNAを1ドットとして検出可能

■ サルFFPE組織のサル免疫不全ウイルスの染色結果



RNAscope™



Dig-ISH

● 汎用的

塩基配列情報があればあらゆる動物種のRNAを検出可能



抗体以外の手法で

- mRNA発現レベルを確認 → RNAscope™
- 低分子等の検出困難な標的を検出 → 核酸アプタマー

▶ RNAscope™ 国内染色サービス

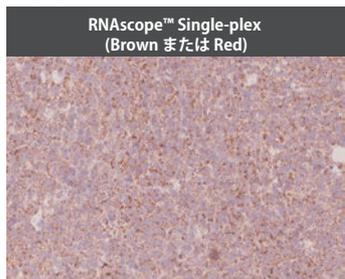
設備や経験は無いけれど、RNAscope™を試したい方、
少数サンプルで染色したい方におすすめ！

組織染色の専門家 株式会社モルフォテクノロジーが
組織標本作製・染色を代行します。

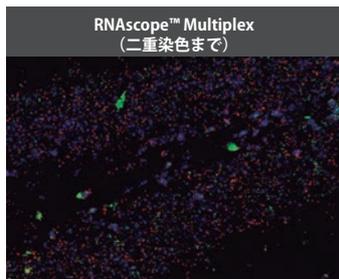
対応アッセイ

- RNAscope™ Single-plex (発色：BrownまたはRed)
- RNAscope™ Multiplex v2二重染色(蛍光：RedおよびGreen)
- RNAscope™と免疫染色の共染色(各1ターゲットまで)

染色例



マウス腫瘍 FFPE 組織 (茶：Ppib)



マウス脳 FFPE 組織 (赤：Ppib, 緑：Polr2a)

対象サンプル：

- FFPE (切片または組織ブロック*1)
- 凍結切片

*1：提供いただいたブロックは試験実施後に返却します。

納品物：

- 染色済みスライドグラス
- 染色に用いたターゲットプローブ
- パーチャルスライドデータ*2

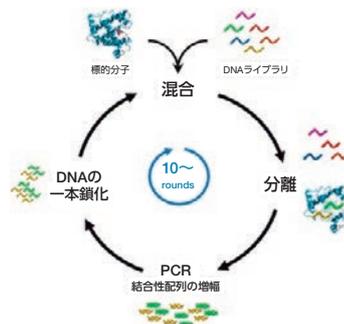
*2：蛍光アッセイの場合はオプションとして対応可。

納期や価格表はWEBでご覧いただけます。

WEBの記事ID ▶ 44785 検索

▶ 核酸アプタマー

核酸アプタマー (Aptamer) とは抗体と同様に特定の標的分子に対して特異的に結合する1本鎖のDNA/RNA分子です。特にDNAアプタマーはRNAアプタマーに比べて安定性が高く、医薬品や検査薬への応用が期待されています。短時間かつ安価に化学合成することが可能であり、免疫原性もほとんどない等、抗体にはない利点を有しています。低分子化合物や毒物など通常の抗体作製では困難な標的に対するアプタマーの取得も可能です。



	核酸アプタマー	モノクローナル抗体
取得にかかる時間	短期	長期
免疫動物	不要	必要
取得コスト	高価	比較的安価
製造コスト	安価	高価
実績	少ない	多い



抗体作製サービスのQ&A

- 1 取得した抗体が、
抗原リコンビナントタンパク質は認識しますが、
細胞や組織のライセート等では認識しません。

いくつか理由が考えられます。

- 検体中の抗原タンパク質の発現量が少ないもしくは発現していない
→発現量の高い検体もしくは画分等を使用してください。
- リコンビナントタンパク質は不均質な抗原となる場合があり、
ネイティブなタンパク質とは異なる可能性

- 2 免疫染色法で使用したものの
染色が確認できません。

固定化方法を変えることで抗原の構造が変わり、検出できる可能性があります。
トラブルシューティング例として右記二次元コードをご参照ください。
また、抗体によって抗原の認識形態が異なります。
そのため、ウェスタンブロットでは使用できても免疫染色では反応しない
可能性は十分に考えられます。



- 3 ウサギでポリクローナル抗体を作ると、
おおよそ何回分くらいの実験に使えますか？

個体差により大きく変動しますが、ウサギの場合には抗原特異的な抗体は約1%程度と考えられており、ウサギ1羽から約40mL程度の血清が得られます。このことからウサギ1羽から約4mg程度の特異的な抗体が得られる計算です(個体差や抗原により大きく異なる場合がございます)。希釈倍率など使用方法により異なりますが、おおよそ数万回は使用できます。

- 4 抗体はどのように保管すればよいですか？
逆に保管条件で絶対避けたほうがよいものは
ありますか？

ポリクローナル抗体の場合、納品物には防腐剤(プロクリン)が含まれています。その条件であれば、冷蔵で約1週間程度は安定です。凍結融解は抗体へのダメージが大きいため、1回の使用量に分注し、冷凍(-20度、-80度)で保管してください。霜取り機能がついている冷凍庫は温度変化があるためご利用は控えるようにしてください。
モノクローナル抗体の場合には、クローンによって抗体の安定性が大きく異なります。基本的には一般的なタンパク質の保管方法と同様になりますので、なるべく高濃度で使い切り分に分注し、冷凍保管で1年程度を使用目安とお考えください。

- 5 **例えばマウスのタンパク質をマウスに免疫して抗体を作製することは可能でしょうか？**
分泌タンパク質など常に免疫系に曝される物質は難易度が高いと考えられます。また、動物種が異なっても構造や配列相同性が高い場合も同様に難易度が高いです。抗原と免疫動物はなるべく遺伝的に離れているものが望ましいです。
- 6 **抗原を用意する場合の注意点はありますか？**
抗原量は免疫動物やスケジュールなどにより異なりますが、ウサギ1羽の場合では目安として1mg以上が必要です。濃度が最も影響しますので、可能な限り高濃度(1mg/ml)でご用意ください。変性剤などは、種類にもよりますがある程度の濃度であれば問題ありません。また純度に関しても免疫の仕様や目的に応じて異なりますのでご相談ください。
- 7 **ペプチド抗原の場合、エピトープは1つの部位もしくは複数部位のどちらで免疫するのがよいでしょうか？**
弊社での抗原ペプチドの長さは十数残基です。タンパク質を免疫した場合と比較すると、期待される抗体の多様性は多くありません。そのため、成功率を上げるという意味から、出来れば3か所以上のエピトープで作製することをおすすめします。さらに、1エピトープに対して複数個体免疫よりも、複数エピトープで各1個体免疫がおすすめです。
- 8 **低分子物質に対する抗体を取得することは困難でしょうか？**
低分子は高分子化への加工が必要なことや、類似物質が多く特異性が得られにくいことから、作製が非常に難しい物質となります。最近では、抗原調整の改良や免疫系を介さない方法も確立されていますのでご相談ください。
- 9 **難易度の高いターゲットはモノクローナル抗体で作製するのがよいでしょうか？**
ポリクローナル、モノクローナル抗体で、それぞれ特徴が異なります。また、抗体作製において各工程の選択肢は多岐にわたります。ターゲットや使用目的などに応じて最適な選択を行うことが必要です。多くの場合、ポリクローナル抗体でも目的の抗体を取得することが可能なため、抗体作製の手法選択についてはご相談ください。
- 10 **動物を使用しない方法はあるのでしょうか？**
ナイーブライブラリのように、予め取得した抗体ライブラリからターゲットに結合するクローンを取得する方法や、抗体とは異なりますが、アプタマーを利用することも可能です。また、*in vitro*で作製したVHHライブラリからスクリーニングにより選出する方法もお選びいただけます。

アミノ酸性質一覧

アミノ酸			分子量	側鎖構造式	親水性	電荷
Arg	R	アルギニン	174.2	<chem>-CH2-CH2-CH2-NH-C(=NH)NH2</chem>	↑ 親水性 ↓ 疎水性	+
Lys	K	リジン	146.19	<chem>-CH2-CH2-CH2-CH2-NH2</chem>		+
Asp	D	アスパラギン酸	133.1	<chem>-CH2-C(=O)OH</chem>		-
Asn	N	アスパラギン	132.12	<chem>-CH2-C(=O)NH2</chem>		
Glu	E	グルタミン酸	147.13	<chem>-CH2-CH2-C(=O)OH</chem>		-
Gln	Q	グルタミン	146.15	<chem>-CH2-CH2-C(=O)NH2</chem>		
His	H	ヒスチジン	155.16	<chem>-CH2-</chem>		+
Pro	P	プロリン	115.13	<chem>HO-C(=O)-</chem> *		
Tyr	Y	チロシン	181.19	<chem>-CH2-</chem>		
Trp	W	トリプトファン	204.23	<chem>-CH2-</chem>		
Ser	S	セリン	105.09	<chem>-CH2-OH</chem>		
Thr	T	トレオニン	119.12	<chem>-CH(OH)CH3</chem>		
Gly	G	グリシン	75.07	-H		
Ala	A	アラニン	89.09	<chem>-CH3</chem>		
Met	M	メチオニン	149.21	<chem>-CH2-CH2-S-CH3</chem>		
Cys	C	システイン	121.16	<chem>-CH2-SH</chem>		
Phe	F	フェニルアラニン	165.19	<chem>-CH2-</chem>		
Leu	L	ロイシン	131.17	<chem>-CH2-CH(CH3)CH3</chem>		
Val	V	バリン	117.15	<chem>-CH(CH3)CH3</chem>		
Ile	I	イソロイシン	131.17	<chem>CH3-CH(CH3)-CH3</chem>		

* プロリンはアミノ酸全体の構造式

蛍光色素早見表

	蛍光色素	Abs (nm)	Em (nm)
	Aminomethylcoumarin (AMCA)	346	442
	Alexa Fluor® 350	346	442
	CF350	347	448
400	DyLight™ 405	400	420
	Alexa Fluor® 405	401	421
	Pacific Blue	410	455
450	ATTO 425	436	484
	Cy2™	489	505
	DyLight™ 488	493	518
	Fluorescein (FITC)	495	528
	Alexa Fluor® 488	495	519
500	R-Phycoerythrin (RPE)	488	575
	DyLight™ 549	550	568
	Cy3™	552	565
550	Alexa Fluor® 555	555	565
	Alexa Fluor® 546	556	573
	Alexa Fluor® 568	578	603
	Cy3.5™	581	596
	DyLight™ 594	593	618
600	Texas Red®	596	620
	Alexa Fluor® 633	632	647
	DyLight™ 633	638	658
	DyLight™ 649	646	674
650	Alexa Fluor® 647	650	665
	Cy5™	650	667
	Cy5.5™	678	703
	DyLight™ 680	682	715
700	Alexa Fluor® 700	702	723

取扱店



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

— 各受託サービスの詳細や価格、納期に関するお問い合わせ —

TEL: 03-5632-9615 E-mail: jutaku_gr@cosmobio.co.jp

本社所在地 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル

<https://www.cosmobio.co.jp/>

14057