

ポリメタクリル酸グリシジル粒子を用いた粒子凝集法による高感度免疫測定

日大生産工(院) ○根本 浩史

日大生産工 神野 英毅

【緒言】

ポリメタクリル酸グリシジル粒子(GMA 粒子)は親水性が高く粒子表面にメタクリル酸グリシジル由来の機能性官能基であるエポキシ基を持ちアミノ基やチオール基、ヒドロキシル基、トシル基などを持つタンパクやその他リガンドを塩基条件下で共有結合することができる¹。タンパク等を結合した GMA 粒子は、ポリスチレン等から成る疎水性粒子と比較して、他のタンパクの非特異的吸着が起こりにくく非常に特異性が高い。その特性からアフィニティークロマトグラフィー用担体やイムノアッセイ用担体、またコアに磁性体を組み込んだアフィニティー用粒子として用いられる。一方、微粒子免疫凝集法(ラテックス凝集法)などで一般的に用いられる PS 粒子は疎水性が高い粒子であり、非特異的凝集反応がある。以前、我々はカルボキシル基修飾粒子にグリシンなどのアミノ酸をスペーサとして導入し、抗体を結合することで CRP 測定におけるラテックス凝集反応の感度が上昇することを報告した²。そこで本章では免疫凝集反応性の向上を目的として、高い特異性が期待できる GMA 粒子にグリシン、酸性アミノ酸としてアスパラギン酸、そして塩基性アミノ酸としてアルギニンを導入し、抗体を結合した試薬を作製し、免疫凝集反応性を測定した。また、粒子表面に導入したアミノ酸の電荷と凝集性を評価するためゼータ電位を測定した

【実験方法】

1、GMA 粒子の作製

担体であるラテックス粒子はソーブフリー乳化重合により核粒子を作製し、シード共重合によって GMA 粒子を作製した。

合成装置は、200ml 4 口セパラフラスコに冷却コンデンサ、窒素供給管、マグネテックス

ターラ、回転刃式ホモジナイザ(NS-310E) (マイクロテックニチオン)を装着して恒温槽中にセットした。合成条件は容器内を窒素ガスにて置換し、180ml の脱気すみイオン交換水、16.3g のスチレンモノマーを加え、40℃に昇温し、ホモジナイザを作動させ、スチレンモノマーを乳化分散した後、開始剤として 0.6g の 4,4'-アゾビス(4 シアノ吉草酸)(ACPA)を使用し重合を開始した。反応開始後 1 時間経過した時点で、ホモジナイザを取り外し、8.6g のメタクリル酸グリシジルをそれぞれ滴下し、マグネテックスターラで攪拌して重合を行った。所定時間後、ヒドロキノンにて反応停止し、作製した粒子は透析を行い精製した。

2、各アミノ酸スペーサ分子導入ラテックス試薬の作製および評価

作製した粒子は粒径測定、AFM、FT-IR により物性を測定した。

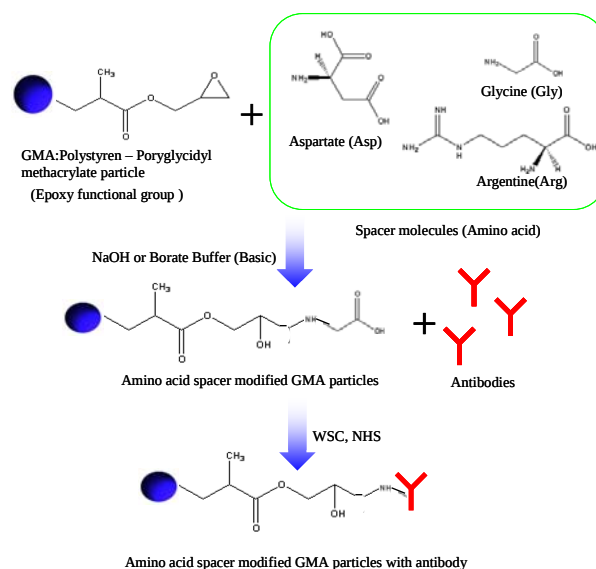


Fig. 1 A scheme of preparation for Amino acid spacer modified GMA particles with antibody

次に、スペーサ分子としてグリシン(Gly)、アスパラギン酸(Asp)、アルギニン(Arg)等のアミノ酸を塩基条件下で結合し、さらにカルボジイミド法を用いて抗CRP ウサギポリクローナル抗体を結合し、BSA でブロッキングしてアミノ酸スペーサ分子導入ラテックス試薬(GMA-Gly, GMA-Asp, GMA-Arg)とした。

各試薬の反応性は CRP 標準血清を使用し、全自動免疫血清検査システム(LPIA)を用いて、吸光度変化から求めた。凝集分散性の指標となるゼータ電位を顕微鏡電気泳動法(ZC-2000)により測定し反応性との相関を求めた。

【結果および考察】

Fig. 1 に作製したアミノ酸スペーサ分子導入ラテックス試薬の反応性を示す。スペーサ分子を用いた試薬は抗原濃度 10~1000ng/ml の抗原濃度範囲で GMA 粒子を単独で使用するよりも凝集反応性の向上が見られた。次に、各 pH における試薬のゼータ電位(Fig. 2)と抗原濃度 500ng/ml に固定した各 pH における反応性(Fig. 3)を示す。pH が塩基側にシフトするとともにゼータ電位が上昇し、分散安定性が高くなる傾向を示した。試薬反応性を示す dAbs は、pH が酸性側にシフトするほどゆるやかに上昇したが、pH 5.5 よりも酸性側では大きく減少した。これは、非特異的な凝集反応によるバックグラウンドの上昇が原因だった。また、各試薬は pH8 付近では、GMA-Asp のゼータ電位はやや高かったが、Fig. 1 では最も高い反応性を示した。これらのことから、ラテックス凝集反応はゼータ電位の影響を受けるが、アミノ酸スペーサを用いることで免疫凝集反応性は上昇すると思われる、これは感作抗体の力価、効率が向上したためだと考えられる。

以上から GMA 粒子にアミノ酸をスペーサ分子として導入し抗体を結合したアミノ酸スペーサ分子導入ラテックス試薬は高感度免疫測定が可能であり、GMA 粒子の特性を持った高特異なラテックス試薬が期待できる。

参考文献

1. 川口 春馬, 繊維学会誌, **60**, 391-394 (2004)
2. 小森谷 友絵, 神野 英毅, 第4回日本大学大学院生産工学研究科生命工学・リサーチ・センター研究発表講演会ポスター発表

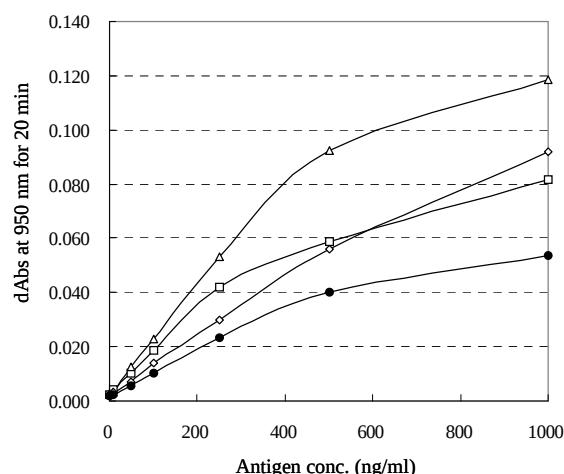


Fig. 1 Immunoreactivity of anti CRP coupled spacer-conjugated GMA reagents measured by LPIA-200 950nm 20min antigen range 10ng/ml~1000ng/ml in optimal condition.

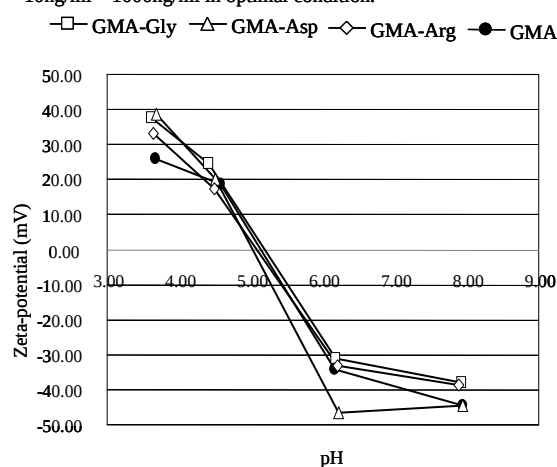


Fig. 2 Influence of zeta potential on pH by GMA latex reagents with BSA by 1mM Britton and Robinson buffer.

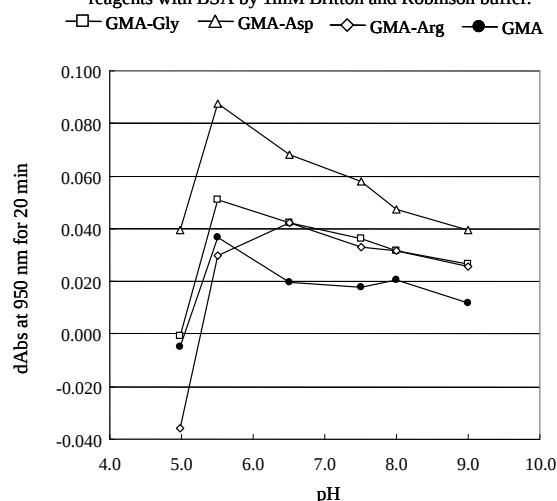


Fig. 3 Comparison of latex reagents between immunoreactivity vs pH using 0.1M Britton and Robinson buffer as R1 reagent. Antigen concentration is 500ng/ml.

□ GMA-Gly △ GMA-Asp ◇ GMA-Arg ● GMA