

固相化表面について

1. 固相(担体)表面への蛋白質の吸着:

ELISA分析は固相(担体)表面への蛋白質(抗体、抗原)の結合(吸着)を基本としています。

固相への蛋白吸着の力は

- (1)静電相互作用
- (2)疎水的な相互作用
- (3)水素結合
- (4)その他電荷移動
- (5)共有結合

等があります。

通常の ELISA で用いる吸着系はほとんどが水系であり、水分子の強い極性のため固相との相互作用は疎水性的相互作用が重要な役割を占めると考えられます。疎水結合は簡単にいえば疎水基同士(固相も基本的には疎水性)が水との接触面積をできるだけ小さくしようとするためにくっつき合う力と考えられます。従って、固相の表面状態は重要で、蛋白質表面の状態に合わせた親水性、疎水性のバランスが要求されます。この力は蛋白質の分子量が大きいほど大きく、分子量が小さくなると小さくなります。

従って、最近要望の多いオリゴペプチド等の様に、分子量の小さいものはこの結合だけでは安定した吸着は得られません。これらを解決するために固相にアミノ基、カルボキシル基等の活性な官能基を持たせ、低分子量との共有結合を作らせる様な特殊な固相も要望されています。

このように固相の状態は蛋白質の吸着に重要な役割を果たすと考えられ、以下弊社製品の固相の考え方、および実際の状態について説明いたします。

2. スミロン製品の固相について:

まず、形状から分類しますと3種類の製品が利用できます。

- (1) 96Fプレート:96個の平底のウェルを備えたプレート
- (2) 8Fプレート :8個の平底のウェルを備え専用の枠を使って96ウェル用のプレートリーダーで測定できます。

これらの形状に、SUMILON®では、S、H、アミノ、カルボの4種類の異なった固相を揃えております。

それぞれの固相の表面の官能基をESCA(Electron Spectroscopy for Chemical Analysis:軟X線を励起光とする光電子分光法。

基材表面の元素組成、化学結合状態がわかる)にて測定した結果を表1に示します。

固相Sは最も疎水性が高く、固相Hは若干の親水性が付与された状態となっています。

固相のアミノ、カルボはそれぞれアミノ基、カルボキシル基を持っており蛋白質の固相化時の緩衝液のpH次第では電荷による吸着も考えられますが、最もその力を発揮するのは物理的に吸着困難な低分子物を共有で結合させるところにあります。

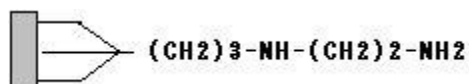
表1 各表面の官能基の比較(ESCAより)

製品タイプ	-CHOH	>C=O	-COOH	-NH ₂	>NH
Sタイプ	0.30	0.60	0	0	0
Hタイプ	0.50	0.21	0	0	0
Aタイプ	1.40	0.78	0.04	0.78	0.78
Cタイプ	2.10	0.97	0.44	0	0

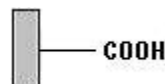
単位: nmol/cm²

但し、1ウェル 100μL 入れて 0.95cm ボール 1.27cm²

アミノ表面



カルボ表面



上の式に示すように、アミノ基は8原子のスペーサーを持つ末端一級アミンと中間の二級アミンとであり、カルボキシル基は表面に直接結合した状態です。

これら4種の固相に加え、塩ビ製の96Fプレートも準備しております。これは糖鎖が付いた蛋白質で有効であるとの報告があります。

これらの特徴、および用途に付いて表2にまとめました。

表2 SUMILON[®]固相の特徴

製品タイプ	特徴	結合様式	対象物質・実験	カタログNo.	備考
Sタイプ	中結合タイプ	物理吸着	高分子量の タンパク質固定 (>20kDa 推奨)	MS-8496F MS-8496W MS-8496K MS-8408P	—
Hタイプ	高吸着	物理吸着	一般的なタンパク質固定 (>10kDa 推奨) 感度を必要とする実験	MS-8596F MS-8596K MS-8508M	—
Hタイプ 検定書付き	高吸着ウェル間 バラツキ小	物理吸着	一般的なタンパク質固定 (>10kDa 推奨) 感度を必要とする実験	MS-8896F	検定内容: 当社検定内容 で下記の条件を満たす (1)吸光度の CV 値が 5% 以下(2)各ウェルの吸光度が 平均値の±10% 以内
Aタイプ	アミノ基導入	共有結合 物理吸着	共有結合による固定化 (分子量問わず) 酸性タンパク質・核酸の固定	MS-8696F MS-8608F	物質化学吸着の場合、 吸着量は H タイプ同等。 ただし、バックグラウンドが H タイプより高い
Cタイプ	カルボキシル基 導入	共有結合 物理吸着	共有結合による 固定化 (分子量問わず) 酸性タンパク質・ 核酸の固定	MS-8796F MS-8708F	物質化学吸着の場合、 吸着量は S タイプ同等。 バックグラウンドも同程度

注記: タンパク質吸着は各々用いるタンパク質の特性により異なりますので、表の分子量は目安としてお使い下さい。

3. 各固相へのヒトIgGの吸着特性:

これまで、固相の表面状態について述べてきましたが、ここでは各固相へのIgG吸着特性について比較いたします。

表3には8ウェルプレートで、表4にはボールで、上記の条件で測定したIgG吸着量と溶液濃度との関係を示しました。

それぞれ1ウェル、および1ボール当たりの吸着量が絶対値で示されておりますので、ELISAで得られる相対量との比較で有用であると考えられます。

吸着量で比較しますと、最も大きいものが固相アミノ、以下、塩ビ、H、Sとなり最も少ないのがカルボとなります。

但し、アミノ、カルボ共に共有結合による固相化方法を取らずに単純な吸着のみを対象としております。

表3 プレートでの吸着量の比較

溶液濃度	Sタイプ	Hタイプ	Aタイプ	Cタイプ	A社H相当品
0.1 $\mu\text{g/ml}$	1.8	4.4	5.4	1.1	4.8
0.2	5.8	8.5	10.3	2.2	9.2
0.5	15.5	19.8	23.3	5.5	21.8
1.0	32.4	37.8	43.4	10.9	42.0
2.0	67.7	71.7	80.5	21.7	80.5
5.0	179	167	181	54.0	190
10.0	300	316	333	108	363
20.0		400	600	200	400

単位:ng/ウェル(100 μl 入れると約 0.95 cm^2)

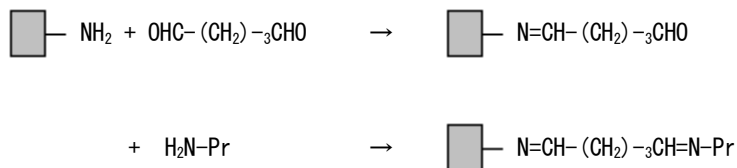
 飽和吸着量

4. アミノ表面、カルボ表面への共有結合

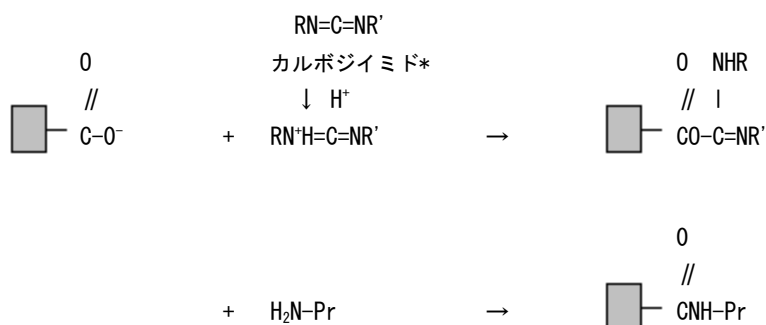
ここまで、蛋白質の吸着は物理吸着のみで話を進めてきました。アミノ、カルボの固相は共有結合で固相化する時に、その力を発揮する事は前にも述べた通りです。

反応のメカニズムを下図の通り示します。実際の固相化方法につきましては弊社のテクニカルレポート「アミノタイプ、固定化方法」「カルボタイプ、固定化方法」をご参照下さい。

アミノへの固相化



カルボへの固相化



参考文献

1)J.D.Andrade,"Surface and Interfacial Aspect of Biomedical polymers
Volume2 Protein Adsorption" 1985, Pleum Press, New York.

2)S.I.Renneard et.al., Archi.Biochem.and Biophys., 207, 399,(1981)

SUMILON® ELISA プレート使用例

3)吉本, 横山ら, 医学のあゆみ, 149(2), 113, (1989)

肝疾患患者血清中の soluble transferin receptor および transferrin の測定と臨床的意義

4)T.Komura et.al., Nihon Univ.Dent.J., 63,93(1989)

ELISAによる唾液アミラーゼの検出

5)市川ら, 臨床病理, 34(補冊総会号), 700(1989)

s-IgA定量における問題点 第3報 固相化条件とアミノプレートの検討

 **住友ベークライト株式会社** S-バイオ事業部 マーケティング・営業部

〒140-0002 東京都品川区東品川二丁目5番8号 天王洲パークサイドビル
TEL: 03-5462- 4831 FAX: 03-5462-4835
<https://www.sumibe.co.jp/>

