

ラテックス凝集反応を用いた抗3型デングウイルス由来エンベロープタンパク質第3ドメイン抗体の検出		
黒田研究室	学籍番号：17251008	氏名 井上絢恵

【背景・目的】

ラテックス凝集法は、表面に抗原または抗体を吸着させたラテックスビーズを用いて作製されたラテックス試薬によって、それらに特異的な抗体または抗原を検出する測定法であり、臨床診断に応用されている。ラテックス試薬は、反応溶液中で特異的な抗体または抗原を含んだ検体と混合すると、それらのタンパク質を介してラテックス粒子同士が疎水性相互作用によって凝集を生じる(図1)。凝集形成による粒子径変化を利用した顕微鏡観察あるいは吸光度測定によって抗体または抗原が検出される。

しかし、顕微鏡観察は感度が低く、環境条件によって精度にばらつきがでる可能性があり、また近年主流な方法として用いられている吸光度測定では、小さな変化量から検量線を引くことで検出に利用されている。本研究では従来のラテックス凝集法を発展させ、より高感度な新規検出法の開発を目的とした。

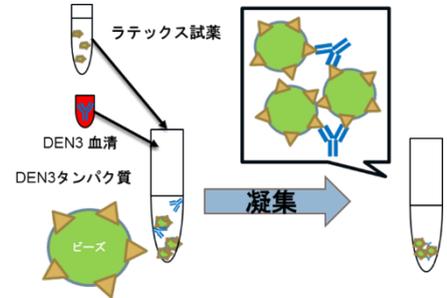


図1. ラテックス試薬の凝集

【手法】

抗原タンパク質としてモデルタンパク質の3型デングウイルス由来エンベロープタンパク質第3ドメイン(D3ED3)の野生型(D3wt)を用い、PBS バッファー(pH 7.4)中でラテックスビーズ(直径 0.46 μm)に吸着させ、粒子濃度の異なる3種類のラテックス試薬(0.5%, 0.25%, 0.1%)を作製した。ラテックス試薬と先行研究で得られた D3wt に特異的な抗体を持ったマウスまたは抗体を持たないマウスの血清を混合し、それぞれ 10 分間攪拌した後、1)プレートリーダーを用いた吸光度の測定(波長 570 nm) 2)動的光散乱法(DLS)による粒子半径の測定 3)静的光散乱法(SLS)による 600 nm の散乱光強度の測定をそれぞれ 3 回ずつ行った。

【結果・考察】

1)現在、臨床診断でも使用されている吸光度測定を行ったところ、ラテックス凝集による吸光度の変化は僅かであった。2) DLS によるラテックスビーズのみの粒子半径が約 200 nm であるのに対し、抗体を加えていないラテックス試薬の粒子半径は約 600 nm に増加した。D3wt の粒子半径は約 1 nm であることから、ラテックス試薬を作製する過程で、タンパク質が吸着するだけではなく、ラテックスビーズ単体の凝集も進んでいることが考えられる。抗体を加えない場合と比較し、抗体を加えた場合は粒子半径が約 100 nm~200 nm 増加した(図2)。3)散乱光の強度は抗体を加えることで、粒子濃度が 0.25%, 0.1% の場合に約 20%増加した(図3)。すべての実験において 0.5% 粒子濃度の試薬の結果の値が良くなかった理由として、粒子濃度が高いことによって大きな凝集が発生し、沈殿してしまったことなどが考えられる。以上により、粒子半径や光散乱強度の測定によって、顕微鏡観察よりも精度の高い抗体の検出が可能であることが示唆された。今後、吸光度測定と比較してより高感度で定量化しやすくするための更なる検討が必要である。

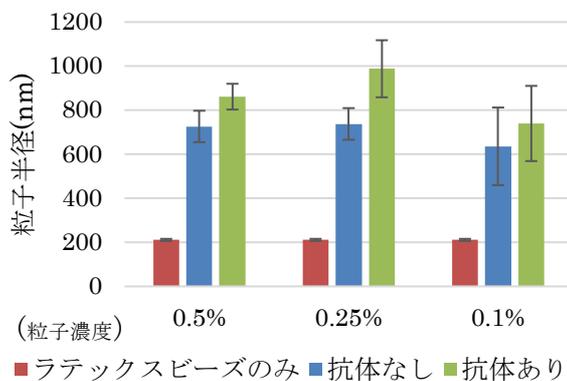


図2. DLS 測定結果

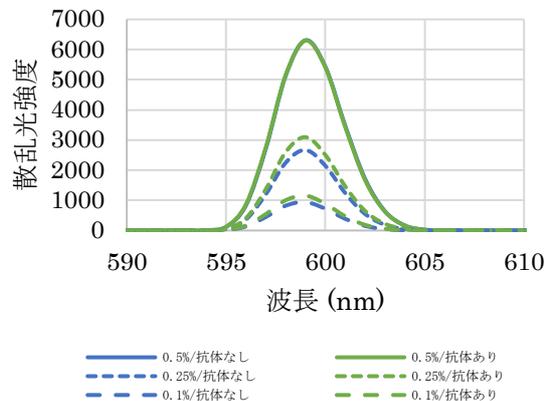


図3. SLS 測定結果