

ELISA

SUMILON® ELISA

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の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。
- (3) ボール：表面を粗化した径が約6.3mmの球

これらの形状に、SUMILON®では、S、H、アミノ、カルボの4種類（ボールはHタイプとアミノの2種類）の異なる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。

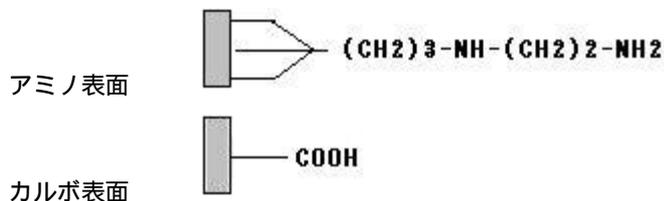
固相Sは最も疎水性が高く、固相Hは若干の親水性が付与された状態となっています。固相のアミノ、カルボはそれぞれアミノ基、カルボキシル基を持っており蛋白質の固相化時の緩衝液のpH次第では電荷による吸着も考えられますが、最もその力を発揮するのは物理的に吸着困難な低分子物を共有で結合させるところにあります。

表1 各表面の官能基の比較（ESCAより）

固相の名称	-CHOH	>C=O	-COOH	-NH ₂	>NH
S	0.30	0.60	0	0	0
H	0.50	0.21	0	0	0
A	1.40	0.78	0.04	0.78	0.78
C	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



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

固相の名称	代表品番	特徴	用途
S	MS-8496F MS-8496W MS-3408F MS-8596K	一般の蛋白 中位吸着	比較的濃度の大きい分析
H	MS-8896F MS-8596F MS-3508F MS-7401H MS-8596K	高吸着 ウェル間バラツキ小	一般の蛋白 感度を必要とする分析
アミノ	MS-8696F MS-3608F MS-7401A	高吸着 共有結合用アミノ基を持つ	低分子物の共有結合用 酸性抗原、抗体の分析
カルボ	MS-8796F MS-3708F	一般の蛋白は低吸着 共有結合用のカルボキシル基を持つ	低分子物の共有結合用 塩基性抗原、抗体の分析
塩ビ	MS-7296F	高吸着 プレート切断可能	特殊抗原、抗体(糖脂質など)の分析

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	固相	S	H	アミノ	カルボ	E	A社製 H相当品
	品番	MS-3408F	MS-3508F	MS-3608F	MS-3708F	MS-7296F	
0.1 μg/ml		1.8	4.4	5.4	1.1	6.5	4.8
0.2		5.8	8.5	10.3	2.2	12.0	9.2
0.5		15.5	19.8	23.3	5.5	26.7	21.8
1.0		32.4	37.8	43.4	10.9	48.3	42.0
2.0		67.7	71.7	80.5	21.7	86.5	80.5
5.0		179	167	181	54.0	185	190
10.0		300	316	333	108	325	363
20.0			400	600	200	500	400

単位: ng/ウェル (100 μl 入れると約 0.95 cm²)

 飽和吸着量

表4 ポールでの吸着量の比較

項目	固相	H	アミノ
	品番	MS-7401H	MS-7401A
飽和吸着量 (ng/ボール)		520	600
溶液濃度 (μg/ml)		9.4	11.2

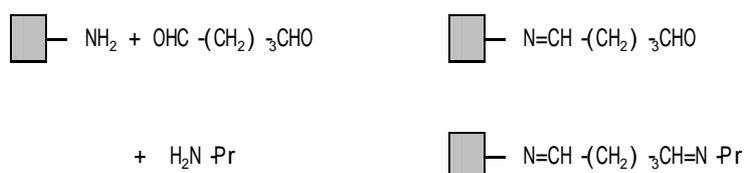
溶液濃度は表中の飽和吸着量を与える最小濃度

4. アミノ表面、カルボ表面への共有結合

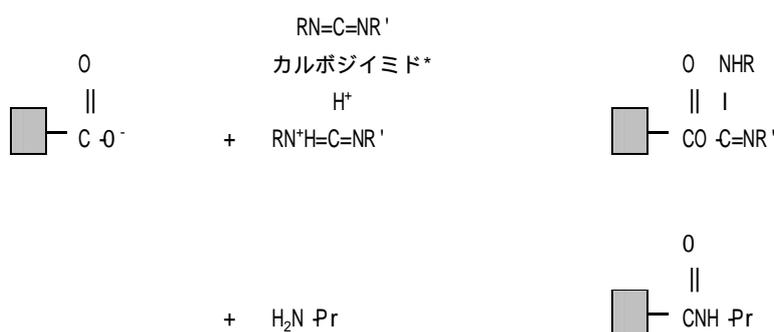
ここまで、蛋白質の吸着は物理吸着のみで話を進めてきました。アミノ、カルボの固相は共有結合で固相化する時に、その力を発揮する事は前にも述べた通りです。

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



*ex. $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}=\text{C}=\text{N}-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{HCl}$
 CH₃1-ethyl-3-(3dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride

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