

Simple Westernで血清中の抗体解析を簡素化

イントロダクション

血清抗体レベルを測定することで、感染症診断のためにバクテリアに対する免疫反応を確認し¹、ワクチン接種後の抗体産生を検査し、あるいは自己免疫疾患における自己抗体の有無を検出することがあります²。これらの抗体の検出には、従来法のウェスタンブロットがよく用いられますが、ウェスタンブロットは多くの手間がかかります。目的の抗原をSDS-PAGEで分離してメンブレンに転写し、患者血清サンプル内の特定の抗体の有無を検査するために、各レーンを短冊状(ストリップ)にカットした後、それらを手作業で分析する必要があります。

Simple Westernアッセイはサンプルごとに独立したキャピラリー内で行われ、サンプルの分離からデータ分析まですべてが完全に自動化されています。メンブレンを短冊にカットし、洗浄とインキュベートを行い、検出前にそれら全ての短冊を分子量マーカーで並べたりする必要はもうありません。アッセイプレートのウェルにサンプルを入れ、測定の設定を行うだけです。手作業によるデータ分析もすべてなくなりました - Compass for Simple Westernがすべて行います。1データポイントあたりわずか10µLの希釈済み血清で結果を得ることができます。

このアプリケーションノートでは、アッセイの証明実験として、全身性エリテマトーデス³患者血清内の自己抗体を検出するのにSimple Westernを使用しました。血清中の特定の抗体を検出し定量する必要があるときはいつでもこの方法を使用することができます。実際、メンブレンの短冊を作成せずに、このアッセイを使ってサルモネラ抗体を検出している例も文献参照できます⁴。

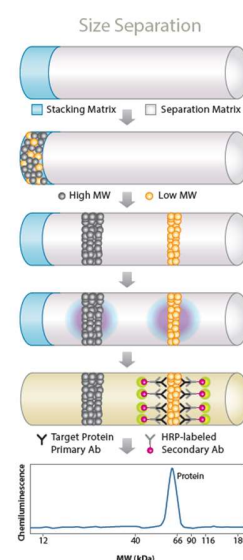
血清抗体アッセイ

Simple Westernは完全にオープンなプラットフォームであるため、血清中の抗体を分析する場合、いつでも柔軟に標準アッセイを変更して応用することができます(図1)。アッセイプレートを準備する際、一次抗体の代わりに、ProteinSimple Antibody Diluent 2で希釈した10µLの血清サンプルを指定の一次抗体列(C列)にピペットで分注するだけです。血清希釈率は、サンプル中の抗体の量に応じて、1:10から1:20000の範囲になります。次に5X Fluorescent MasterMixで調製した精製抗原を熱変性し、通常のサンプル列(A列)にピペットで分注します。組換え抗原の最終濃度はアッセイにより最適化します。

0.05~1mg/mL前後で開始し、必要に応じて抗原が飽和状態になるように調整することをお勧めします。それ以外はすべて同じで、30分のハンズオン時間後、わずか3時間で分析データを取得することができます。

標準アッセイ

マトリックスのロード
サンプルのロード
電気泳動
蛋白質のUV固定
一次抗体で免疫ブローブ後、検出
定量



血清中抗体

マトリックスのロード
サンプルのロード
電気泳動
蛋白質のUV固定
患者由来の血清で免疫ブローブ後、検出
定量

図1 標準的なシンプルウェスタンアッセイと血清中の抗体アッセイとの比較。

アッセイを開始すると、まず分離マトリックスとスタッキングマトリックスをキャピラリーにロードし、続いて精製済み抗原をロードします。抗原をサイズ(分子量)によって分離し、キャピラリー内に固定します。一次抗体インキュベーションステップ中に希釈済み血清でキャピラリーを満たします。そして血清中に存在する抗原特異的抗体は、キャピラリー内の抗原に結合します。次に、二次抗体インキュベーションステップ中に血清中の抗体のFc領域を認識するHRP標識した動物種特異的二次抗体でキャピラリーを満たします。最後に、HRPとLuminol/peroxide substrateを反応させ、生成した化学発光を検出し定量を行います。

全身性エリテマトーデス患者サンプルの自己抗体の検出と解析

全身性エリテマトーデス患者サンプルと関連抗原

この研究では、Bioreclimation IVT社からの、健常人および全身性エリテマトーデス(Systemic Lupus Erythematosus: SLE)患者由来の血清サンプルを使用しました(表1)。血液を血清分離採血管に採取することで、血清分離を行う凝固プロセスを高速化し、サンプルの補体保存直後に凍結しました。

各患者に対する診断、投薬の履歴およびSLEDAIス

コアも提供されました。SLEDAIスコア^bは、患者サンプルが収集された時点でのSLEによる炎症の重症度を示し、軽度から中程度の3を超えるSLEDAIスコアと重度の12を超えるSLEDAIスコアの患者からサンプルが収集されました。血清を複数回凍結融解した際に起こりうる劣化を避けるため、サンプル到着時にサンプルを小分け分注しました。

またSurmodics社から入手したSLE関連の抗原(表2)はすべて組換えタンパク質で、SLE患者での各抗原に対する抗体の出現率、および他の自己免疫疾患が報告されています²。

SIMPLE WESTERNのセットアップ

Wes Size Assayの製品説明書に従って、精製済み抗原を5XFluorescent Standard、DTTおよび1X Sample Bufferと混合し、最終濃度を0.02mg/mLに調整しました。サンプルを95℃で5分間熱変性し、1ウェルあたり3μLのサンプルをプレートのA列に入れました。10XSystem Control Rabbit抗体(PN 043-426)をAntibody Diluent 2で10倍希釈し(1X)、その後その1XSystem Control Rabbit抗体で患者血清を10倍希釈した後プレートCの列に移しました(図2)。20XProteinSimple Anti-Rabbit HRP Conjugate³をReady-to-use^cのAnti-Human IgG HRP Conjugate(ProteinSimpleから提供されるAnti-Human IgG Detection Module(PN DM-005)に含まれます)で20倍希釈し、D列に入れました。

ドナー	性別	年齢	投薬	診断	SLEDAI スコア
健常	男性	58	N/A	N/A	N/A
全身性エリテマトーデス(SLE)	男性	30	プレドニゾン、リシノプリル、 バイコディン、クロニジン塩酸塩、 フロセミド、シクロペンザプリン	SLE、腎炎および腎症、 高血圧、ループス腎炎	10

表 1 Bioreclimationから購入した健常人およびSLE患者血清提供者の性別、年齢、投薬、診断、およびSLEDAIスコア。患者情報はBioreclimationによって提供されました。

抗原	全身性エリテマトーデスでの 出現率(SLE)	同じ抗原に対する自己抗体が示されている他の自己免疫 疾患
PCNA	2-7%	N/A
Ro/SS-A	24-60%	シェーグレン症候群、新生児ループス症候群
U1-snRNP 68/70	12-28%	混合性結合組織病
U1-snRNP A	13-23%	混合性結合組織病

表 2 健常人およびSLE患者サンプルの抗体レベルをテストするのに使用した抗原。組換え抗原はSurmodicsから購入しました。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
A	Biot. La...																								
B																									
C	Blocking	Normal SLE																							
D	Streptav...																								
E																									

図2 SLE患者由来血清中の抗体をスクリーニングするのに使用したCompass for Simple Westernのプレートマップ。

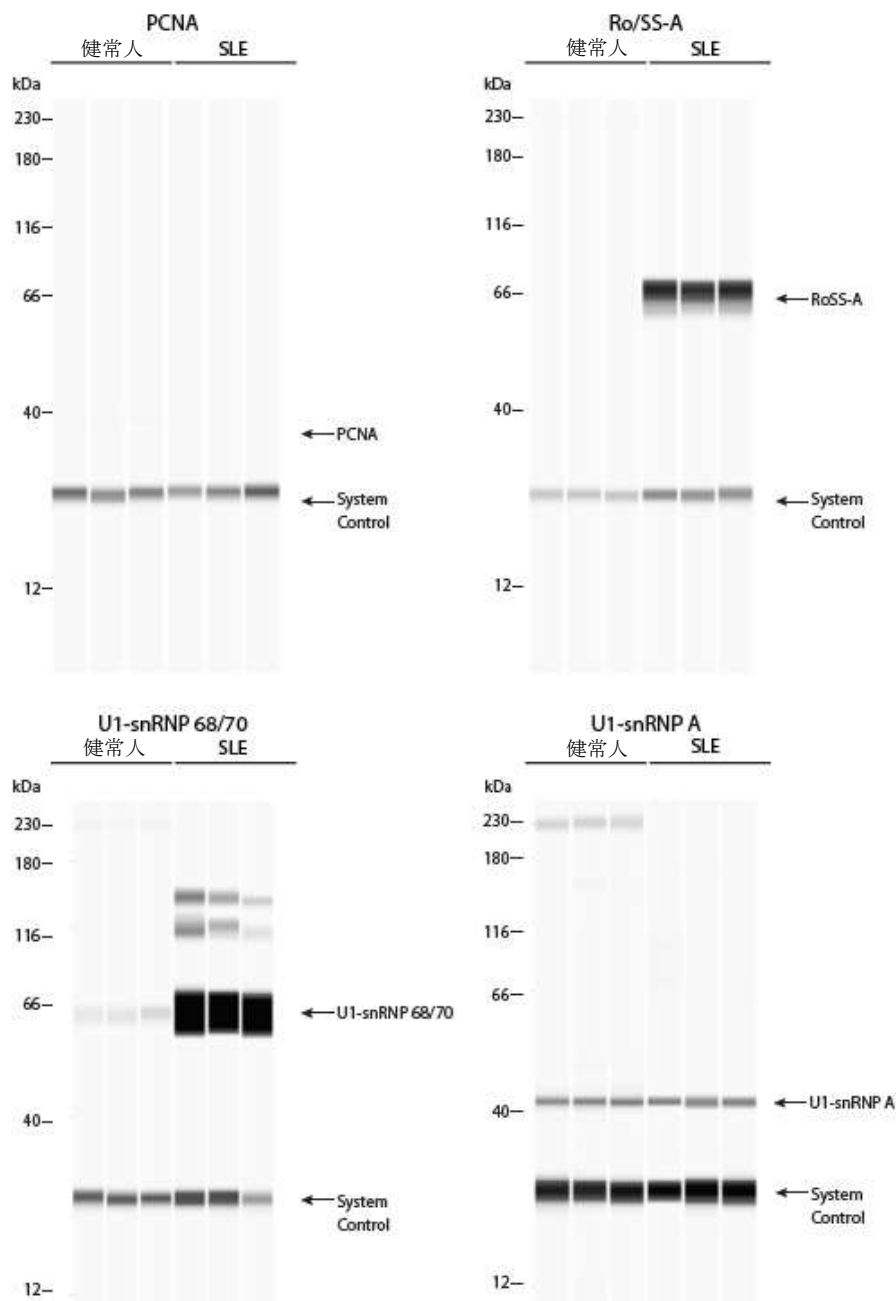


図3 健康人およびSLE患者由来の血清サンプルをAntibody Diluent 2で1:10に希釈し、SLE自己抗体に対する既知の抗原を固定済のキャピラリー内に1次抗体インキュベーションステップでロードした。どちらの血清サンプルにもPCNAの自己抗体はなかった(左上)が、両方のサンプルで同量のU1-snRNP Aを検出した(右下)。SLE患者にのみRo/SS-A自己抗体が存在(右上)し、SLE患者の血清は健康人(左下)のそれと比較して40倍多いU1-snRNP 68/70を検出した。

Wes用のLuminol/peroxide混合溶液はいつも通り準備し、E列に入れました。

次に、測定を開始する前に、Simple WesternのCompassにデフォルトのアッセイパラメータをロードしました。12-230kDa分離マトリックスを使用して6本のキャピラリーで抗原を泳動しました。3本のキャピラリー内でその抗原を健常者由来の血清と反応させ、残りのキャピラリーで3回の反復測定データが得られるようにSLE患者由来の血清と反応させました(図3)。またCompass for Simple Westernソフトウェアが測定間のデータを自動で標準化できるように、29kDaのSystem Controlでマルチプレックス^dしました。

SLE自己抗体の検出

PCNAに対する自己抗体は健常者およびSLE患者由来サンプルのいずれでも検出されず、SLE患者サンプルのみにRo/SS-A自己抗体が存在していました。またSLE患者のサンプルには、健常者のそれと比較して40倍以上の

U1-snrNP 68/70が含まれていしましたが、U1-snrNP Aはどちらも同等レベルでした(表3)。データは3回取得され、すべてのCVは10.8%未満であり再現性は非常に高いものでした。

PCNAの結果と健常者のRo/SS-Aのデータが偽陰性ではないことを確認するために、Simple Western Total Protein Assayで、キャピラリー壁に捕捉された抗原量を3回測定しました(図4)⁴。このアッセイでは、固定した0.02mg/mLの抗原をビオチンでラベルし、二次抗体インキュベーション段階でstreptavidin-HRPで検出するので、十分な化学発光シグナルを得ることができます。各キャピラリー内の抗原量のCVは5.7%未満であり(表4)、健常人およびSLE患者由来血清サンプルにはPCNAに対する自己抗体がないことを確認しました。230kDa付近に見られる余分なバンドは230kDaの蛍光スタンダード由来のバンドで、ビオチン化後アッセイの検出限界内で検出されます。

抗原		Ro/SS-A		u1-snrNP 68/70		u1-snrNP A	
血清由来	健常人	SLE	健常人	SLE	健常人	SLE	
ピーク面積の平均	N/A	60524.1	9065.4	364559.6	5048.0	3437.0	
標準偏差	N/A	6528.3	983.3	35255.5	334.4	153.6	
%CV(変動係数)	N/A	10.8	10.8	10.8	6.6	4.5	

表 3. 健常者およびSLE患者由来の血清で検出された自己抗体によるピーク面積の定量および統計結果の要約。Compass for Simple Westernは、ピーク面積を29kDaのSystem Controlで標準化しアッセイ内%CVを計算しましたが、これらはすべて10.8%以下でした。

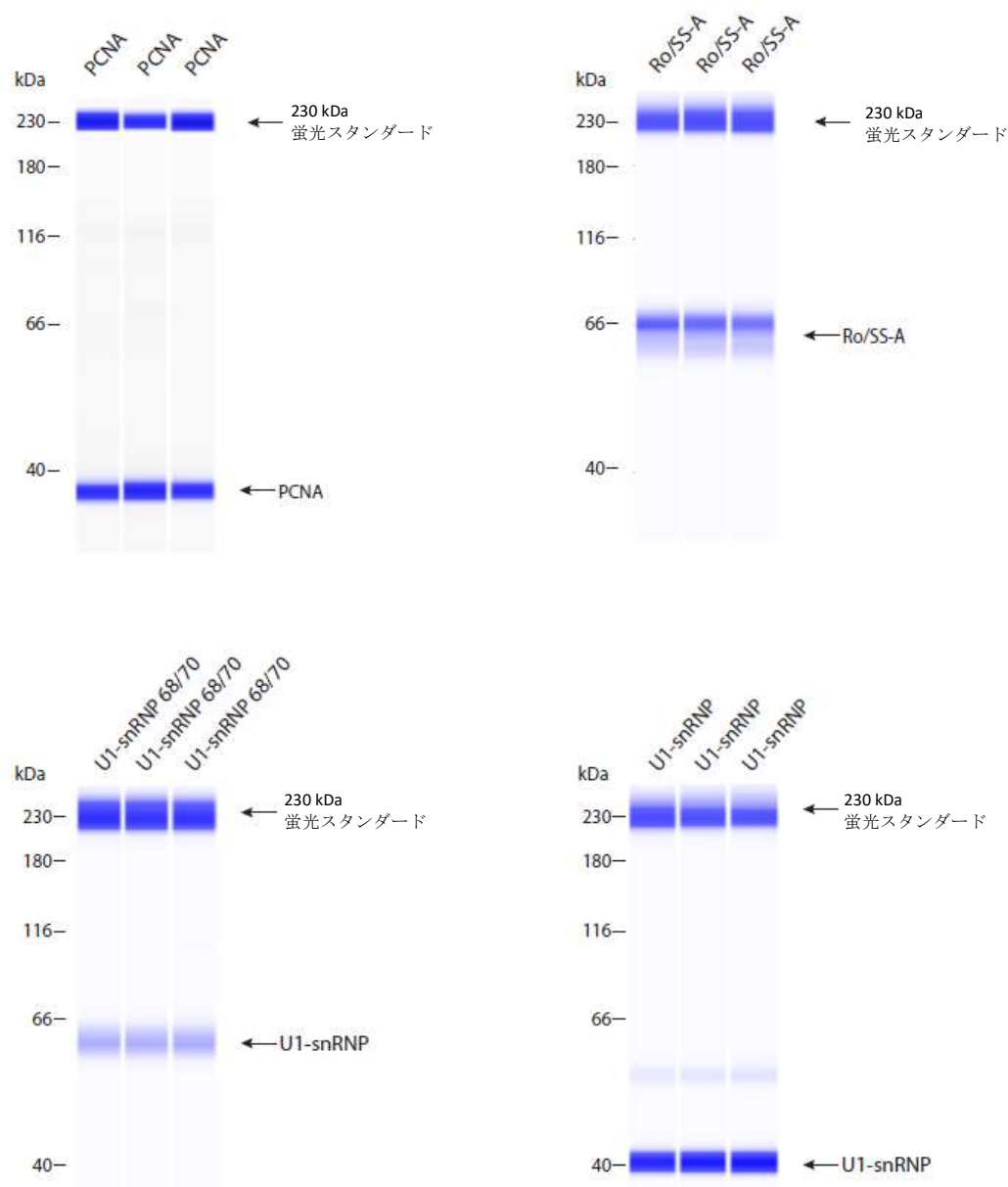


図4 血清中に自己抗体が検出されなかった場合でも、組換え抗原がキャピラリーの内壁に固定されていることを確認するために、Simple Western Total Proteinアッセイをポジティブコントロールとして使用した。PCNA: 左上、Ro/SS-A: 右上、U1-snRNP 68/70: 左下、U1-snRNP A: 右下。

	PCNA	Ro/SS-A	u1-snrNP 68/70	u1-snrNP A
ピーク面積の平均	18502.7	18047.0	8599.5	18752.7
標準偏差	530.5	342.8	144.6	1075.8
% CV(変動係数)	2.9	1.9	1.7	5.7

表 4. キャピラリー内に結合した抗原に対するピーク面積の定量と統計結果の要約。Compass for Simple Westernソフトウェアは、3つのデータポイントのピーク面積を平均し、CVを計算しましたが、これらはすべて5.7%以下でした。

期待通りの精度

イムノアッセイは常に再現性があるとは限りません。自動化されたWesでは、従来法のウェスタンブロットで起こりうるユーザーによるバラツキが大幅に削減されていますが、血清中の抗体検出アプリケーションでも同様の堅牢性が確認されるかテストしました。ここでは、同じサンプルをWesで別の日に3回測定し、ピーク面積を29kDaのSystem Controlで標準化して、日々の変動を

除去しました(図5)。その結果は、そのアッセイ間CVは14%以下であることを示しました。このような良好な精度により、毎日一貫したデータを確実に取得できます(表5)。

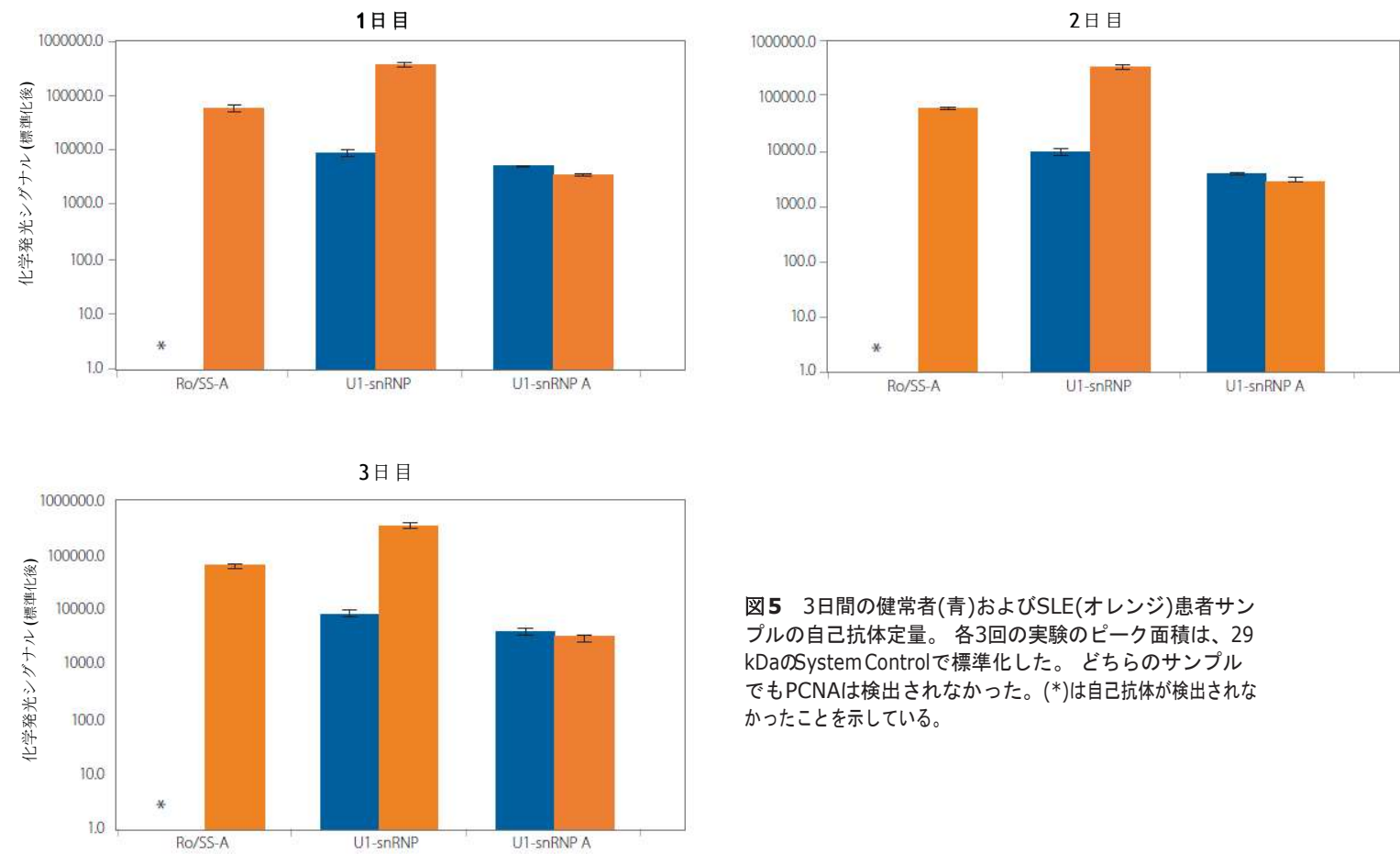


図5 3日間の健常人(青)およびSLE(オレンジ)患者サンプルの自己抗体定量。各3回の実験のピーク面積は、29 kDaのSystem Controlで標準化した。どちらのサンプルでもPCNAは検出されなかった。(*)は自己抗体が検出されなかったことを示している。

	Ro/SS-A		u1-snrNP 68/70		u1-snrNP A	
	健常人	SLE	健常人	SLE	健常人	SLE
ピーク面積の平均	N/A	65116.9	9139.8	368115.0	4319.1	3644.1
標準偏差	N/A	6698.3	1041.2	32647.0	605.3	440.9
%CV(変動係数)	N/A	10.3	11.4	8.9	14.0	12.1

表5 3日間にわたって健常人およびSLE患者血清で検出した自己抗体のピーク面積の定量と統計結果の要約。Compass for Simple Westernは、ピーク面積を29kDaのSystem Controlで標準化し、アッセイ間CVを計算しましたが、これらはすべて14%以下でした。

まとめ

このようにWesのSimple Westernアッセイを行うことで、すべての血清中の抗体を迅速かつ簡単に測定することができます。完全に全自動化されており、手間がかからず、もうメンブレンの短冊を作る必要はありません。Simple Westernアッセイでは従来法のウェスタンブロットと同等のデータが得られます^aが、データをより早く得られるだけでなく、実際のハンズオン時間を少なくとも1/8~10に短縮でき、また1データポイントあたりのサンプル使用量も少なくなります。自動化されることで、より精度の高いデータを得ることができます。

これらを実証するために、健康者および全身性エリテマトーデス(SLE)患者の既知抗原に対するSLE自己抗体のレベルを測定しました。Simple Western Total Proteinアッセイを使用して、キャピラリー内の抗原の存在を確認することで偽陰性の可能性を排除し、そしてSimple Westernの標準イムノアッセイを一部変更することで血清中の抗体レベルを測定しました。平均して、各プレートの準備にわずか30分しか要せず、3時間後に結果を得ることができました。テストした4つの抗原のうち、PCNAはいずれのサンプルでも検出されませんでした。これはSLE患者全体の2~7%にしか見られないため、驚くことではありません。Ro/SS-Aは全身性エリテマトーデス患者サンプルでのみ検出され、その患者サンプルでは通常のサンプルと比較して40倍以上のU1-snRNPが検出され、両サンプルで同等のレベルのU1-snRNP Aを検出しました。また同じ測定を異なる日に3回測定した結果、アッセイ内CVが10.8%以下、アッセイ間CVが14%以下であったため、非常に高い精度でデータを得ることができました。

参考文献

1. Production of recombinant *Salmonella* flagellar protein, FlgK, and its uses in detection of anti-*Salmonella* antibodies in chickens by automated capillary immunoassay, HY Yeh, KV Serrano, AS Acosta, RJ Buhr, *Journal of Microbiological Methods*, 2016;122:27-32.
2. Autoantibody explosion in system lupus erythematosus: More than 100 different antibodies found in SLE patients, Y Sherer, A Gorstein, MJ Fritzler, Y Shoenfeld, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2004; 34(2):501-537.
3. Improved Multiplexing with Simple Western Using a 20X Rabbit HRP Conjugate, ProteinSimple Technical Note.
4. Total Protein Analysis the Simple Western Way, ProteinSimple Application Note.

用語説明

^a全身性エリテマトーデス：なんらかの原因によって種々の自己抗体を産生し、そのため自分の正常な細胞を攻撃して全身のさまざまな臓器に炎症や組織障害が生じる自己免疫性疾患のひとつ。

^bSLEDAIスコア：SLEDAIスコアは24の症状・臓器障害などの臨床所見が点数化されており、点数を合計してスコア化することで患者さんの状態を評価する評価法のひとつ。

^cReady-to-use：通常、希釈せずにそのまま使用する試薬。

^dマルチプレックス：複数抗体で複数標的を同時に検出すること。