



<抗体職人プロジェクト概要シート>

1、作製する抗体

全長が9アミノ酸のペプチドの内、6番目のSerがリン酸化されたペプチド抗原には結合するが、リン酸化されていないペプチド抗原には結合しない抗体。

2、設定する抗原

抗原ペプチド(9aa)のN末あるいはC末端にCysを付加したペプチドを合成する。pSer:リン酸化Ser

リン酸化ペプチド: $\text{NH}_2\text{-}$ pSer +Cys-COOH <パニング及びELISAで使用>

リン酸化ペプチド: $\text{NH}_2\text{-Cys+}$ pSer -COOH <パニングおよびELISAで使用>

非リン酸化ペプチド: $\text{NH}_2\text{-}$ Ser +Cys-COOH <パニング及びELISAで使用>

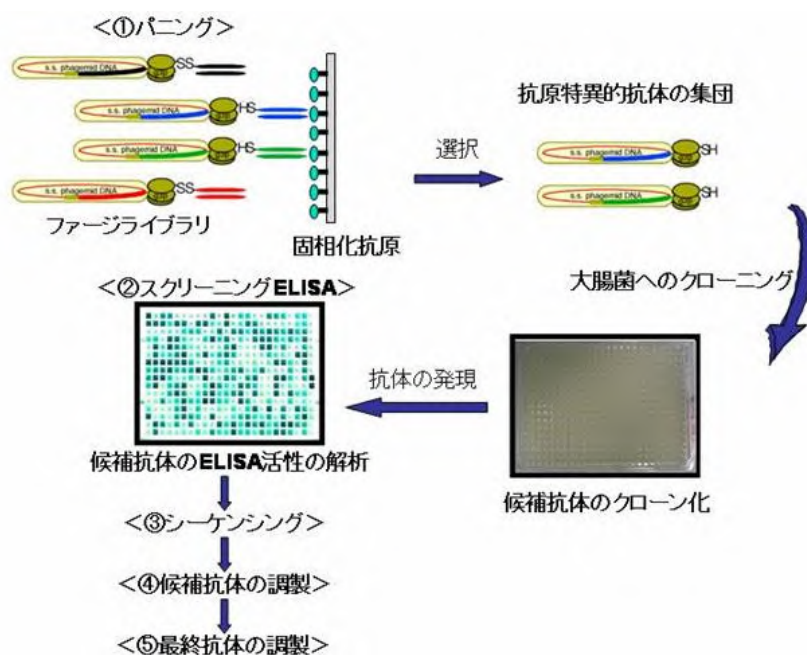
非リン酸化ペプチド: $\text{NH}_2\text{-Cys+}$ Ser -COOH <パニングおよびELISAで使用>

上記ペプチドの一部を用いて以下のコンジュゲートを作製する。

- 抗原ペプチド-BSA: リン酸化ペプチドのC末端システインを用いてキャリアタンパク質であるBSAにチオールカップリングしたもの。
- 抗原ペプチド-TRF: リン酸化ペプチドのN末端システインを用いてキャリアタンパク質であるヒトトランスフェリン(TRF)にチオールカップリングしたもの。
- 陰性対照抗原ペプチド-BSA: 非リン酸化ペプチドのC末端システインを用いてキャリアタンパク質であるBSAにチオールカップリングしたもの。
- 陰性対照抗原ペプチド-TRF: 非リン酸化ペプチドのN末端システインを用いてキャリアタンパク質であるヒトトランスフェリン(TRF)にチオールカップリングしたもの。

キャリアタンパク質の異なる2種類のコンジュゲートを使用することにより、キャリアタンパク質に依存せず、抗原ペプチド特異的な抗体の取得を目指します。

3、抗体作製の流れ



< パニング >

抗体提示ファージライブラリ (HuCAL PLATINUM) から、リン酸化抗原ペプチドに結合するファージを選択する。リン酸化抗原ペプチドへの反応と、反応しないファージの PBS 及び PBST による洗浄、反応したファージの回収と増幅を 3 回繰り返す。

第 1 ラウンド： 抗原ペプチド-BSA を抗原として使用する。

ブロッカーとして陰性対照抗原ペプチド-BSA を使用する。

第 2 ラウンド： 抗原ペプチド-TRF を抗原として使用する。

ブロッカーとして陰性対照抗原ペプチド- TRF を使用する。

第 3 ラウンド： 第 1 ラウンドに同じ。

オプションとして、陰性対照抗原をブロッカーとして使用し、より特異的な抗体の取得を目指します。

< スクリーニング ELISA >

のパニングで得られたファージの抗体遺伝子を大腸菌で発現させ、得られた抗体クローンの抗原に対するスクリーニングを、以下の 4 枚のプレートを用いた ELISA で行う。

プレート 1： 抗原ペプチド-BSA を固定する。

プレート 2： 抗原ペプチド-TRF を固定する。

プレート 3： 陰性対照抗原ペプチド-BSA を固定する。

プレート 4： 陰性対照抗原ペプチド- TRF を固定する。

プレート 1 と 2 において ELISA 陽性 (ELISA シグナルがプレート 3 と 4 に対して 3 倍以上) となるクローンをスクリーニングする。

オプションとして、陰性対照抗原を固定したプレートを用いたスクリーニングを行います。

< シーケンシング >

のスクリーニング ELISA にて陽性となった抗体クローンは、クローンに重複がある可能性があるため、ランダムに選択したクローンのシーケンシングを行いクローンに重複がないように選定する。

通常のサービスでは 10 クローンのシーケンシングを行います。追加のシーケンシングをご希望の場合は 10 クローンにつき定価 5 万円（税別）で承ります。

< 候補抗体の調製 >

のシーケンシングにてそれぞれ独立したクローンであることが確認された抗体クローンを大腸菌で発現させ、精製したものを候補抗体とする。得られた候補抗体（最大 5 クローン）は、抗原への反応性を、以下の ELISA にて検証する（QC ELISA）。

プレート 1：抗原ペプチド-BSA を固定する。

プレート 2：抗原ペプチド-TRF を固定する。

プレート 3：陰性対照抗原ペプチド-BSA を固定する。

プレート 4：陰性対照抗原ペプチド-TRF を固定する。

オプションとして、陰性対照抗原に対する ELISA 反応性の検証を行います。

候補抗体の納品基準

プレート 1 と 2 に対する ELISA シグナルが、プレート 3 と 4 に対して 5 倍以上であること。

納品させていただく候補抗体のフォーマット

2 価の Myc-His タグ付きヒト Fab 抗体

（ お選びいただけます <http://www.genefrontier.com/products/kotai/formats.html> ）

《パニング開始から候補抗体の納品までは、最短で 7 週間となります。》

5 クローンを超える候補抗体が得られた場合、候補抗体の追加をご希望の場合は 1 クローンにつき 5 万円（税別、200µg ずつ）で承ります。

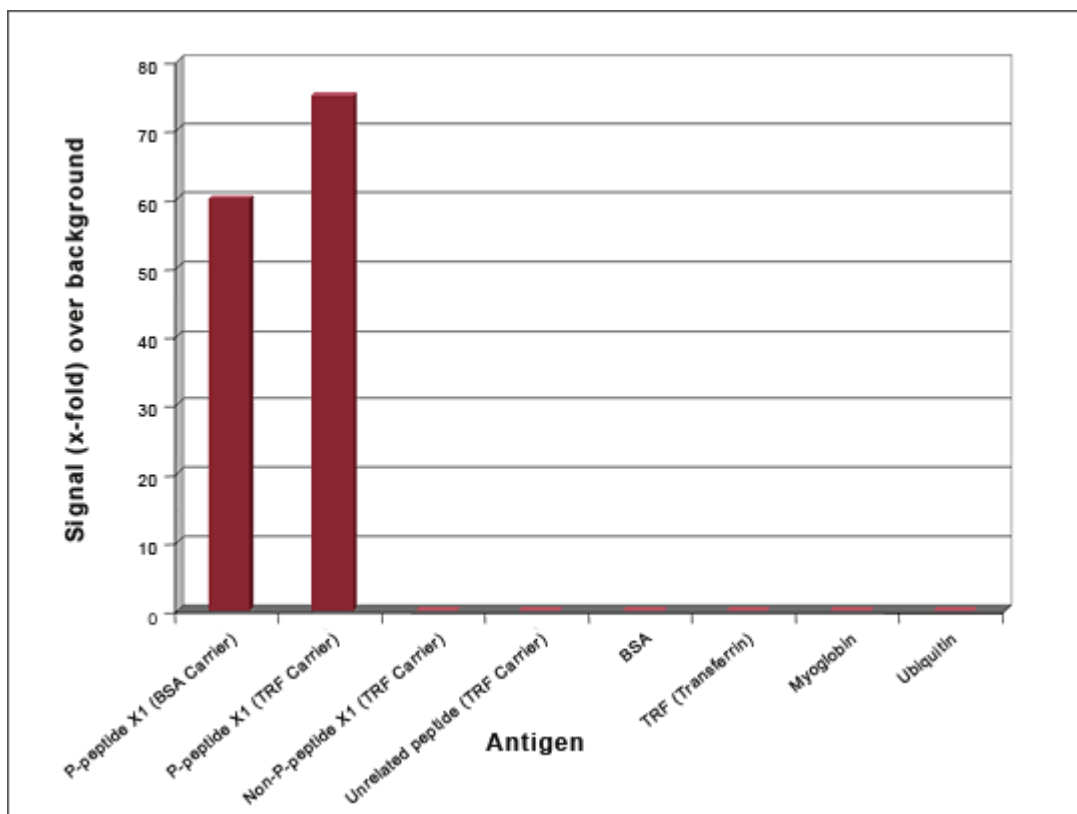
< 最終抗体の調製 >

の候補抗体の中から選択いただいた 1 クローン（最終抗体）を、1mg 追加で発現、精製し、最終抗体の納品を以てサービスを完了とする。

最終抗体納品と同時に納品させていただきます追加注文分の最終抗体は、1mg あたり 7 万円（税別）で承ります。

最終抗体クローンは 5 年間保存いたしますので、その間、何度でも追加調製が可能です。追加調製をご用命いただく場合は 15 万円/mg（税別）で承ります（2mg 以降は 7 万円/mg（税別））。

4、QC ELISA の結果



リン酸化抗原ペプチド (P-peptide X1) には結合し、非リン酸化陰性対照抗原ペプチド (Non-P-peptide X1) やキャリアタンパク質 (BSA、TRF) には結合しない抗体が得られた。