



<抗体職人プロジェクト概要シート>

1、作製する抗体

10 アミノ酸ペプチド抗原には結合するが、8 アミノ酸ペプチド抗原には結合しない抗体。

2、設定する抗原

以下の抗原ペプチドを合成する。

①10aa 抗原ペプチド： NH₂- ○○●●●●●●●●●●+C-COOH <パニング及び ELISA で使用>

②8aa 抗原ペプチド： NH₂- ●●●●●●●●●●+C-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。

a) 10aa 抗原ペプチド-BSA：10aa 抗原ペプチドの 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。

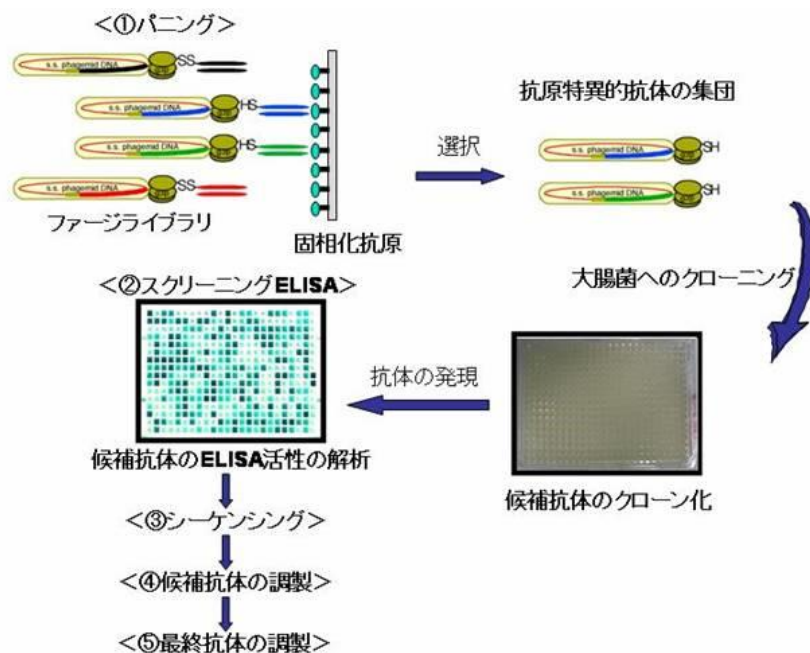
b) 10aa 抗原ペプチド-Trf：10aa 抗原ペプチドの C 末端システインを用いてキャリアタンパク質であるヒトトランスフェリン (Trf) にチオールカップリングしたもの。

c) 8aa 抗原ペプチド-BSA：8aa 抗原ペプチドの 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。

d) 8aa 抗原ペプチド- Trf：8aa 抗原ペプチドの 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す。

3、抗体作製の流れ



<①パニング>

抗体提示ファージライブラリ (HuCAL PLATINUM) から、10aa 抗原ペプチドに結合するファージを選択する。10aa 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： 10aa 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 8aa 抗原ペプチド-BSA を使用する。
- 第 2 ラウンド： 10aa 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 8aa 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す。

<②スクリーニング ELISA>

①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： 10aa 抗原ペプチド-BSA を固定する。
- プレート 2： 10aa 抗原ペプチド- Trf を固定する。
- プレート 3： 8aa 抗原ペプチド-BSA を固定する。
- プレート 4： 8aa 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う。

<③シーケンシング>

②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する。

<④候補抗体の調製>

③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： 10aa 抗原ペプチド-BSA を固定する。

プレート 2： 10aa 抗原ペプチド- Trf を固定する。

プレート 3： 8aa 抗原ペプチド-BSA を固定する。

プレート 4： 8aa 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 反応性の検証を行う。

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

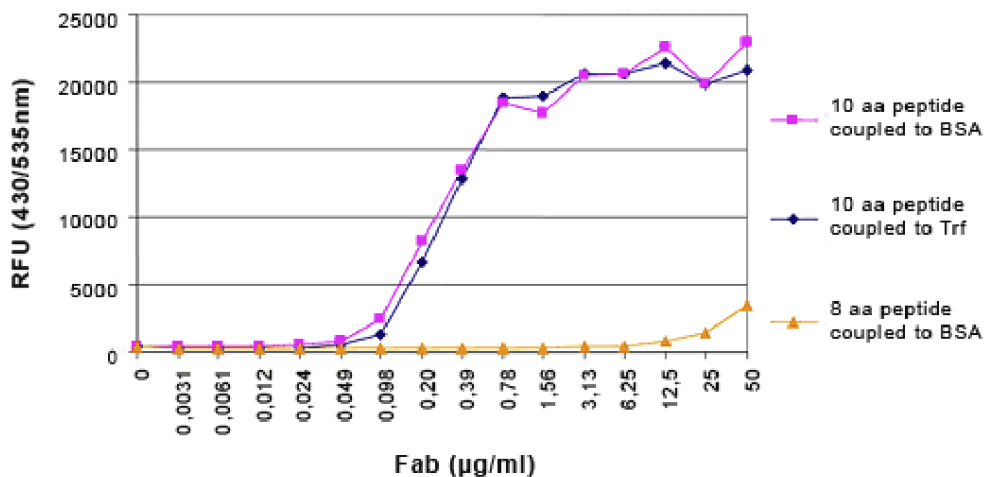
(※お選びいただけます <http://www.genefrontier.com/products/kotai/formats.html>)

「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最終抗体の調製>

④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。

4、結果



10 アミノ酸ペプチド抗原には結合し、8 アミノ酸ペプチド抗原には結合しない抗体が得られた。