

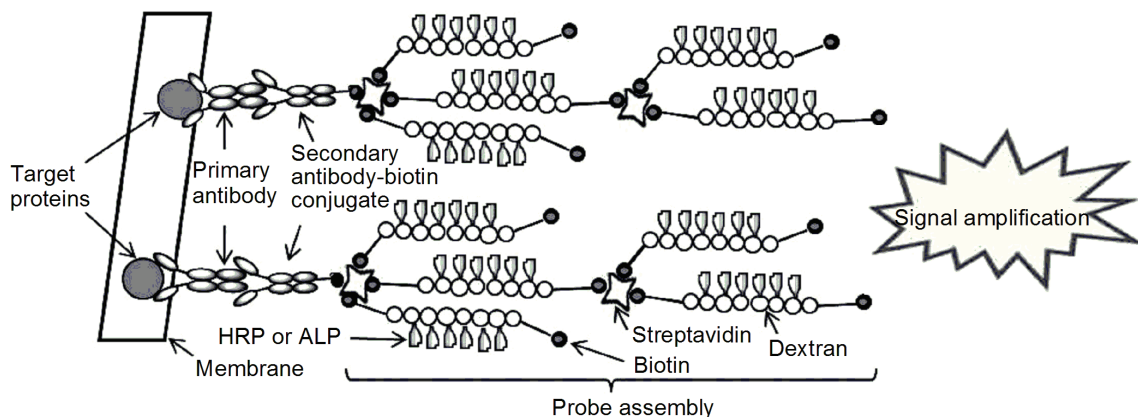
# Enzyme-Labeled Macromolecular Probes for Sensitive Chemiluminescence Detection of Proteins on a Solid-Phase Membrane (固相膜上のタンパク質の高感度化学発光検出に用いる 酵素標識高分子プローブ)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 Md. Golam Azam

## [目的]

化学発光法は、高い感度を有することや放射性同位体を必要としないことなどから、免疫アッセイにおいて汎用されている検出法であり、疾病診断や環境測定など幅広い分野で利用されている。特に、固相膜やプロテインチップ上での化学発光検出は、一回の測定でハイスループットな標的分子の分析を可能にする。しかし、典型的な酵素標識化学発光プローブは、通常1分子の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) あるいはアルカリフォスファターゼ (ALP) で標識されているため、得られる検出シグナルは限られている。従って、従来法では検出できない極微量の検体を検出できる、より高感度なプローブの開発が必要とされている。

本研究では、高分子多糖であるデキストランに、ビオチン及び酵素を多数結合した、化学発光性高分子プローブを合成した。これらのプローブは、標的分子を認識したビオチン化抗体にストレプトアビジンを介して結合し、更にストレプトアビジン存在下で分子集合体を形成する (Fig. 1)。そのため、多数の HRP 或いは ALP によって発光反応が触媒され、標的分子由来の検出シグナルが大幅に増幅されると期待できる。そこで、デキストランに HRP を結合した Dex-Bio-HRP 並びに ALP を結合した Dex-Bio-ALP を設計し、導入する酵素及びビオチンの量を変化させた種々のプローブを合成した。これらのプローブを用いて、ナイロン膜に吸着した微量のビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (b-Ab) の化学発光画像検出を行った。更に、Dex-Bio-HRP をマウスリコンビナントプリオンタンパク質 (mrPrP) の高感度化学発光検出に応用し、その検出感度を一般的なビオチン化 HRP (b-HRP) を用いた手法と比較した。



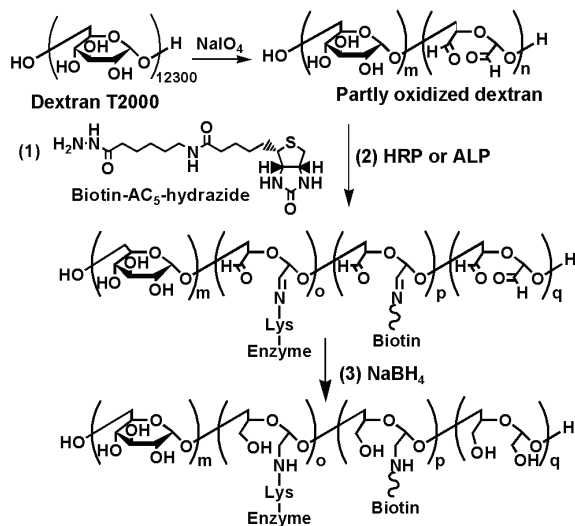
**Fig. 1.** Schematic principle for the CL detection of target proteins on a solid-phase membrane using HRP or ALP and biotin-labeled dextran probe.

## [結果及び考察]

### 高分子プローブの合成

平均分子量が 200 万のデキストランを基本骨格とし、過ヨウ素酸酸化によってアルデヒド基を形成後、異なる量のビオチン-AC<sub>5</sub>-ヒドラジドと HRP 或いは ALP をデキ

ストラン骨格に共有結合させた (Scheme 1)。Dex-Bio-HRP 及び Dex-Bio-ALP の純度は、それぞれゲルろ過液体クロマトグラフィー (GFLC) 及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって確認した。Dex-Bio-HRP に含まれる HRP 量は、GFLC で得られた Dex-Bio-HRP のピーク面積から算出した。Dex-Bio-ALP に含まれる ALP 量は、275 nm における ALP 及び Dex-Bio-ALP の吸光度から求めた。また、プローブに含まれるビオチンの量は、4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid を用いたアビジン結合の競合阻害法によって計算した。これらの結果から求めた各種プローブの組成式を Table 1 に示す。Dex-Bio-HRP では合成に使用した HRP 量の約 40%が、Dex-Bio-ALP では合成に使用した ALP 量の約半分が、それぞれのプローブと共有結合していることが明らかになった。一方、プローブに結合したビオチンの量は、プローブに結合した HRP や ALP の量の増加に伴い減少することが分かった。しかし、合成時に使用するビオチンの量を増やすことで、デキストランに結合した HRP や ALP の量を変化させずに、より多くのビオチンをプローブに導入できることを見出した。



**Scheme 1.** Synthetic route to Dex-Bio-HRP and Dex-Bio-ALP probes.

**Table 1** List of synthesized macromolecular probes.

Probe label	HRP <sup>a</sup>	ALP <sup>a</sup>	Biotin <sup>a</sup>	Probe composition
HRP	20	-	100	Dex-Bio <sub>50</sub> -HRP <sub>9</sub> <sup>b</sup>
	100	-	100	Dex-Bio <sub>15</sub> -HRP <sub>40</sub> <sup>b</sup>
	100	-	400	Dex-Bio <sub>125</sub> -HRP <sub>45</sub> <sup>b</sup>
	100	-	1000	Dex-Bio <sub>210</sub> -HRP <sub>42</sub> <sup>b</sup>
	100	-	1000	Dex-Bio <sub>175</sub> -HRP <sub>36</sub> <sup>c</sup>
ALP	-	20	100	Dex-Bio <sub>70</sub> -ALP <sub>10</sub> <sup>c</sup>
	-	50	100	Dex-Bio <sub>55</sub> -ALP <sub>31</sub> <sup>c</sup>
	-	50	500	Dex-Bio <sub>120</sub> -ALP <sub>28</sub> <sup>c</sup>
	-	50	750	Dex-Bio <sub>155</sub> -ALP <sub>27</sub> <sup>c</sup>
	-	50	750	Dex-Bio <sub>155</sub> -ALP <sub>27</sub> <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Molar ratio of HRP, ALP or biotin-AC<sub>5</sub>-hydrazide to dextran used for the synthesis, <sup>b</sup>non-reduced, <sup>c</sup> reduced.

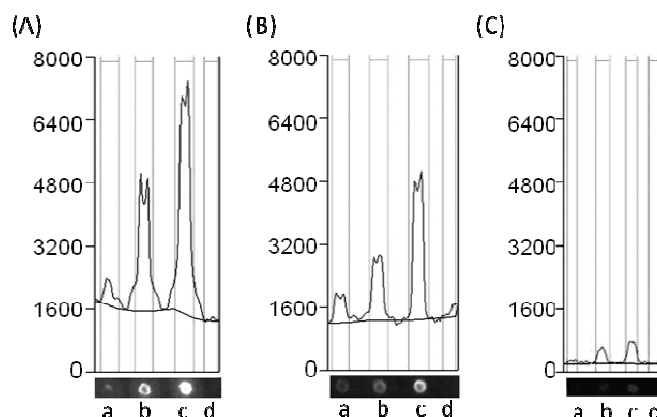
### Dex-Bio-HRP を用いた化学発光検出

デキストランに共有結合した HRP の酵素活性を調べるために、ナイロン膜に Dex-Bio-HRP を吸着させて化学発光検出を行った。プローブに含まれる HRP 量の増加に従って、強い化学発光を与えた。40~45 分子の HRP を含む Dex-Bio-HRP では、ナイロン膜上の約 12.5 amol のプローブが検出可能であった。また、等モルの HRP 自体の化学発光と比較して、これらプローブは約 40 倍強い化学発光強度を示した。これらの結果より、プローブに導入した HRP は酵素活性を保持しており、結合した HRP の数に比例して化学発光強度が増強されることが分かった。

次に、免疫アッセイにおける Dex-Bio-HRP の有用性を評価するために、ナイロン膜に吸着させた b-Ab の検出を行った。その結果、b-Ab 量の増加に伴い、得られる化学発光強度は増加した。非還元型プローブである Dex-Bio<sub>210</sub>-HRP<sub>42</sub> と還元型プローブである Dex-Bio<sub>175</sub>-HRP<sub>36</sub> を比較した場合、どちらも同程度の検出感度を示し、膜上 b-Ab の検出下限は 1.5 fmol であった。この 2 種類のプローブを用いて、ナイロン膜上に吸着させた mrPrP の高感度化学発光検出を試みた (Fig. 2A, B)。その結果、25~400 fmol/spot の mrPrP 量の範囲において、mrPrP 量と化学発光強度との間に

良好な直線性が得られた。一方、非標的タンパク質を検出しなかったこと、市販の b-HRP より 10 倍強い検出感度を与えたことから (Fig. 2C)、本研究で合成したプローブが高感度免疫アッセイに応用可能であることが示された。

**Fig. 2.** Comparison of CL-imaging detection of mrPrP on a nylon membranes using-(A) Dex-Bio<sub>210</sub>-HRP<sub>42</sub> (non-reduced), (B) Dex-Bio<sub>175</sub>-HRP<sub>36</sub> (reduced) and (C) b-HRP. Proteins (amount/spot): a = mrPrP (100 fmol), b = mrPrP (200 fmol), c = mrPrP (400 fmol), d = BSA (2000 fmol).



### Dex-Bio-ALP を用いた化学発光検出

ALP の化学発光反応は数時間に渡って持続するため、ALP を用いる一般的な免疫アッセイでは、この発光を長時間積算することで高感度検出を行う。本研究ではまず、Dex-Bio-ALP による迅速な化学発光検出を実現するために、ALP による 1,2-ジオキセタン基質の発光反応を、従来の持続型 (glow type) から瞬発型 (flash type) へ変換した。ALP 反応溶液の pH を 13.0 にすることで、約 2 分後に最大の発光を示し、2 分間の積算発光強度は通常の ALP 反応 (pH=9.5) と比較して 10 倍高かった。この条件でナイロン膜に吸着させた Dex-Bio-ALP の化学発光を評価したところ、27-31 分子の ALP を含むプローブは、等モルの ALP 自体の化学発光と比較して 14-20 倍の発光強度を示した。膜上 Dex-Bio-ALP の検出下限は約 1 amol であり、Dex-Bio-HRP より 10 倍低濃度のプローブが検出可能であった。最も強い発光強度を示した Dex-Bio<sub>120</sub>-ALP<sub>28</sub> を用いてナイロン膜上の b-Ab を検出したところ、約 1 fmol の b-Ab が検出可能であることが分かった。

#### [結論]

本研究では、デキストランに HRP 或いは ALP を多数結合した化学発光性高分子プローブを開発し、Dex-Bio-HRP が従来法より 10 倍高感度に mrPrP を検出できること、Dex-Bio-ALP が Dex-Bio-HRP より更に高感度に b-Ab を検出できることを示した。これらのプローブは、迅速かつ高感度な免疫アッセイに応用可能であるだけでなく、本研究で採用した合成法は、様々な酵素を有する機能性高分子の合成法として有用であると考えられる。

#### [基礎となった学術論文]

1. Azam M.G., Shibata T., Kabashima T., Kai M.: Sensitive chemiluminescence detection of prion protein on a membrane by using peroxidase-labeled dextran probe. *Anal. Sci.*, **27**(7), 715-720 (2011).
2. Azam M.G., Shibata T., Kabashima T., Kai M.: Alkaline phosphatase-labeled macromolecular probe for sensitive chemiluminescence detection of proteins on a solid-phase membrane. *Anal. Bioanal. Chem.*, **401** (Online: 15 July 2011)
3. Krawczyk T., Kondo M., Azam M.G., Zhang H., Shibata T., Kai M.: Alginate-based macromolecular chemiluminescent probe for universal protein assay on a solid-phase membrane. *Analyst*, **135**, 2894-290 (2010).