

MUNANA を用いた免疫ビーズ上へのウイルス粒子捕捉効率評価

Evaluation of virion capturing efficiency of immunobeads using MUNANA

産総研¹ ○芦葉 裕樹¹, 安浦 雅人¹, 藤巻 真¹

AIST¹, ○Hiroki Ashiba¹, Masato Yasuura¹, Makoto Fujimaki

E-mail: h.ashiba@aist.go.jp

イムノセンサの検出性能の理論検討において、ある測定条件においてどれだけの効率で標的物質が捕捉されるかを評価するため、捕捉分子（抗体等）と標的物質の間の解離定数 K_D を知ることが重要である。 K_D は一般に表面プラズモン共鳴センサなどの表面反応系で測定される。一方、筆者らが開発した外力支援近接場照明バイオセンサ[1]のような空間反応系では、表面反応系とは分子の振る舞いが異なる。加えて、ビーズ上に捕捉分子を固定した免疫ビーズと標的物質の結合の場合は、拡散係数がビーズのサイズに依存するため更に状況が異なる。そのため、免疫ビーズ上での標的物質捕捉効率を評価するためには、標的物質のビーズへの結合量を測定することが必要と考えられる。そこで本研究では、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ(NA)活性の測定に用いられる 4-(methyumbelliferyl)-N-acetylneuraminic acid (MUNANA)を用いて、抗体固定磁性ビーズ上へのインフルエンザウイルス結合量の評価を試みた。

MUNANA とインフルエンザウイルスを混合すると、NA による酵素反応により蛍光分子 4-Methylumbelliferone (4-MU)が生成される。この蛍光強度を検出することでウイルス量が測定される。A 型インフルエンザウイルス(IAV)の不活化抗原に対し、モノクローナル抗 HA マウス抗体 [clone B219M]を固定した直径 1 μm の磁性ビーズを室温で 10 分間または 60 分間反応させた。反応後、磁気分離を行って上清を分取し、残った磁性ビーズを HEPES バッファ中で再分散させた。ビーズ分散液および上清をそれぞれ 200 μM MUNANA 溶液と混合し、37°Cで 60 分間反応させた後、0.2 M 炭酸ナトリウム水溶液を加えて反応停止させた。反応液の蛍光強度はカスタムメイドの蛍光顕微システム（励起波長 405 nm）を用いて測定した。ビーズ分散液の測定結果を Fig. 1 に示す。ウイルス濃度の上昇に伴う蛍光強度の増加が観測され、ビーズ上へのウイルス捕捉を測定できることが確認された。また上清の測定結果より、IAV 濃度 2 $\mu\text{g/mL}$ 、ビーズ濃度 5×10^8 particle/mL のとき 70%以上の IAV が捕捉されていると見積もられた。

[1] Yasuura and Fujimaki, Sci. Rep. 6, p. 39241 (2016).

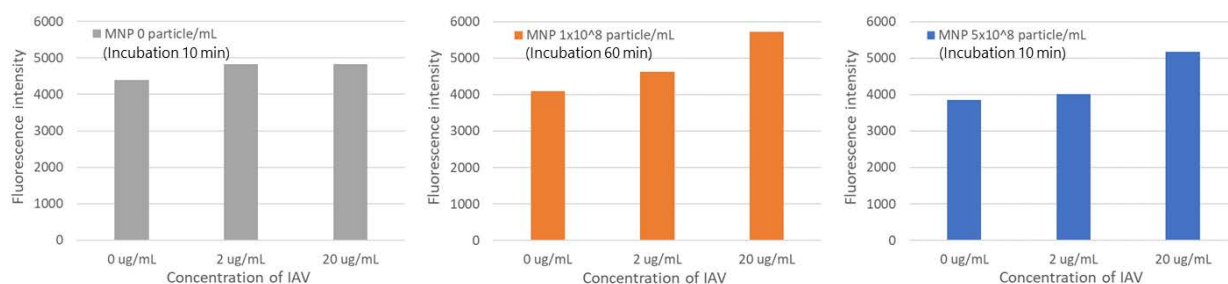


Fig. 1 Fluorescence intensity of immunomagnetic nanoparticles (MNP) reacted with influenza A virus (IAV) and MUNANA.