



# 免疫学的食中毒菌迅速検出法の開発

中野秀雄(名古屋大学大学院生命農学研究科), 森昭博(食品工業技術センター)

## [1] Abstract

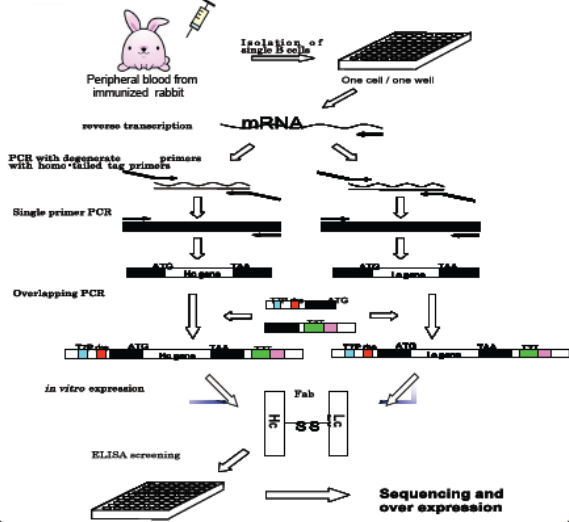
### 【目的】

一細胞RT-PCRと無細胞蛋白質合成系を組み合わせることにより、マウスの脾臓及びヒト末梢血のリンパ細胞からわずか2日で抗体が可能である、SICREX(Single-Cell RT-PCR linked *in vitro* EXpression)法を応用し、各種病原菌(大腸菌、セレウス菌、大腸菌O157、ノロウイルスなど)に対する特異性の高いモノクローナル抗体をウサギ用いて取得すること、および取得した抗体を安価に大量合成する手法を検討する。

### 【方法・結果】

ウサギの抗体遺伝子配列を全て網羅したプライマーを設計し、RecA等を用いて反応条件の最適化を行い、ウサギのB細胞から抗体cDNAを増幅させるウサギの末梢血を用いたSICREX法を確立した。Oleyl-PEG4000を介した細胞膜へのanti-rabbit IgGの固定化とELISAプレートでのpre-selectionを組み合わせることで、IgG型の抗体を分泌する細胞の抗原特異的な濃縮に成功した。

## [1] Rabbit mAb production using SICREX System



## [2] Amplification for Lc and Hc genes from single cells

### Reverse transcription

- Primer: 遺伝子特異的プライマー( 定常領域の高い保存性をもつC末端配列 にアニールする。)
- Enzyme: Superscript III reverse transcriptase

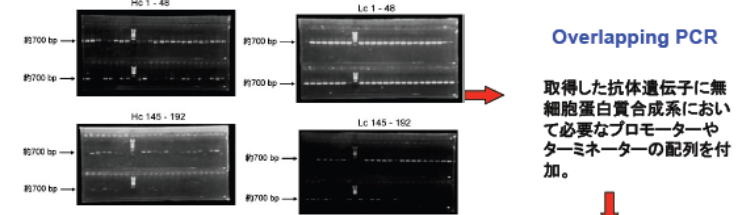
### 1st PCR

- HcとLc kappaをそれぞれ別々に増幅される。
- Enzyme: Taq DNA polymerase
- Primers: 末端にhomotail tagを付加したcDNA特異的プライマー

### 2nd PCR

- Enzyme: Pfu turboDNA polymerase
- Primer: single primer

### The Lc and Hc genes amplification product



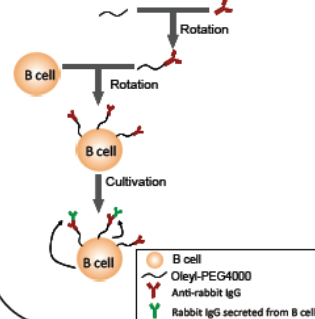
### Overlapping PCR

取得した抗体遺伝子に無細胞蛋白質合成系において必要なプロモーターやターミネーターの配列を付加。

無細胞蛋白質合成系での構築とした。

## [3] Selection of secretion antibody-forming cell

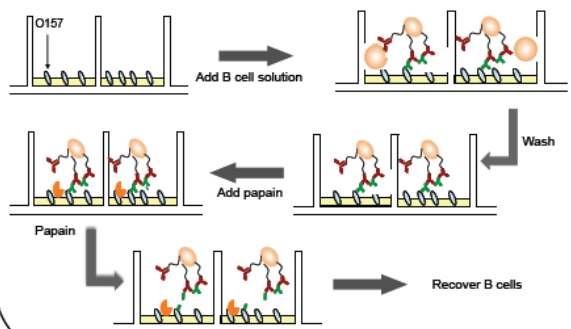
取得した抗体遺伝子を構築として無細胞蛋白質合成系で発現させ、O157に対する結合性を確認する為にELISAを行った。



- Oleyl-PEG4000-NHSとanti-rabbit IgGを共有結合により結合させ、Oleyl-PEG4000-IgGを作製する
  - Oleyl-PEG4000-IgGとリンパ細胞溶液を混合し、細胞膜にanti-rabbit IgGを固定化する
  - 細胞を培養し、IgGを分泌させ、anti-rabbit IgGを介して細胞表面に再結合させる
  - 細胞を培養し、IgGを分泌させ、anti-rabbit IgGを介して細胞表面に再結合させる
- ➔ ELISAプレートを用いた選択的濃縮に供する

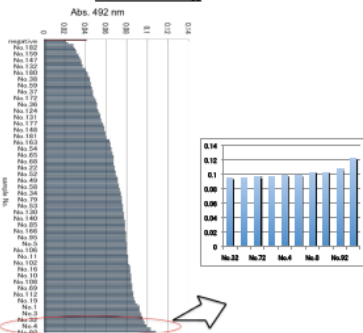
## [4] Pre-selection with ELISA plate

ELISAプレートを用いて、抗原特異的抗体を分泌するB細胞の選択的濃縮を行った。

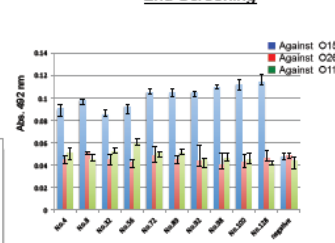


## [5] ELISA Screening

### 1st Screening



### 2nd Screening



青いバーはO157を抗原とした結果、赤いバーはO26、緑色のバーはO111を抗原とした結果である。青いバーと他のバーを比較すると、有意な差が見られることから、再現性が確認されるとともにO157に特異的に結合する抗体を得られたと考えられる。

シグナルが高い10個のクローンについてもう一度ELISAを行い、さらなる検証をした。

## [6] DNA sequence

取得した抗体遺伝子の一部についてシーケンス解析を行い、データベースの配列と比較した。その結果、ウサギIgGの既知配列と最も高い相同性を示した。特に定常領域はほぼ同じであった。

## [7] Conclusion and Future plan

- 大腸菌O157に対して結合活性を有したIgM型、IgG型のウサギモノクローナル抗体を取得することに成功した。
- 無細胞タンパク質合成系で発現させたウサギFab抗体のジスルフィド結合形成能が低いため、よりFab形成効率が高くと期待される一本鎖Fabの形で合成を検討中である。また同時に詳細な親和性測定のため、動物細胞を用いた一過的発現系の利用を予定している。