



# ELISA アッセイから Biacore SPR ベースアッセイへの切り替え

## はじめに

Biacore SPR アッセイは、リアルタイムの活性濃度を自動的にかつ再現性よく測定することができ、従来の ELISA を代替するアッセイです。本稿では、既存の ELISA アッセイを Biacore SPR アッセイに切り替えるための一般的な指針を提示し、それによって ELISA に比べ半分以下の時間で結果が得られることを示します。

## ELISA よりも Biacore SPR アッセイが優れている点

Biacore システムによる濃度測定またはアフィニティー測定の原因は、自動化 ELISA の原理に似ています。どちらのアッセイも固相支持体上で行われ、相互作用パートナーの一方は固定化されており（リガンド）、もう一方は溶液中に遊離しています（アナライト）。

Biacore SPR アッセイは、自動化を導入して時間のかかるウォッシュステップをなくすことで作業効率を上げています。複数のメソッドをキューに入れることができ、センサー表面の準備ステップとアッセイステップをリンクし連続したランを行えるので、自動化レベルが高く作業者が介在する時間が削減されます。図 1 からわかるように、SPR ベースのアッセイは ELISA に比べて半分以下の時間で実施できます。

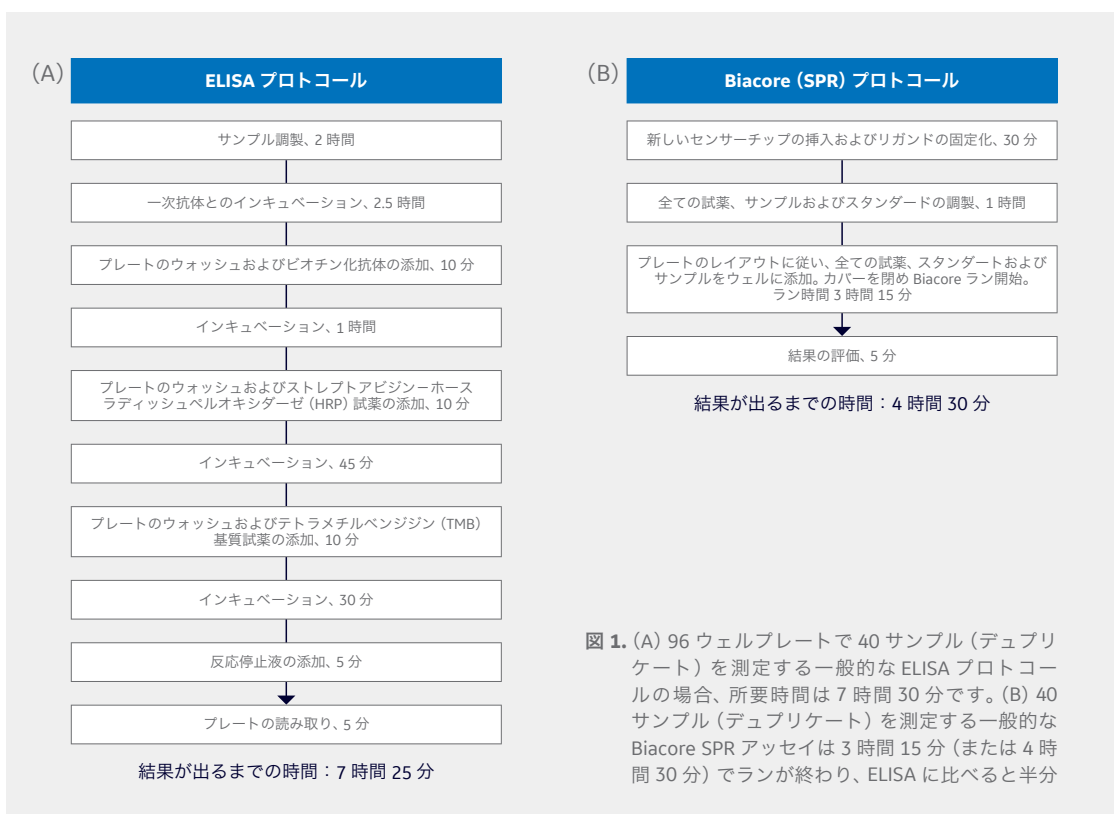


図 1. (A) 96 ウェルプレートで 40 サンプル（デュプリケート）を測定する一般的な ELISA プロトコルの場合、所要時間は 7 時間 30 分です。(B) 40 サンプル（デュプリケート）を測定する一般的な Biacore SPR アッセイは 3 時間 15 分（または 4 時間 30 分）でランが終わり、ELISA に比べると半分

以下の時間で結果が出ます。

Biacore SPR をベースとするアッセイの長所には他に以下のようなものが挙げられます：

- ・ アッセイ開発期間の短縮：二次試薬のラベリングがない柔軟なアッセイフォーマット
- ・ ELISA では測定できないことが多い低アフィニティー／高  $K_D$  のアナライトについて、正確な定量解析またはアフィニティー解析が可能
- ・ アッセイ試薬の選択肢が増加：SPR では低アフィニティーの試薬も使用可
- ・ ランニングコストの低減：アッセイ表面を再生し別のアッセイに再利用することでアッセイの再現性および堅牢性を高め、再測定の回数を削減

## SPR アッセイを開発する際に考慮すべき主要なポイント

Biacore SPR アッセイプロトコルを開発するには、以下の点を考慮する必要があります：

1. アッセイフォーマットの選択 (以下参照)
2. センサー表面、アッセイバッファー、固定化手法の選択
3. 必要な場合、再生条件の確立
4. 必要な場合、非特異的結合 (NSB) の最小化

アッセイの開発を始める前には、感度、スループット、およびトータルの解析時間に関して最低限必要な基準を開発の早期段階で明確にしておくことをおすすめします。

### アッセイフォーマットの選択

アッセイフォーマットによって異なりますが、アッセイで測定されるシグナルはリガンドに結合した活性アナライトの量に比例または反比例します。ELISA アッセイを Biacore SPR アッセイに変換するには、アッセイ条件および構成の再確認とバリデーションが必要な場合があります。ELISA アッセイの開発および最適化に必要なステップと似ています。

アッセイフォーマットを選択する際に考慮すべき重要なポイントは、アッセイ感度、アッセイ範囲、アッセイ精度、およびスループットです。図 2 (A - D) は、濃度測定に一般的に用いられている 4 種類の SPR アッセイフォーマットを示します：直接結合アッセイ (A) は迅速で、二次試薬および一部のインキュベーションステップが不要になります。このアッセイにポリクローナル抗体などのシグナル増強分子を組み合わせると (B)、感度および特異性を向上できる場合があります。

リガンドの固定化または再生が十分に行えない場合には、直接結合アッセイの代わりに溶液競合 (C) および表面競合 (D) などの間接的アッセイも使用できます。

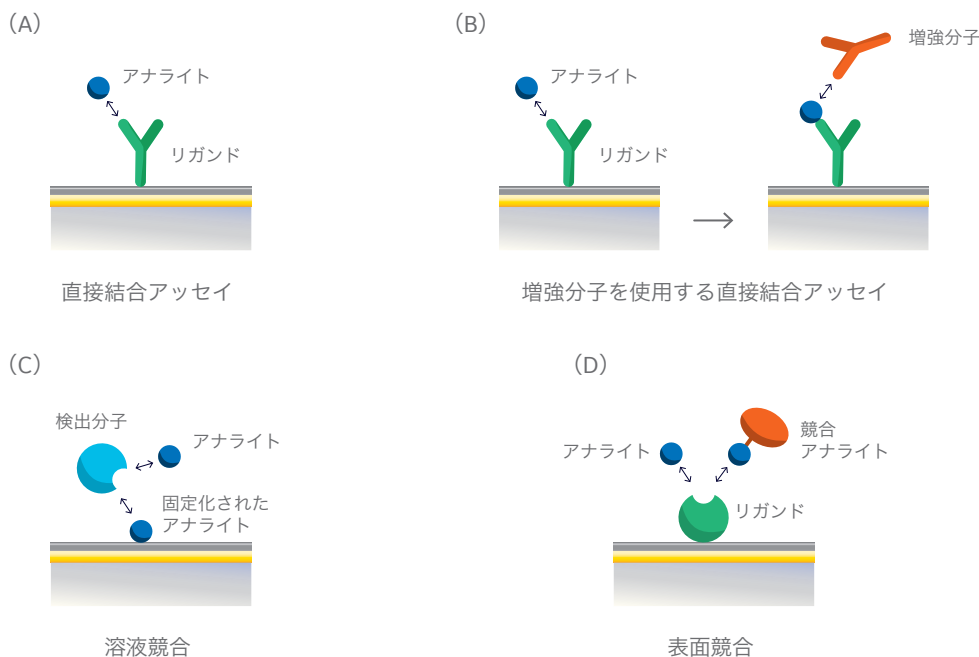


図 2. Biacore システムによる 4 種類のアッセイフォーマットの概略図：(A) 直接結合アッセイ；(B) 増強分子を使用する直接結合アッセイ；(C) 間接的な溶液競合アッセイ；(D) 間接的な表面競合アッセイ。

比較のため、図3にELISAで一般的に使用される3種類のフォーマットを示していますが、どのフォーマットも濃度またはアフィニティー測定を行うためには酵素が結合した二次試薬を必要とします。

ELISA法と同様、サンプルのインキュベーション/インジェクション時間を長くすることでBiacore SPRのアッセイ感度を上げられますが、解析までの時間は長くなります。

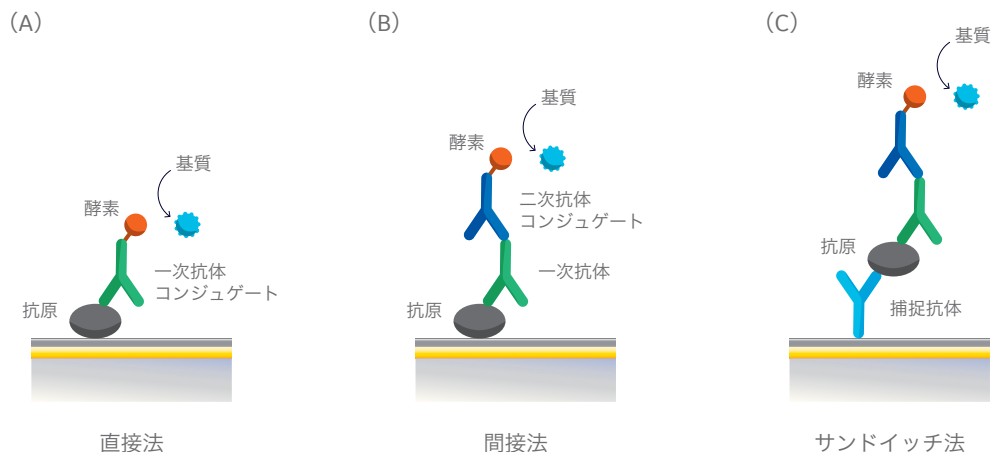


図3. 3種類のELISAアッセイフォーマットの概略図：(A) 直接法；(B) 間接法；(C) サンドイッチ法。

### センサー表面および固定化手法の選択

一般的に、最良のリガンド固定化方法は共有結合によるものです。これにより安定したセンサー表面が得られ、サイクル間でセンサー表面を再生できる限り繰り返し使用できます。リジン基を介したアミンカップリングは容易であり、多くのタンパク質に使用できます。他にはチオール基を介したカップリングがあり、グリコシル残基(アルデヒドに酸化され得るシスジオール基を持つ)を有するリガンドには、カルボヒドラジンをベースにしたアルデヒドカップリングを使用できます。

広範な分子の濃度測定に対応する、さまざまなセンサーチップ表面およびキャプチャーキットがご利用いただけます。タグが付加された分子/リガンドまたは抗体フォーマットのアッセイを開発する場合、すでに最適化されている捕捉表面および試薬キットを使用することで、開発期間を大幅に短縮できます。

広く使われているCMシリーズのセンサー表面は、カルボキシメチル化デキストランの半流動体表面層から成り、共有結合による固定化のプロトコールに最適です(1)。

Sensor Chip SA (ストレプトアビジン固定化)は、ビオチン化されたリガンドのキャプチャーにそのまま使用できる表面であり、共有結合による固定化の代わりになります。

すでに固定化されているSensor Chip Protein AおよびSensor Chip Protein Gなどは、抗体の濃度測定にそのまま使用できるカタログ製品です。Sensor Chip Protein Lは抗体フラグメントの濃度測定に使用可能で、アッセイ開発の時間を省くことができます。

### 再生条件の確立

再生のステップでは、解析後に結合しているアナライトをセンサー表面から除去し、次の解析に備えます。アフィニティーが低い相互作用では、アナライトは妥当な時間(数秒から数分)内に、自然に解離することが多いため、センサー表面の再生が不要な場合もあり、トータルのラン時間を短縮できます。

しかし、アフィニティーが高い相互作用の場合は、表面の再生が必要です。センサー表面を再生できる回数は、固定化されているリガンドの性質に依存します。抗体は、数百サイクル以上再生できることが多く、中には千回以上再生できる場合もあります。GEヘルスケアでは、確実な再生条件を確立するために調製済みで即使用可能な再生溶液を各種ご用意しており、またキャプチャーキットには最適化された再生条件が含まれているため、ここでもアッセイ開発の時間を節約できます。

## 非特異的結合 (NSB) の最小化

アナライト以外の成分の内、アナライトセンサー表面または検出分子に結合するものは、アナライトと同じ反応を引き起こします。ELISA アッセイでは、表面のプロッキングおよびウォッシュステップによって NSB を低減させており、これらのステップは慎重に最適化する必要があります。

サンプルの希釈率が十分に高いとき、SPR アッセイでは多くの場合 NSB は無視できるレベルです。サンプル中のアナライト濃度が低いと、希釈率を上げられず他の方法で NSB を最小化しなければならない場合があります。デキストラン表面に対する NSB の場合、可溶性デキストラン、すなわちアッセイに対する“NSB 減少剤”を添加する、または追加のウォッシュインジェクションを行うことで NSB を大幅に減少できる可能性があります。

アッセイ開発の段階で、荷電密度が低い Sensor Chip CM4、または Sensor Chip PEG などの他のセンサーチップを選択するという方法もあります。

バッファー条件の最適化、例えば塩濃度を上げることも NSB を低減する方法の一つです。バッファーの組成は、NSB、シグナルレベル、サンプルマトリックス干渉に大きく影響します。低濃度 (10 mM 程度) の HEPES またはリン酸を含み、生理的な塩濃度および pH で、界面活性剤入りのバッファーをまずご使用ください (2)。多くの場合、ELISA で使われていたバッファー条件をそのまま用いるだけで十分です。

## まとめ

Biacore SPR アッセイと ELISA アッセイは類似点が多く、同じ実験原理をベースにしています。ELISA アッセイから Biacore SPR アッセイへの移行は、ELISA で使用していた抗体ペアとバッファー条件を用いるだけで済むこともあります。

Biacore SPR アッセイには以下のような長所があります：

- ELISA に比べ、半分以下の時間で結果が得られます。
- 自動化された設定のため、運営費用を非常に低く抑えられます。
- センサー表面を再利用できるので消耗品のコストを大幅に削減します。
- サンプルの消費量が少なく再現性が高いためアッセイを再実行する必要がほとんどありません。
- 簡便：ビオチン化抗体、ストレプトアビジン-HRP 試薬やその他の展開試薬、ウォッシュバッファーの調製、繰り返しウォッシュするステップが不要です。
- 自動化によって、他の解析を行うための時間が空くだけでなく、アッセイ間およびアッセイ内のばらつきが低減します。
- パイスペシフィック抗体など、より複雑なアッセイを要する場合に適しています。
- SPR アッセイでは、ELISA アッセイで見られるエッジ効果またはフック効果は生じにくくなっています。

## References

1. Navratilova, I. *et al.* Analyzing ligand and small molecule binding activity of solubilized GPCRs using biosensor technology. *Anal. Biochem.* **355**, 132–139 (2006). DOI: [10.1016/j.ab.2006.04.021](https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.04.021)
2. Moberg, A. *et al.* Increased sensitivity of SPR assays in plasma through efficient parallel assay optimization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **5(78-79)**, 224–232 (2013). DOI: [10.1016/j.jpba.2013.02.018](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.018)

## GE ヘルスケア・ジャパン株式会社

ライフサイエンス統括本部

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL：03-5331-9336 FAX：03-5331-9370

e-mail：Tech-JP@ge.com



Intertek

ISO 9001:2015  
認証取得

掲載されている価格は2019年2月1日現在の希望小売価格です(消費税は含まれておりません)。希望小売価格は単なる参考価格であり、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問い合わせに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。