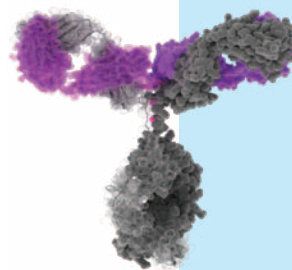


CovalX High-Mass MALDI-MS及び高分解能LC/MS(Orbitrap)によるタンパク質間相互作用や抗原/抗体でのコンフォメーションエピトープマッピング受託解析

AMRではCovalX社による受託解析サービスを承っております。CovalX社は質量分析法を利用した独自のタンパク質複合体、相互作用、エピトープマッピング分析サービスを提供しており、独自のクロスリンク試薬により非共有相互作用の高精度な分析をすることが可能になりました。コンフォメーションエピトープマッピングサービスではMono Valencyだけでなく、これまでの分析法では困難であったMultiple Valencyをもつ抗体と抗原の相互作用のストイキオメトリーやAntibody integrity、Aggregation (凝集)に関する情報を得ることができます。



受託解析サービスのご案内 (価格など詳しくはお問い合わせください)

コンフォメーションエピトープマッピング

抗体が抗原を認識するエピトープがリニアかまたは立体構造を認識しているかをスクリーニングし、コンフォメーションエピトープを形成している場合はクロスリンクMS解析へ進みます。

STEP 1 抗体及び抗原単体でのキャラクタリゼーション解析
High-Mass MALDI mass spectrometryによる抗体及び抗原単体でのアグリゲーション解析(各サンプルの濃度を希釈し、クロスリンカーを用い凝集体形成有無の確認)を行います。 **納期 約1週間**

STEP 2 抗体-抗原複合体のキャラクタリゼーション(ストイキオメトリー)解析
High-mass MALDI Mass spectrometryによる抗体-抗原複合体のキャラクタリゼーション解析(クロスリンカーを用い抗体-抗原複合体のストイキオメトリー解析)を行います。 **納期 約2週間**

STEP 3 抗体-抗原複合体のキャラクタリゼーション(コンフォメーション-リニアエピトープ)解析
エピトープがリニアか、コンフォメーションを形成しているかの確認を行います。抗原を酵素消化して得られたペプチドを抗体と共にインキュベーションした後、インタクたな抗原とクロスリンカーを用い反応させ抗体-抗原複合体の形成有無を確認します。 **納期 約1週間**
①抗体-抗原複合体を形成しなかった場合
…リニアエピトープであるため、STEP3リニアエピトープマッピングが最終段階になります。
②抗体-抗原複合体を形成した場合
…コンフォメーションエピトープ(ループ、三次構造等)を形成している為、STEP4の解析に進みます。

STEP 4 クロスリンクMS解析
Nano LC-Orbitrapによる抗原のPMF解析を行います。複数の酵素を用いシークエンスカバレッジを最大限まで高めます。D0/D12 Labeling: クロスリンクされた抗原のPMFとシークエンスカバレッジ解析。 **納期 約2週間**

STEP 5 コンフォメーションエピトープのインターフェスマッピング及びデータ解析
Nano LC-Orbitrapによるクロスリンクされた抗体-抗原複合体のPMF解析後、独自の相互作用解析ソフトウェアにより、クロスリンクペプチドを検出し、最終報告書のご提出します。 **納期 約2週間**

- 【注意事項】**
- ・事前に測定依頼書に必要事項をご記入頂く必要があります。
 - ・各STEPの解析結果をご確認頂いた上で、次のSTEPへ解析を進めるかご判断をいただきます。
 - ・STEP1の納期についてはサンプルをメーカーが受領してから、STEP2以降の納期につきましては解析継続のご連絡をいただいていたからの目安となります。
 - ・受託解析費用はサンプル数・内容により異なります。別途お問い合わせをお願い申し上げます。

水素重水素交換 (HDX) 質量分析法

高分解能MSによりタンパク質の立体構造や複合体の相互作用部位(エピトープ)解析を行います。

タンパク質複合体の解析

- 1 タンパク質のサブユニット解析
- 2 タンパク質の多量体形成解析
- 3 PEGylatedタンパク質解析
- 4 抗原/抗体のキャラクタリゼーション、結合のストイキオメトリー解析、サンドイッチアッセイ解析

タンパク質のアグリゲーション解析

サンプル中の二量体、三量体、多量体のストイキオメトリー及び相対比較定量解析

タンパク質相互作用の阻害アッセイ

- 1 低分子化合物、ペプチドなどによるタンパク質相互作用阻害アッセイ IC50分析
- 2 相互作用阻害化合物のハイスループットスクリーニング

CovalX 独自の 高質量MALDI検出器

抗体 + 抗原 → 架橋 → Ab-Ag + Ab-2Ag

インタクたな複合体を直接検出

CovalX独自の高質量MALDI検出器を利用することで未結合の抗体や抗原だけでなくインタクたな抗原抗体複合体を直接検出することが可能です

コンフォメーションエピトープマッピング

一次サンプルスクリーニング

エピトープの高分解能解析には一次スクリーニングに高質量マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (High-Mass MALDI) で抗体・抗原・および完全な抗体/抗原複合体を利用します。これにより抗原・抗体複合体が明らかになり、スタンダードおよびターゲットのタンパク質複合体形成が確認されます。

コンフォメーションの迅速判定

エピトープマッピングの方法は抗原抗体間の非共有結合性相互作用、すなわちエピトープがリニアか立体配座を持つかにより変化します。

抗原が直鎖の配列に基づいて抗原を認識する場合はエピトープもリニアですが、抗原を三次構造に基づいて認識する場合、エピトープは立体配座を持ちます。CovalXは高速の質量分析法を有しており、エピトープの特徴部位を高速で決定することが可能です。

特性評価には競合アッセイを実施します。1 抗原の配列情報を広くカバーするため抗原をトリプシン消化し、その後過剰な抗原のトリプシン消化物・インタクトな抗原およびモノクローナル抗体を混合します。CovalX独自の架橋キットにより複合体を安定化します。

2 高質量マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (High-Mass MALDI) -ToF 検出器で分析します。High-Mass MALDI分析で免疫複合体が検出されなければ、特性評価するエピトープはリニアであると特定され、免疫複合体が検出されればコンフォメーションエピトープの存在が示唆されることとなります (図1)。

(Nazabalら. Anal. Chem.; 2006; 78 (11); 3562-3570; Bich Cら. Anal. Biochem.; 2008年; 375:35-45)

この解析では下記項目を検証します

- 1 抗体と抗原のIntegrity
- 2 抗原の多量体化
- 3 抗体の凝集
- 4 タンパク質複合体のストイキオメトリー

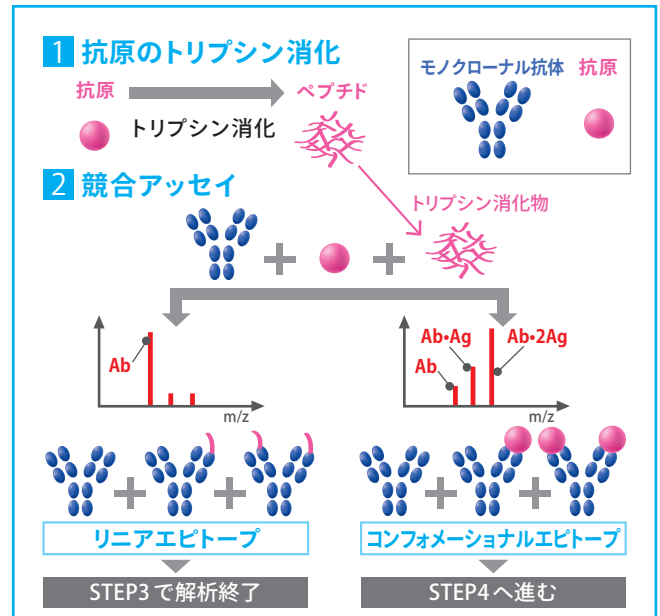
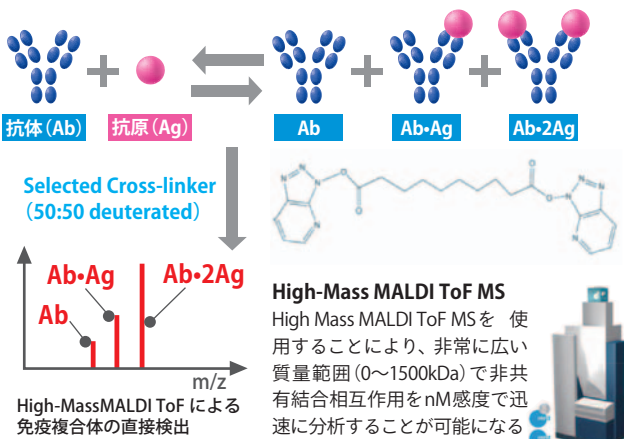


図1 高質量MALDI ToF質量分析によるエピトープの特性評価(リニアまたはコンフォメーション)

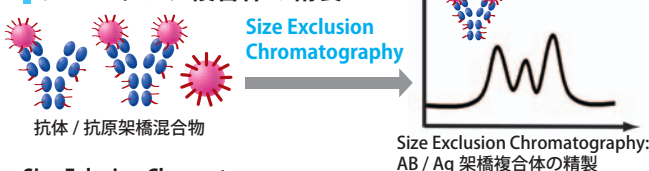
リニアまたはコンフォメーションのエピトープマッピング

抗体/抗原相互作用

抗体または抗原のいずれについても分子量に制限はない。該方法は、任意のタンパク質-タンパク質相互作用に適合する。



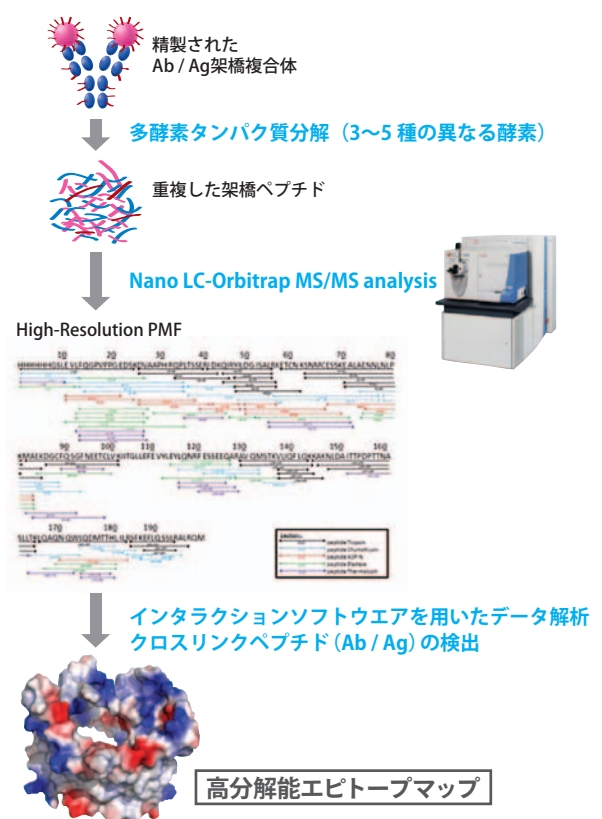
クロスリンク複体の精製



Size Exclusion Chromatography

架橋ペプチドの検出を改善するために、インタクトな Ab / Ag 架橋複合体は、任意のタンパク質分解の前に SEC によって精製される

安定化された免疫複体の Nano LC-Orbitrap MS 分析



水素重水素交換(HDX)質量分析法

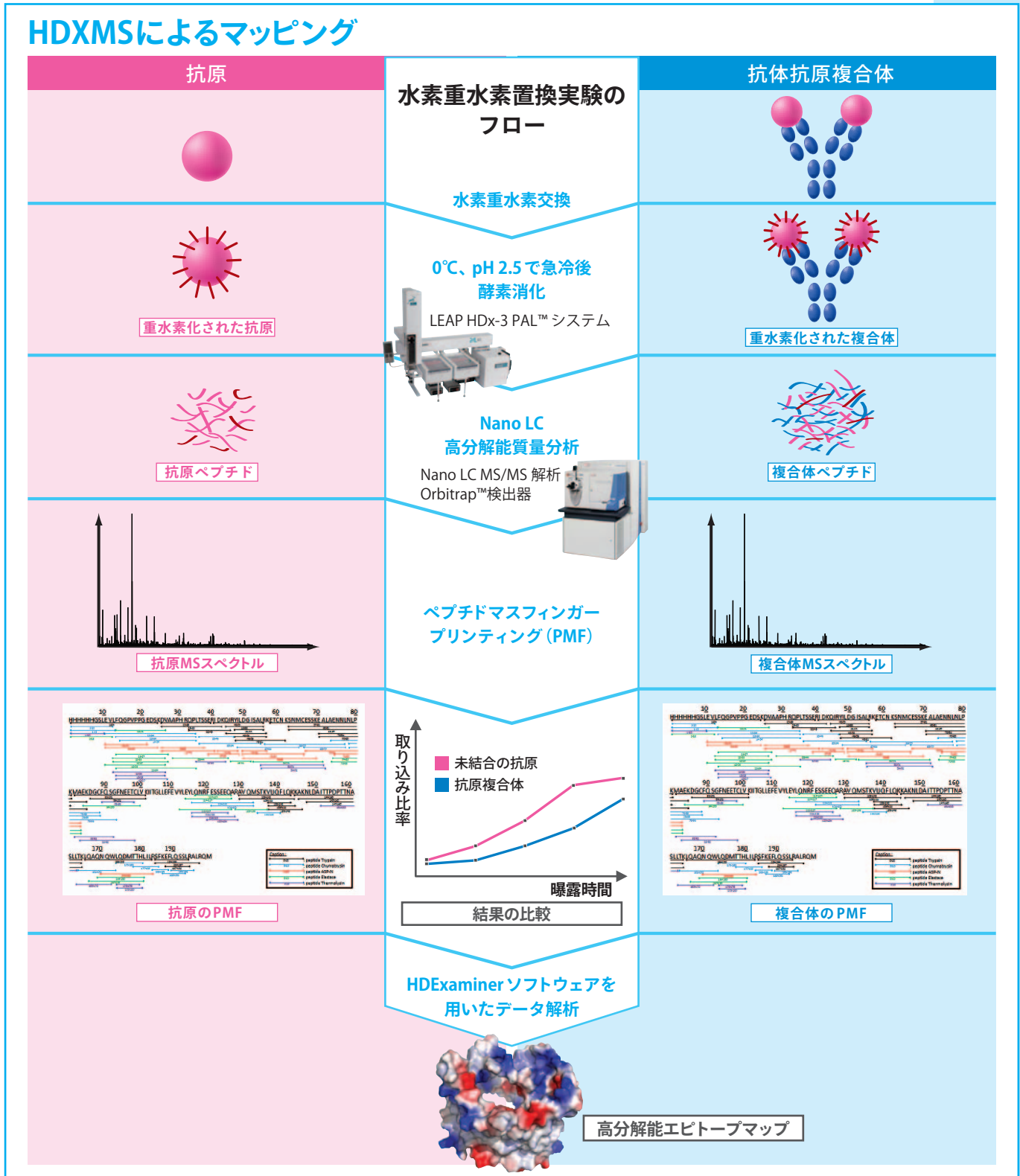
アミノ酸主鎖の水素は、重水(D₂O)で希釈すると重水素との交換を行います。重水素の交換速度は水素結合や溶媒露出度によって変化し、抗原が抗体と複合体を形成している場合にはエピトープ領域でさらに変化します。交換速度は経時的なサンプル分析により求められます。

- (1) 抗原、抗体抗原複合体を重水で希釈します。
- (2) 0°C、pH 2.5の条件で急冷することにより重水素/水素の交換を停止します。
- (3) タンパク質を酵素消化によりペプチドに分解します。

(4) Nano-LC Orbitrap質量分析計でペプチドを測定します。

(5) ペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)により、重水素の交換速度を示すヒートマップを用い、抗原単独と抗体結合抗原を比較します。

これらの手順は全て、自動化されたLEAP社のHDx-3 PAL™システムで行います。このシステムでは実験デザイン(DOE)ソフトウェアにより効率的な処理が可能です。分析中に起きる重水素の逆交換を減少させるため、管理された温度条件下で分析を実施します。解析結果報告書はHDEaminerソフトウェアで解析され、分かりやすいHDXのヒートマップが付属されます。



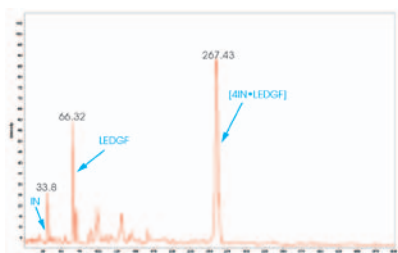
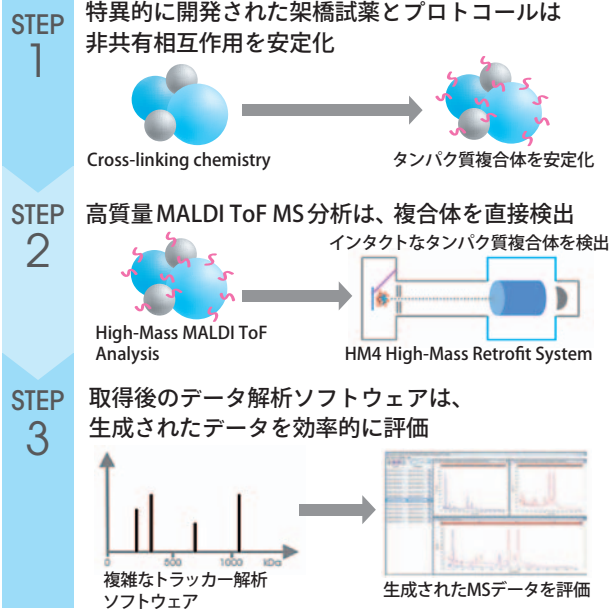
タンパク質複合体の解析

CovalXは、MALDI質量分析計によるタンパク質相互作用の高速で高感度で正確な分析のためのソリューションプロバイダーです。タンパク質複合体は、特別に開発されたHigh-Mass MALDI検出システムを使用してインタクトで検出されます。固定化、バッファー交換または特殊タグを必要としないため、CovalXは、タンパク質複合体、抗体または治療用タンパク質凝集体のキャラクタリゼーションを製剤のバッファーはフォーミュレーションのまま行うことが可能です。

定性および定量データの提供

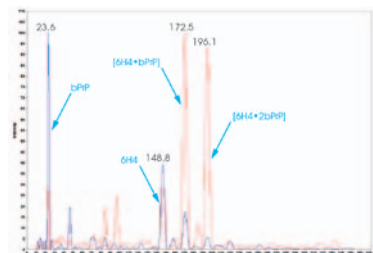
- タンパク質複合体：
 - 相互作用の検証、複雑な化学量論、相互作用の阻害
- 抗体のキャラクタリゼーション：
 - 抗原結合、エピトープマッピング、マルチ結合アッセイ
- キャラクタリゼーション、半定量
- PEG-タンパク質のキャラクタリゼーション

タンパク質相互作用を3つのステップで分析



タンパク質複合体分析

クロスリンク試薬および高質量MALDI ToF質量分析を使用して、非共有結合タンパク質複合体の分析が可能になります。HIV Integrase (IN) および補因子LEDGFによって形成されたタンパク質複合体は、CovalXのK200 クロスリンク試薬キットにより架橋後、ストイキオメトリーに依存する非共有結合複合体[4IN+2LEDGF]は、CovalX High-Mass MALDIシステムを使用して容易に検出できました。(Michel et al., The EMBO Journal (2009) 28, 980-991)

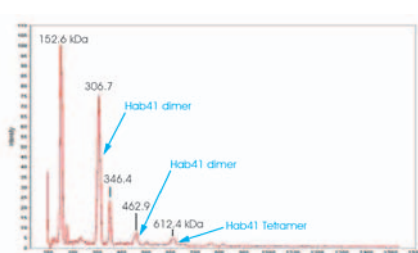


抗体のキャラクタリゼーション

CovalXの技術を使用することで抗原結合アッセイ、エピトープマッピングおよび多結合アッセイなど抗体のキャラクタリゼーションが可能になります。

クロスリンク前(青)…ウシプリオンタンパク質(bPrP) およびモノクローナル抗体である抗bPrP (6H4) がクロスリンク前に検出されています。

クロスリンク後(赤)…複合体[6H4+bPrP]及び[6H4+2bPrP]が172.5kDa、196.1kDaで検出されています。(Nazabal et al., Anal. Chem. (2006) 78, 3562-3570)



アグリゲーション解析

医療用タンパク質やペプチド製品の増加により治療用タンパク質の凝集現象の解析は極めて重要です。

CovalXは、医療用タンパク質サンプルの独自の直接分析ツールを導入しています。抗体(Hab41)の凝集したサンプルを、サイズ排除クロマトグラフィー、続いて架橋プロトコールおよびHigh-Mass MALDI ToFで分析しました。分析されたフラクションから得られた質量スペクトルは、Hab41の二量体(306kDa)、三量体(462kDa)および四量体(612kDa)です。

エピトープマッピングにおける特性評価でCovalXのサービスが選ばれる理由

独自の特許技術により質量分析での相互作用分析評価が可能です。

CovalX High Mass MALDI 分析システム

CovalX K200 安定化キット



高質量マトリックス支援
レーザー脱離イオン化
飛行時間型質量分析
(High-Mass MALDI ToF)



LEAP HDx-3 PAL™ システム

ロボットによる再現性の高い
インキュベーション、クエンチおよび
カラム内ペプシン消化を実現



CovalX受託解析サービス
ウェブページはこちら



エームアール株式会社

〒152-0031 東京都目黒区中根2-13-18

Tel 03-5731-2281/Fax 03-5731-2283

<http://www.amr-inc.co.jp/>



エームアール



※価格はお問い合わせください

※本カタログに記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