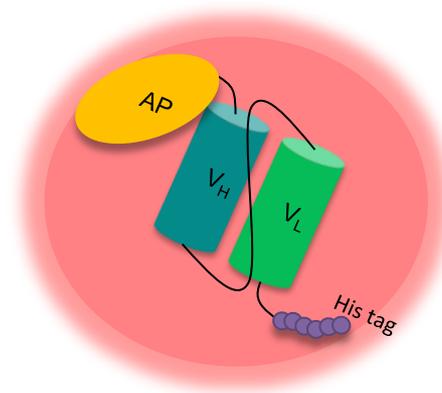


新サービス (DC Rab-SAPサービス)

概要



DC Rab-SAP サービス

新サービス：

抗体ダイレクトクローニング法を新たに改良し、迅速検出法を採用したラビットモノクローナル抗体作製サービス

新サービス名：DC Rab-SAP サービス

DC：抗体ダイレクトクローニング

Rab：ラビットモノクローナル抗体

S：scFv

AP：アルカリフォスファターゼ

バイオピークの抗体作製技術への取り組み

高い親和性と特異性を持つ抗体を確実に作製するために・・・

特許技術

- 最適なプライマーの設計により V_H , V_L 遺伝子を効率的に増幅し、高品質な抗体（scFv）ライブラリーを構築

特許技術

- 大腸菌を用いた抗体ダイレクトクローニング法™によるスクリーニングのための専用発現ベクターを開発

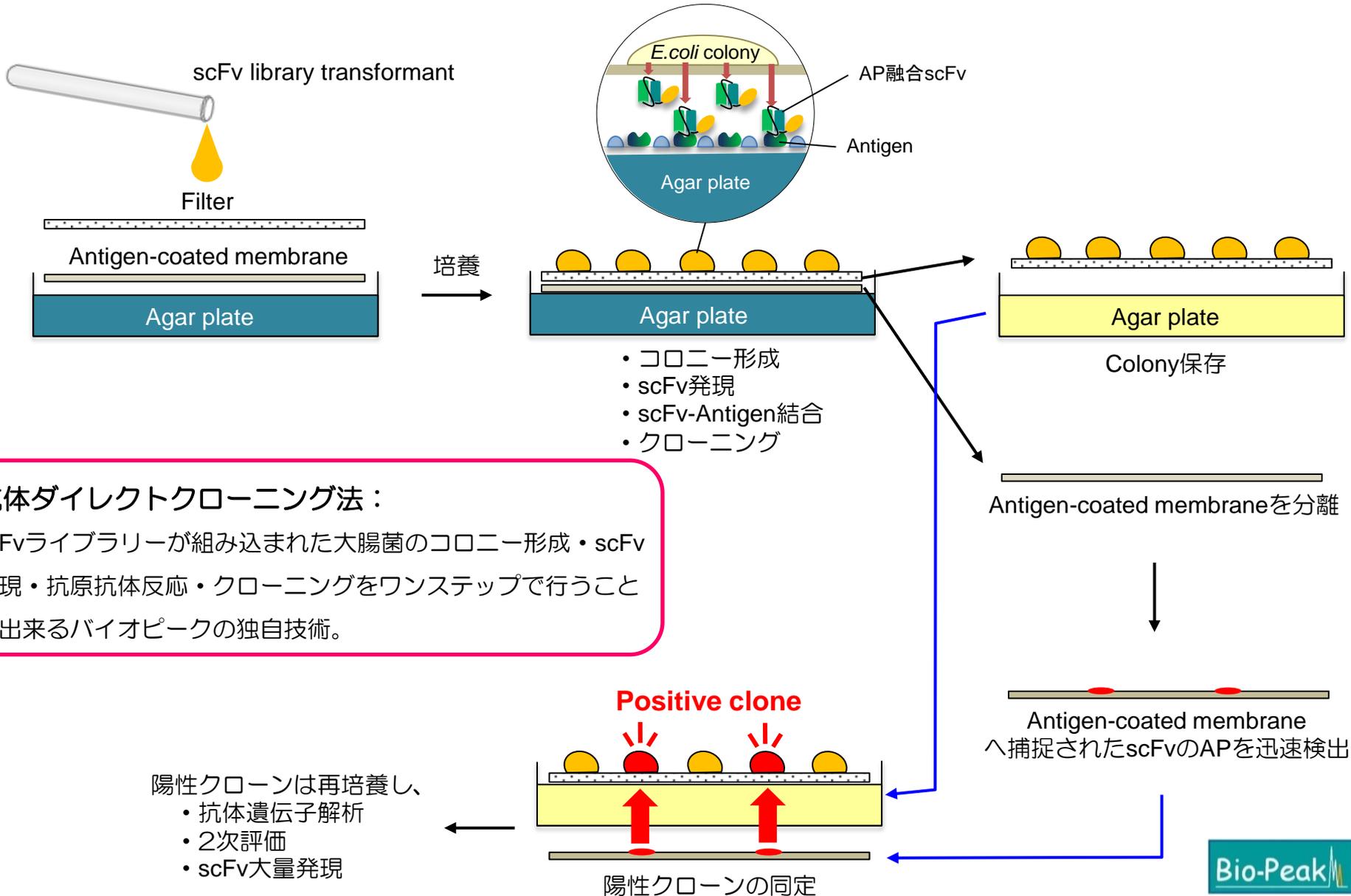
特許技術

- 確実なコロニー形成・scFv発現・抗体遺伝子確保のために、大腸菌の培養条件を最適化

特許技術

- AP融合scFvライブラリーの構築により迅速検出法を開発し、大規模ライブラリーからのスクリーニングが可能

抗体ダイレクトクローニング法とは？



抗体ダイレクトクローニング法：

scFvライブラリーが組み込まれた大腸菌のコロニー形成・scFv発現・抗原抗体反応・クローニングをワンステップで行うことが出来るバイオピークの独自技術。

抗体ダイレクトクローニング法で得られたクローン

抗原	免疫動物種	Colony数	陽性数	陽性率
Protein A	Rabbit	5,100	140	2.75%
Protein B	Rabbit	7,430	115	1.55%
Protein C	Rabbit	12,380	303	2.45%
Peptide A	Rabbit	8,190	70	0.85%
Peptide B	Rabbit	19,850	125	0.63%

取得抗体 (scFv) の評価：ELISA

方法

human IgGをウサギへ免疫



PBMCの回収



RNA精製



V_H, V_LのPCR増幅



Expression vector library作製



E.coli 形質転換



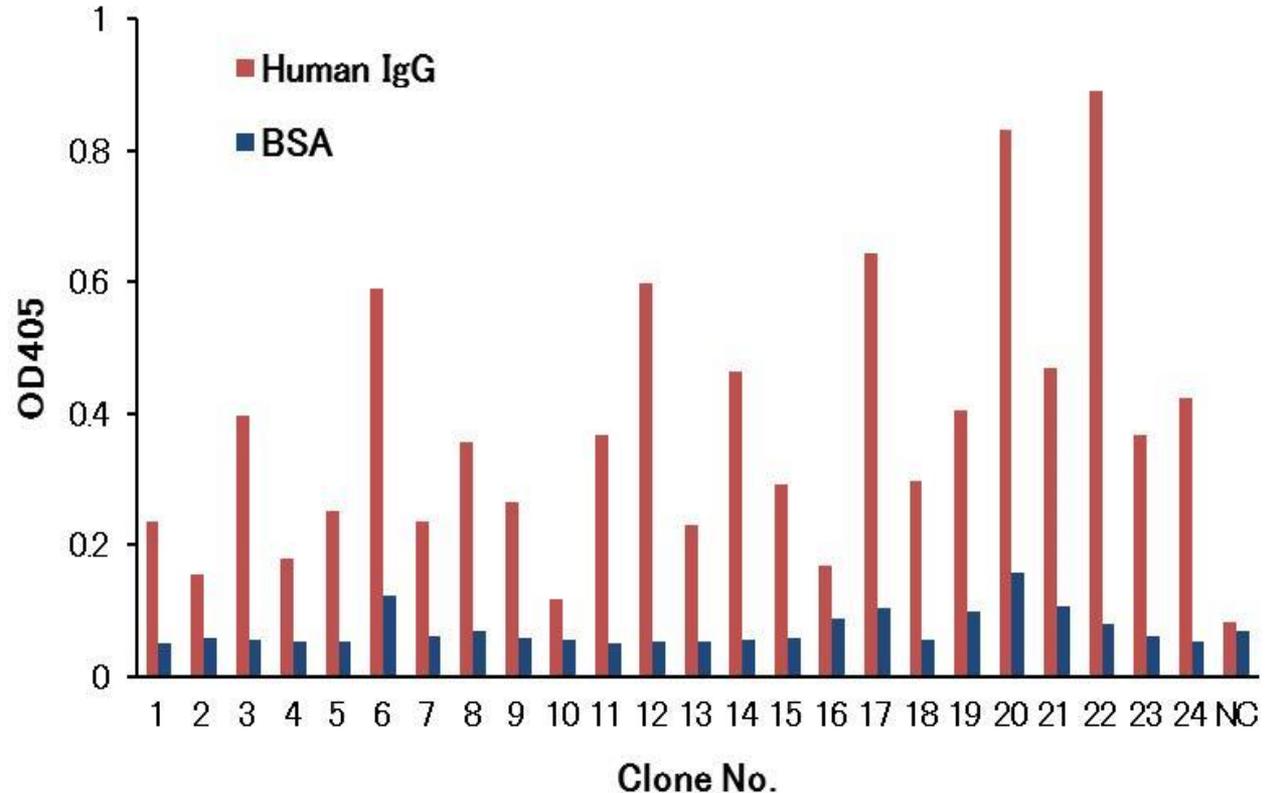
抗体ダイレクトクローニング



陽性クローンを発現・培養



ライセートをELISA



取得抗体の多様性

Rabbit anti-human IgG V_H

			CDR1	CDR2	CDR3			
h1-#6	VH	1	MQS-LEESGGRLVTPGTPPLTLTCSVSGFSLSIYHMI	WRQAPGKGLEIYICFIIGSS-GDTYY-A	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKIASFPTTEDATATYFCARDNDYDY-DI----	WPGPGLTVTVSS	
h1-#12	VH	1	MQS-LEESGGRLVTPGTPPLTLTCSAIDLSSYAMI	WRQAPGKGLEIYICGII-SSG	GNVYY-A	SWAKGRFTISKTS	TTVTLTLTSPPTTEDATATYFCARSRYGGYSDV-----	WPGPGLTVTVSS
h1-#17	VH	1	MQSGRSPGRPGQAW-GIPDTHLQSLWILLQSRLLDM	WRQAPGKGLEIYICHPDGTDRYVA-	WAKGRFTISKTS	TTVTLQMASLTAADATATYFCARDYVAVGFGYGYVD----	WPGPGLTVTVSS	
h1-#20	VH	1	MQEQLLEESGGRLVTPGTPPLTLTCSAGSIDLSSYIMT	WRQAPGKGLEIYICFIINTGG-TYYTN-	WAKGRFTISKTS	TTVNLKMTSLTTEDATATYFCARGHAGFMTD----DFS-	WPGPGLTVTVSS	
h1-#22	VH	1	MQS-LEESGGRLVTPGTPPLTLTCSAGSIDLNNAMT	WRQAPGKGLEIYICIIYANHN-TYY-	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKMSTLTEDATATYFCARGDYNYYAG-----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#1	VH	1	MQT-VRESGGRLFKPFDTLTLTCSVSGFSLSSNAIT	WRQAPGKGLEIYICII--DTGGYAYYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKITSPPTEDATATYFCRGAYSYPASYLT-----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#2	VH	1	MQEQLVESGGRLVTPGTPPLTLTCSAGFDLSSYAMI	WRQAPGKGLEIYICLINTSGS--AYYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKVTSPTTEDATATYFCVRYDGANGGID-----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#3	VH	1	MQS-LEESGGRLVTPGTPPLTLTCSVSGFSLTNYNMG	WRQAPGKGLEIYICIIYNGSGS--AYYA	SWAKGRFTISKTS	TTVNLKMTSPPTEDATATYFCARGIYGPWVTRLD----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#5	VH	1	MQS-VLESGGRLVTPGTPPLTLTCSVSGIDLSSYAMG	WRQAPGKGLEIYICIISSSGS-T-YYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKMSTLTEDATATYFCRGGQGVSSPND-----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#6	VH	1	MQS-VLESGGRLVTPGTPPLTLTCSVSGIDLNSYVIS	WRQAPGKGLEIYICMFTGS--TYYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKITSPPTEDATATYFCARGANDYNNWLN----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#7	VH	1	MQS-VLESGGRLVTPGTPPLTLTCSVSGFSLSSYDMT	WRQAPGKGLEIYICIIIRSSGS--TYYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKMSTLTEDATATYFCARRESYSYNT-----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#8	VH	1	MQS-VLESGGRLVTPGTPPLTLTCSVSGFSLTNYNYS	WRQAPGKGLEIYICFIIDSDG-IAYYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKITSPPTEDATATYFCVRSYDTGYVSGS-----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#10	VH	1	MQEQLVESGGRLVTPGTPPLTLTCSVSGFSLSAWAMG	WRQAPGKGLEIYICVMYYPDSPD--YA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKITSPPTEDATATYFCARGRYSGPGSIGYGFDP----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#12	VH	1	MQEQLLEESGGRLVTPGTPPLTLTCSAGFTISNRYALL	WRQAPGKGLEIYICFIIDTNSD--AYYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKITSPPTEDATATYFCARINTWLD-----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#13	VH	1	MQS-LEESGGRLVTPGTPPLTLTCSVSGFSLNSYWMG	WRQAPGKGLEIYICIIIPDVGN-I-YYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLEITSPPTEDATATYFCARMGPFANYVF-----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#17	VH	1	MQEQLLEESGGRLVTPGTPPLTLTCSAGFDLSSYAMG	WRQAPGKGLEIYICVIASSGG--TYYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKITSPPTEDATATYFCARGGDIYAGAADETRLD----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#18	VH	1	MQS-VLESGGRLVTPGTPPLTLTCSVSGFSLSSYDMT	WRQAPGKGLEIYICIISSSGS--TYYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKMSTLTEDATATYFCARRESYSYNT-----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#19	VH	1	MQS-LEESGGRLVTPGTPPLTLTCSVSGIDLSSYAMG	WRQAPGKGLEIYICVIASSGG--TYYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKMSTLTEDATATYFCAREYATWSSGTG-----	WPGPGLTVTVSS	
h2-#20	VH	1	MQS-VLESGGRLVTPGTPPLTLTCSVSGFSLTNYEVI	WRQAPGKGLEIYICIIISTGGS--AYYA	SWAKGRFTISKTS	TTVDLKITSPPTEDATATYFCARHTLGTA-----FDP-	WPGPGLTVTVSS	

Rabbit anti-human IgG V_L

			CDR1	CDR2	CDR3	
h1-#1	VL	1	-AVLTQTFSPVSAAVGGTVTINCQSSQSVYKNNWLS	WYQQKPGQPPKLLIYASTLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC	GGYDDVDVDS---AFGGGTEVVVK
h1-#2	VL	1	DFVMTQTFSPVSAAVGGTVTINCQSSQSVYNDNWL	WYQQKPGQPPKLLIYETSKLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC	GTDYVSGWSN---AFGGGTEVVVK
h1-#3	VL	1	DVVMTQTFASVSAAVGGTVTINCQSERISS--YLS	WYQQKPGQPPKLLIYASTLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYC	YTYIGSGGG--GVFGGTEVVVK
h1-#4	VL	1	DFVMTQTFSPVSAAVGGTVSISCSQSKSVNNWLS	WYQQKPGQPPKLLIYASTLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYC	GGYSSSSE---NAFGGGTEVVVK
h1-#5	VL	1	DVVMTQTFASVSAAVGGTVTINCQASEDIYSN--L	WYQQKPGQPPKLLIYETSKLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYC	STYIGGST---SNAFGGGTEVVVK
h2-#1	VL	1	-QVLTQTFSPVSAAVGGTVTINCQASQNIYSDKNLA	WYQQKPGQPPKLLIYASTLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC	GEFTCSGSDC--MGFGGTEVVVK
h2-#2	VL	1	--KMTQTFASVSAAVGGTVTICKQASQSIDN-K-	LSWYQQKPGQPPKLLIYASTLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC	QTFDGSVD--NAFGGTEVVVK
h2-#3	VL	1	DGVMTQTFSPVSAAVGGTVTISCSQSSQSVYNNWLS	WYQQKPGQPPKLLIYASNL	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC	GGYIDD-AD--MGFGGTEVVVK
h2-#5	VL	1	YVMTQTFASVSEPVGGTVTINCQASQENIDSS-YLS	WYQQKPGQPPKLLIYASTLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC	GGFYNAVDTATS--FGGGTEVVVK
h2-#6	VL	1	-AVMTQTFSPVSAAVGGTVTINCQSSQSVYNNWLS	WYQQKPGQPPKLLIYASTLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTINDVQCDDAATYYC	GGYLEDSD--NAFGGTEVVVK
h2-#7	VL	1	--VLTQTFSPVSAAVGGTVSISCSQSKSVYNNWLS	WYQQKPGQPPKLLIYASNYL	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYC	GGYSSSD--NAFGGTEVVVK
h2-#8	VL	1	DGVMTQTFASVSEPVGGTVTICKQASQSIDN-K-	LSWYQQKPGQPPKLLIYQASKLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYC	SNYGMSTNNYINTFGGGTEVVVK
h2-#10	VL	1	DVVMTQTFASVSAAVGGTVTICKQASQSIDN-K-	LSWYQQKPGQPPKLLIYASNL	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYC	QTYYSSSSSYGGAFGGGTEVVVK
h2-#12	VL	1	-AVMTQTFASVSEPVGGTVTICKQASQSIDN-K-	LSWYQQKPGQPPKLLIYDASDL	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYC	QTYIASSTY----VFGGGTEVVVK
h2-#13	VL	1	--VLTQTFSPVSAAVGGTVSISCSQSKSVYNNWLS	WYQQKPGQPPKLLIYASNYL	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYC	QNNYDSDSGGA--VFGGGTEVVVK
h2-#17	VL	1	DVVMTQTFSPVSAAVGGTVSISCSQSKSVYD--NLS	WYQQKPGQPPKLLIYDASTLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYC	GGYISSTE---NAFGGTEVVVK
h2-#18	VL	1	-VLTQTFSPVSAAVGGTVSISCSQSKSVYNNWLS	WYQQKPGQPPKLLIYASNYL	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYC	GGYSSSD--NAFGGTEVVVK
h2-#19	VL	1	DVVMTQTFSPVSAAVGGTVSISCSQSKSVYNNWLS	WYQQKPGQPPKLLIYETSKLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYC	GGYSSSHNG---VFGGGTEVVVK
h2-#20	VL	1	DVVMTQTFASVSEPVGGTVTICKQASQSIDN-K-	LSWYQQKPGQPPKLLIYASTLA	SGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYC	SNCDGNSYGGAFGGGTEVVVK

サービスのメリット

- **権利フリーの抗体をご提供**

納品いたしました抗体可変領域の配列の権利は、お客様に帰属いたします。弊社より権利を主張することはありませんので、ご自由にお使いいただけます。

- **ウサギモノクローナル抗体**

ウサギはマウスより免疫機構が複雑であることやV_LのCDRが長いことから、抗体のバリエーションが大きく、親和性の高い抗体を取得しやすい事が知られています。

- **多数の陽性クローンを取得**

抗体ダイレクトクローニングは寒天培地上にクローンを播種するため、ハイブリドーマ法に比べて10倍以上の陽性クローンを得ることが可能です。

- **クローン樹立後の発現簡便性**

選択した陽性クローンはそのまま抗体を再発現することが可能です。そのため、多種類の項目を簡単に短時間で評価することが可能です。

- **アルカリフォスファターゼ(AP)融合scFv**

得られたクローンが産生する抗体はAPが融合されているため、クローンを樹立した後、そのまま検出抗体としても使用可能です。また、FabやIgGに容易に改変することも可能です。

ウサギモノクローナル抗体作製のスケジュール

1. ウサギの免疫

ウサギ：2羽

免疫回数：2週間毎5回、抗原 0.2mg/回

試採血：2回（免疫前、最終免疫前）

全採血：9週間後、全採血からPBMCを精製

2. scFv libraryの作製

2-1. PBMCからRNAを精製し、RNAからcDNAを合成

2-2. cDNAを鋳型に V_H , V_L 遺伝子をPCR増幅

2-3. V_H , V_L 遺伝子を発現ベクターに組み込み、
AP融合scFv発現vector libraryを作製

2-4. AP融合scFv発現vector libraryにて*E. Coli*を形質転換

3. 抗体ダイレクトクローニング法によるスクリーニング

3-1. *E. coli* libraryを培地に播種し、コロニー形成・発現・抗原抗体反応・クローニング

3-2. 抗原抗体反応シグナルを検出し、シグナルの強い12クローンを採取

4. 陽性クローン抗体遺伝子配列解析及びライセートの調整

12陽性クローンを液体培養 → プラスミド精製後、抗体遺伝子配列解析
→ テスト発現後、ライセートを調整し、ELISA

5. 納品

1. 最大12クローンの V_H , V_L 遺伝子配列

2. ELISA結果

3. 最大12クローンのテスト発現ライセート（1mL/クローン）



抗原受領から納品まで
約3ヶ月

オプションサービス

	作業	納期	卸値(税別)
1	抗原の作製	お問い合わせ	お問い合わせ
2	抗体ダイレクトクローニングのプレート追加	お問い合わせ	お問い合わせ
3	陽性クローンの追加(12クローン単位)	-	お問い合わせ
4	陽性クローンの少量発現培養上清 (1~10mL/クローン)	1週間~	お問い合わせ
5	取得抗体遺伝子の発現ベクター作製 (scFvをご希望のベクターに組み込みます)	お問い合わせ	お問い合わせ
6	取得抗体のIgG化・Fab化	お問い合わせ	お問い合わせ

モノクローナル抗体作製フロー

スタンダードサービス

抗原
ご提供

- ・タンパク質
- ・ペプチド
- ・低分子化合物
- ・膜タンパク質

免疫

- ・ウサギ2羽

抗体ダイレクトク
ローニング

- ・抗体ライブラリー作製
- ・スクリーニング
- ・12陽性クローン採取

- ・抗体遺伝子配列同定
- ・陽性クローンの発現
- ・ELISA

- ・陽性クローン発現培養
- ・ライセート回収
- ・ELISA
- ・抗体遺伝子配列解析 (V_L , V_H)

オプションサービス

発現
ベクター作製

- ・IgG
- ・scFv
- ・Fab

IgG発現

- ・哺乳類細胞
- ・精製

scFv発現
(Hybody発現)

- ・*E. coli*(培養上清 > 1mL, 10mL)
- ・*B. megaterium*(培養上清 > 100mL)

評価

- ・ELISA
- ・競合ELISA
- ・交差性
- ・ウェスタン

抗原のご用意と納品物について

・抗原のご用意について

可溶性抗原を1mg/mL以上の濃度で、3mg以上をお送りください。
免疫に2mg、スクリーニングに1mg使用いたします。

注意点

- ・抗原の溶液はPBSを推奨いたしております。
- ・抗原や溶液の毒性や感染性につきましての情報はお知らせください。感染の危険がある抗原につきましては、受け入れ出来ない場合がございます。
- ・抗原をお客様でご用意いただけない場合や、量を確保できない場合は、ご相談ください。
- ・抗原がペプチドや低分子化合物の場合、抗原にKLHやBSAへのコンジュゲートをお願いいたします（免疫用にKLH、スクリーニング用にBSAを推奨しております）。

抗原送付先

株式会社バイオピーク 埼玉事業所
〒345-0041
埼玉県北葛飾郡杉戸町茨島959
TEL : 0480-77-1343

・納品物

1. 12陽性クローンの V_H , V_L 遺伝子配列ご報告書
2. 12陽性クローンのELISA結果ご報告書
3. 12陽性クローンのテスト発現ライセート（1mL/クローン）

※陽性クローン数が12に満たない場合、全ての陽性クローン数の納品とさせていただきます。