

Guide to SpyCatcher Products Supporting TrailBlazer Antibodies

革新的な SpyTag と SpyCatcher の技術は、「分子の瞬間接着剤」とも呼ばれ、科学界では新しい性質を持つタンパク質を構築するために様々な方法で採用されてきました。バイオ・ラッドの「TrailBlazer カスタム抗体作製サービス*」は SpyTag 付リコンビナント抗体を、既成の SpyCatcher モジュールと組み合わせることで、これまでにない柔軟なアッセイデザインを可能にするブランドとして誕生しました。SpyTag と SpyCatcher の反応は自己触媒的に起こり、数分で定量的に反応します。使用する SpyCatcher に応じて、抗体は、例えば HRP、ビオチン、蛍光色素などで部位特異的に標識されるか、多量化されるか、異なるアイソタイプや様々な種由来の Fc ドメインを持つ免疫グロブリン(Ig)様コンストラクトに形成することができます。

SpyTag テクノロジーの紹介

SpyTag 技術は、*Streptococcus pyogenes* (SPY: 化膿性連鎖球菌) のフィブロネクチン結合タンパク質(FbaB)の第 2 の免疫グロブリン様コラーゲン付着因子領域(CnaB2)由来の SpyTag(Sy)ペプチドと SpyCatcher タンパク質(Zakeri et al.2012)を用いたタンパク質ライゲーション法です。CnaB2 ドメインは、リシンとアスパラギン酸の側鎖間に鎖内イソペプチド結合を持つのが特徴であり、このイソペプチドが CnaB2 ドメインに結合しています。このドメインを分割し、合理的に断片化することで、混合すると自発的にアミド結合を形成するペプチド(反応性 Asp 残基を含む SpyTag)と小さなタンパク質(反応性 Lys 残基と触媒の三重鎖形成に必要な Glu 残基を含む SpyCatcher)を得ることができました。この反応は、pH、温度、バッファーの多様な条件下で高い収率で起こります。2 つの成分(SpyTag2 と SpyCatcher2)の最適化(Keeble et al. 2017)に続き、反応時間を数時間から数分に短縮し(図 1)、その後、さらに反応速度を上げる改良(SpyTag3 と SpyCatcher3)をしています

(Keeble et al. 2019)。

SpyTag と SpyCatcher は全てのバージョンで互換性があります。



- 自発的(自己触媒的)反応
- 2 価のイソペプチド結合の形成、不可逆的
- 高速で定量的な反応
- pH5~8、温度+4~+37°C
- 緩衝液に強く、Ca²⁺/Mg²⁺を必要としない
- 洗浄剤(detergents)に強い
- 細胞内でも反応する(in vivo)

図 1. SpyTag2 と SpyCatcher2 の反応は、混ぜるだけで済み、迅速かつ高収率で、特異性が高い。

SpyTag テクノロジーによるリコンビナント抗体

バイオ・ラッドは、SpyTag テクノロジーとリコンビナント抗体の発現を組み合わせ、抗体に全く新しい多様性を導入しました(Hentrich et al.2021)。

SpyTag2 は、遺伝子工学的にリコンビナント抗体の C 末端に融合されています(図 2;ここでは SpyTag は Fab 抗体断片の重鎖 C 末端に遺伝子工学的に融合されている)。SpyCatcher 由来のアダプターは、混合・インキュベートすることで SpyTag 付抗体とカップリングできるシリーズが作成されています。SpyCatcher には、HRP やビオチンなどの標識が用意されています。2 つの SpyCatcher を遺伝子工学的に連結し、2 価の Fab2 を形成させる BiCatcher や、SpyCatcher を Ig Fcドメインに融合し、2 つの SpyTag Fab との反応後に合成 Ig 様分子を作る FcCatcher などのバリエーションが設計されています(図 3)。SpyTag を持つ Fab は、選択された Catcher と共有結合であるイソペプチド結合を形成し、1 時間以内に標識や複数のフォーマットへの変換が可能になります(図 4)。

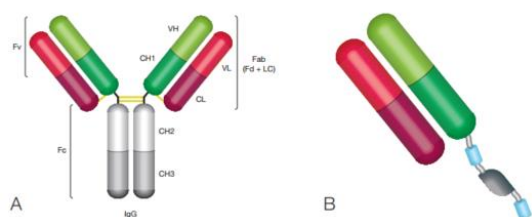


図 2. A: 完全長の免疫グロブリンの模式図
B: SpyTag(灰色)、精製・検出タグ(青)付き一価 Fab フォーマット。

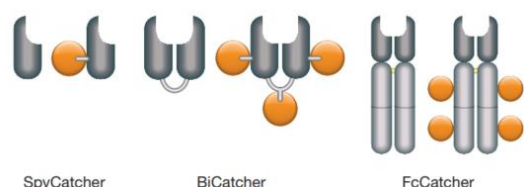


図 3. 異なるキャッチャー(灰色)の非標識(左)と共役(オレンジ色の円、右)の模式的イメージ。SpyCatcher と BiCatcher は、システイン残基を含むように改良され、標識度(DOL: Degree of Labeling)を知ることによって部位特異的なコンジュゲーションが可

Bulletin 3217J

能である。FcCatcher は、一級アミンを介してコンジュゲートされ、DOL が測定されます。

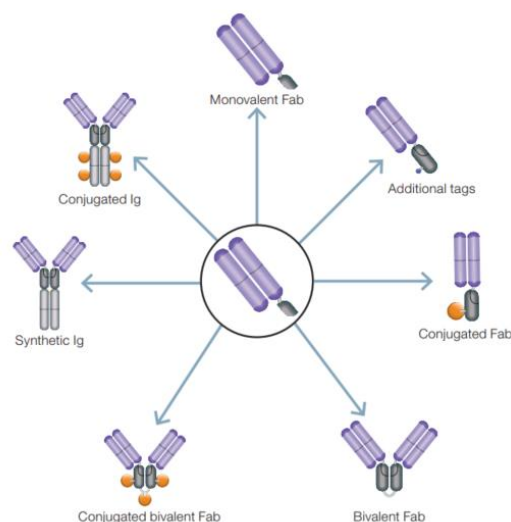


図 4. SpyTag を含む一価 Fab (中央) は、選択したキャッチャーとの共有イソペプチド結合の形成を介して、複数の異なる形状に変換することができます。

SpyCatcher 製品とサービス

すべての SpyCatcher とその誘導体(表 1)は、SpyTag2 を重鎖の C 末端に組み込んだ当社の組換え抗体、例えば FLAG-と His-タグも含むフォーマット Fab-Spy2-H と互換性があります。TrailBlazer カスタム抗体作製サービス*の一環として、SpyCatcher をリコンビナント Fab 抗体にカップリングすることが可能です。また、SpyTag1、SpyTag2、SpyTag3 を持つ抗体やタンパク質にカップリングさせるために、各種 Catcher 製品を購入することも可能です。

表1. SpyCatcher 製品

製品	説明	入手性	
1 価フォーマット		カスタムサービス	カタログ番号
SpyCatcher2	SpyCatcher2 タンパク質	有	TZC001
SpyCatcher2-CYS	システイン残基を1つあるように操作され SpyCatcher2。好みの標識を部位特異的に化学結合させることが可能	有	TZC001CYS
SpyCatcher2:Biotin	SpyCatcher2 にビオチンを標識	有	TZC001B
SpyCatcher2:HRP	SpyCatcher2 に HRP を標識	有	お問い合わせ
SpyCatcher2:PE	SpyCatcher2 に PE を標識	お問い合わせ	お問い合わせ
SpyCatcher3	SpyCatcher3 タンパク質	有	TZC025
SpyCatcher3-CYS	システイン残基を操作した SpyCatcher3。好みの標識を部位特異的に化学結合させることが可能	有	TZC025CYS
二価フォーマット		カスタムサービス	カタログ番号
BiSpyCatcher2	BiSpyCatcher2 タンパク質	有	TZC002
BiSpyCatcher2-CYS	システイン残基が1つあるように操作した SpyCatcher2。好みの標識を部位特異的に化学結合させることが可能	有	TZC002CYS
BiSpyCatcher2-CYS3	システイン残基が3つあるように操作した SpyCatcher2。好みの標識を部位特異的に化学結合させることが可能	有	TZC002CYS3
BiSpyCatcher2:Biotin	SpyCatcher2 にビオチンを標識	有	TZC002B
BiSpyCatcher2:HRP	SpyCatcher2 に HRP を標識	有	TZC002P
BiSpyCatcher2:PE	SpyCatcher2 に PE を標識	有	お問い合わせ
Ig 様フォーマット		カスタムサービス	カタログ番号
higG1-FcSpyCatcher3	ヒト IgG1 のヒンジ領域、CH2、CH3 と融合した SpyCatcher3	有	TZC009
higG1-FcSpyCatcher3:Biotin	ヒト IgG1 のヒンジ領域、CH2、CH3 と融合した SpyCatcher3	有	TZC009B
higG1-FcSpyCatcher3:HRP	HRP 標識 Human IgG1-FcSpyCatcher3	有	お問い合わせ
higG2-FcSpyCatcher3	ヒト IgG2 のヒンジ領域、CH2、CH3 と融合した SpyCatcher3	有	TZC016
higG3-FcSpyCatcher3	ヒト IgG3 のヒンジ領域、CH2、CH3 と融合した SpyCatcher3	有	TZC017
higG4-FcSpyCatcher3	ヒト IgG4 のヒンジ領域、CH2、CH3 と融合した SpyCatcher3	有	TZC018
higG4-Pro-	ヒト IgG4-	有	TZC019

FcSpyCatcher3	Pro(S228P)のヒンジ領域、CH2、CH3 と融合した SpyCatcher3。		
higA-FcSpyCatcher3	ヒト IgA1 のヒンジ領域、CH2、CH3 と融合した SpyCatcher3	有	TZC020
mlgG2a-FcSpyCatcher3	マウス IgG2a のヒンジ領域、CH2、CH3 と融合した SpyCatcher3	有	TZC012
rlgG-FcSpyCatcher3	ウサギ IgG のヒンジ領域、CH2、CH3 と融合した SpyCatcher3	有	TZC013

SpyCatcher, BiSpyCatcher, FcSpyCatcher への Fab 抗体のカップリングプロトコール

SpyTag と SpyCatcher のカップリング反応は、簡単で高速です。

1. カップリングさせたい Fab の量から、必要な Fab と SpyCatcher 製品の量を計算する。
2. Fab と SpyCatcher 製品を混合する。
3. RT で 1 時間インキュベートする。

詳細なプロトコールは、弊社ホームページでご覧いただけます。本ガイドラインは、反応性 SpyTag を持つタンパク質を SpyCatcher 製品にカップリングさせる場合にも適用できます。

bio-rad-antibodies.com/spycatcher でプロトコールをダウンロードして頂けます。

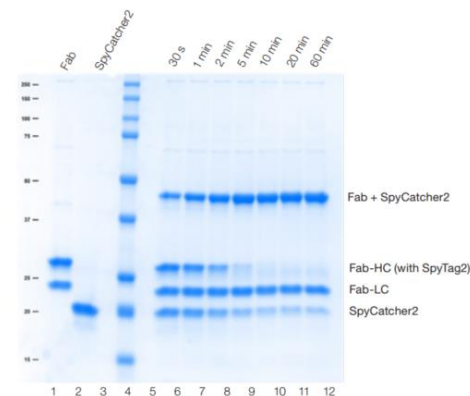


図 5. SpyTag-SpyCatcher 反応のカップリングの例。His-SpyCatcher2(カタログ番号:TZC001)のカップリングカインेटクスを Criterion TGX Stain-Free AnykD(カタログ番号:5678125)上で解析したものです。SpyTag 付 Fab(AbD35759, Fab-F-Spy2-H format)をレーン 1 に、His-SpyCatcher2 をレーン 2、レーン 4 には、プレジジョン Plus Protein 未着色スタンダード (カタログ番号:1610363)、レーン 6-12 には、Fab と 25%モル過剰の His-SpyCatcher2 とのカップリング反応物(RT)をアブライした。4X Laemmli サンプルバッファー (カタログ番号:1610747)を添加し、指定時刻に反応を停止させた。すべてのレーンに 3ug タンパク質量をロードしました。

よくあるご質問 (FAQs: Frequently Asked Questions)

#	質問	回答																												
1	SpyTag と SpyCatcher の生物物理学的なパラメーターを教えてください？	表 2. オリジナルの SpyTag および SpyCatcher タンパク質の生物物理学的パラメータ <table><thead><tr><th>Element</th><th>Size (in Amino Acids)</th><th>Calculated Isoelectric Point, pI</th><th>Calculated Molecular Weight* (kD)</th></tr></thead><tbody><tr><td>SpyTag1</td><td>13</td><td>8.95</td><td>1.47</td></tr><tr><td>SpyTag2</td><td>14</td><td>9.87</td><td>1.68</td></tr><tr><td>SpyTag3</td><td>16</td><td>10.37</td><td>1.93</td></tr><tr><td>SpyCatcher1</td><td>113</td><td>4.17</td><td>12.14</td></tr><tr><td>SpyCatcher2</td><td>113</td><td>4.12</td><td>12.08</td></tr><tr><td>SpyCatcher3</td><td>113</td><td>3.91</td><td>12.13</td></tr></tbody></table> バイオ・ラッドの SpyCatcher 各種タンパク質および誘導体の分子量は、タグやリンカーを追加することで異なるため、各製品のデータシートを参照してください。	Element	Size (in Amino Acids)	Calculated Isoelectric Point, pI	Calculated Molecular Weight* (kD)	SpyTag1	13	8.95	1.47	SpyTag2	14	9.87	1.68	SpyTag3	16	10.37	1.93	SpyCatcher1	113	4.17	12.14	SpyCatcher2	113	4.12	12.08	SpyCatcher3	113	3.91	12.13
Element	Size (in Amino Acids)	Calculated Isoelectric Point, pI	Calculated Molecular Weight* (kD)																											
SpyTag1	13	8.95	1.47																											
SpyTag2	14	9.87	1.68																											
SpyTag3	16	10.37	1.93																											
SpyCatcher1	113	4.17	12.14																											
SpyCatcher2	113	4.12	12.08																											
SpyCatcher3	113	3.91	12.13																											
2	SpyTag、SpyTag2、SpyTag3 と SpyCatcher、SpyCatcher2、SpyCatcher3 の違いは何ですか？	SpyTag と SpyCatcher は、<i>S. pyogenes</i> のフィブロネクチン結合タンパク質に基づいて開発されました。このペアをファージディスプレイにより反応速度を最適化し、SpyTag2 と SpyCatcher2 となり、オリジナルのペアより 10 倍速く反応しイソペプチド結合を形成します。SpyTag2 と SpyCatcher2 をさらに合理的設計によって最適化され、反応速度がさらに 10 倍向上した SpyTag3 と SpyCatcher3 が作製されました。 すべての SpyTag と SpyCatcher のバージョンに互換性があります。TrailBlazer カスタム抗体には SpyTag2 が含まれています。SpyTag2 のカップリング速度は、弊社の抗体カップリングプロトコルで推奨する濃度では、SpyTag3 と同等です。																												
3	FcCatcher には SpyCatcher3、それ以外の Catcher には SpyCatcher2 が何故使われているのですか？	当社の SpyCatcher と BiCatcher は、SpyCatcher3 が登場する以前、SpyCatcher2 を使って開発されたものです。Fc キャッチャーは、SpyCatcher3 が利用可能になった後に開発されました。SpyCatcher3 を SpyCatcher と BiCatcher で使用するためにテストしましたが、バージョン 3 はバージョン 2 よりも大きなパフォーマンス上の利点が見られなかったため、これらの製品は引き続き SpyCatcher2 を使用して製造されています。																												
4	SpyTag-SpyCatcher の結合は安定していますか？	タンパク質が結合してできるイソペプチド結合は、タンパク質内のアミノ酸間の他のペプチド結合と同様に安定であると考えられており、この結合は不可逆的であると考えられています。																												
5	SpyTag や SpyCatcher は、細胞やライセート中の他のタンパク質と反応することがありますか？	SpyTag-SpyCatcher タンパク質のライゲーション反応は、非常に特異的です。 2 つの要素のどちらも、細胞やライセート中の他のタンパク質と反応しないことが確認されています。																												
6	抗体と直接標識するのではなく、SpyCatcher を経由して標識する方が良いのはなぜですか？	標識済み Catcher タンパク質は、簡単、迅速、柔軟、そして標識結合方向を指定して使用することができます。 従来の抗体標識はランダムなプロセスであり、各抗体は異なる位置に異なる数のラベルが標識されていました。そのため、抗体の抗原結合部位にラベルが結合し、試薬の性能が低下することがあります。 標識済み Catcher は、抗体の C 末端に一定の化学量論で結合され、抗体結合部位は修飾されません。 さらに、SpyCatcher および BiCatcher では、部位特異的にビオチンなどの標識と結合できる遊離チオール基を設計しており、一定の標識度 (DOL: degree of labeling) を得ることができます。SpyTag 付抗体は、簡単な混合操作で、どの Catcher にも結合させることができます。これにより、アッセイデザインの柔軟性が飛躍的に向上します。																												
7	SpyCatcher のラベルは、どのようにして部位特異的に標識されるのですか？	SpyCatcher2、SpyCatcher3 はシステイン (Cys) を 1 つ含むように、BiCatcher2 はシステインを 1 つまたは 3 つ含むように遺伝子工学的に設計されています。 これらの Cys 残基は、例えばマレイミド法による部位特異的標識に利用することができ、これらの Catcher に固定 DOL で付与することができます。 FcCatcher 製品では、不自然なフォールディングを避けるため、シ																												

#	質問	回答
		ステイン残基を追加で導入していません。FcCatcher は一級アミンを介して標識されているため、部位特異的な標識はありません。しかし、標識プロトコールは制御されており、バッチ間で一貫したDOL が確保されています。FcCatcher は SpyTag 付抗体フラグメントに結合する前に標識されるため、抗体の抗原結合部位が損なわれることはありません。
8	Catcher タンパク質は、どのようなプローブや標識と結合することができますか？	未標識の SpyCatcher および BiCatcher は、お客様が選択したラベルで標識することが可能です。SpyCatcher および BiCatcher タンパク質は、マレイミド法などを用いてチオール反応性基を介して部位特異的に標識できるように、遊離システイン残基を持つものが用意されています。また、NHS エステル反応により、一級アミンを介したランダムな標識も可能です。
9	SpyTag-SpyCatcher 技術は、どのような抗体にも使用できるのですか？	C 末端に SpyTag を持つリコンビナント抗体を作製し、SpyCatcher で使用することが可能です。カスタムサービスプロジェクトの実現可能性については、弊社までお問い合わせください。
10	合成 Ig 様抗体の組成は？	SpyCatcher3 は、その C 末端で Ig ヒンジ領域の N 末端と、抗体 Fc ドメインの定常ドメイン (IgG1 の場合は CH2 および CH3) と遺伝子工学的に融合しています。このコンストラクトは FcCatcher と命名された。C 末端に SpyTag を持つ抗体は、FcCatcher と共有結合し、Ig 様分子を形成することができます。 当社のコンストラクトは、通常、ファージディスプレイで得られた完全ヒト Fab 断片 (完全な軽鎖と VH および CH1 ドメインを含む重鎖を含む) を使用しています。重鎖の C 末端には、通常 FLAG-tag、SpyTag2、His-tag といった一連のタグが遺伝子工学的に付加されています。
11	カップリング反応における SpyTag と SpyCatcher の比率はどのくらいですか？また、カップリング後の製品に未結合の Fab や Catcher は残りますか？	ライゲーション反応を完了させるために、1 つのライゲーションパートナーを過剰に使用することを推奨します。 ■ 一価 SpyCatcher: すべての Fab 抗体が SpyCatcher と反応し、結合していることを確認するために、25% 過剰の一価 SpyCatcher を使用します; 不均一アッセイを行う場合、過剰の SpyCatcher は洗い流されます。 ■ 二価の SpyCatcher (例: BiSpyCatcher2 または FcSpyCatcher3): 二価の SpyCatcher では、25% 過剰の SpyTag 付 Fab を使用し、すべての Catcher が 2 つの Fab を持つようにします。経験上、二価の結合体は通常より高い親和性で結合し、一価の結合していない Fab に取って代わるため、少量の未反応 Fab はアッセイに干渉せず、感度を低下させることもありません。 1:1 の比率でカップリング反応を設定することも可能ですが、タンパク質濃度測定 of 誤差により、この比率から外れたり、カップリング化学量論が予測できない場合があります。
12	タンパク質のライゲーション反応にはどれくらいの時間がかかるのですか？	当社のプロトコールでは、ライゲーション反応が完了するまでに 1 時間を推奨しています。SpyTag2 と一価 SpyCatcher2 のライゲーションは 10 分程度で完了します。BiSpyCatcher2 および FcSpyCatcher3 への結合は、2 つの SpyTag 付き Fab 抗体をそれぞれの 2 価の Catcher 分子に結合させる必要があるため、数分長くかかります。プロトコールを簡略化するため、すべての Catcher に対して 1 時間のカップリング時間を推奨しています。また、一晚反応させることも可能です。 SpyTag3 については、SpyTag2 と同じ反応時間を推奨します。SpyTag1 については、カップリング速度論が濃度依存性であるため、実験的に決定する必要があるため、かなり長いカップリング時間を必要とします。
13	高バックグラウンドが検出された場合、どのように低減することができますか？	Catcher に結合した Fab 抗体は、異なるフォーマットの同じ抗体クローンと同じバックグラウンドを示すと予想されます。高いバックグラウンドが観察される場合、まず様々な希釈倍率でテストし、抗体濃度を最適化することが推奨されます。未同定抗体を使用する場合、標識抗体と未標識抗体を並行してテストし、両方に同じ二

#	質問	回答
		次検出抗体を使用することができます。 ウエスタンブロット実験では、HeLa 細胞など一部の動物細胞ライセートで 50kD 前後の微弱な追加バンドが観察されたが、これは調製液中の未反応 SpyCatcher に起因するものでした。このバンドは、カップリング後にフリーの SpyTag3 ペプチド(カタログ番号:BLP086)を添加し、5 分間インキュベートすることで完全に除去することができます。これにより、SpyTag3 ペプチドは未カップリングの Catcher に結合し、50kD タンパク質との結合を完全にブロックすることができます。Fab と FcCatcher をカップリングしたものをウエスタンブロットングに使用する場合、メンブレンのバックグラウンド染色を避けるため、PVDF ではなくニトロセルロースメンブレンを使用することをお勧めします。 SpyTag 付キャプチャー抗体と Catcher 結合検出抗体を用いたサンドイッチまたはブリッジング ELISA では、キャプチャー抗体の SpyTag と反応する SpyCatcher 部位が未反応のため、バックグラウンドが増加する可能性があります。この現象は、SpyTag3 ペプチド(カタログ番号:BLP086)をキャプチャー検出抗体に添加することで防ぐことができます。 SpyCatcher 部位に対して 2.5 倍モル過剰のペプチド、すなわち SpyCatcher-結合抗体では 2.5 倍過剰、BiCatcher-および FcCatcher-結合抗体では 5 倍過剰を使用し、少なくとも 5 分間インキュベートすることを推奨します。
14	SpyTag-SpyCatcher 結合抗体は、従来の抗体と性能に違いはありますか？	SpyTag-SpyCatcher 結合抗体は、同じアプリケーションにおける他の一価または二価の Fab 抗体や完全長 Ig と同じように機能することが期待されます。SpyTag Fab 抗体と標識済 Catcher タンパク質の結合により、従来の抗体のランダムラベルのように標識が抗体の抗原結合部位に付加される可能性を避けることができます。これにより、SpyTag-SpyCatcher 結合抗体の性能が向上し、その結果、通常より低い濃度で測定が可能になります。
15	合成 Ig 様抗体は、従来の完全長 Ig と全く同じように機能するのでしょうか？	この 2 つのフォーマットの抗体-抗原結合部位は同一であり、したがって結合特異性は同じです。両分子とも二価であり、同じ親和性を持っています。当社の FcCatcher タンパク質は、当社の完全長 Ig と同じプロセスを用いて哺乳類細胞株で生産されており、グリコシル化を含む Fc ドメインが同一となっています。Ig 様分子と完全長 Ig の構造は同一ではないため、両者のコンフォメーションは完全には一致せず、このような形状の違いが特定のアクセシビリティに影響を与える可能性があります。Fab は <i>E.coli</i> で生産されるため、調製品には細菌膜由来のリポポリサッカライド(エンドキシン)が含まれます。 必要に応じて、Catcher にカップリングする前にエンドキシンのレベルを下げるすることができます。
16	SpyTag 技術により、抗体をビーズや樹脂に固定化することは可能ですか？	ビオチン化 Catcher タンパク質と結合した SpyTag 付 Fab 抗体は、ストレプトアビジン-結合ビーズに捕捉させることができます。Fab とビオチン化 Catcher (SpyCatcher2:Bio または BiSpyCatcher2:Bio)を結合してビーズに固定化する場合、Fab を過剰に使用し、溶液に未反応の SpyCatcher 部位が含まれないようにすることが推奨されます。未反応の Fab は、ストレプトアビジンビーズとの反応後、洗浄工程で除去されます。 また、SpyCatcher3-CYS のようにシステインを介して部位特異的に、あるいは SpyCatcher3 のように一級アミンを介して、ビーズやカラム樹脂に直接固定化することも可能です。SpyTag 付抗体と SpyCatcher 樹脂を 1 時間インキュベートするだけで、SpyCatcher 樹脂上に抗体を固定化し、配向させることができます。
17	SpyTag-SpyCatcher 技術を使って、他のタンパク質と結合させることはできますか？	SpyCatcher ドメインを持つタンパク質であれば、SpyTag 付抗体とカップリングさせることができます。遺伝子工学を利用して、目的のタンパク質の N 末端または C 末端に SpyCatcher を融合させた融合タンパク質を作製することをお勧めします。
18	一般的な抗 Fab 抗体や抗 Ig 抗体の二次抗体に	抗 FLAG タグ、抗 His タグ、抗ヒト Fab の 2 次抗体と、SpyTag 付き Fab 抗体、SpyCatcher タンパク質が結合したものを、結合してい

#	質問	回答
	SpyCatcher 結合抗体を使用することは可能ですか？	ないものの両方を使用することに成功しています。 また、抗ヒト、マウス、ウサギの Fc、抗 IgG(H+L) 特異的な二次抗体も、それぞれの FcCatcher 結合抗体に使用することが可能です。SpyCatcher および BiCatcher は 6-His タグを有しており、検出に使用することができます。FcCatcher には追加のタグはありません。
19	ELISA において、HRP 標識 Catcher に結合した SpyTag 付 Fab を、HRP 標識の従来の抗体と同様に検出抗体として使用することは可能ですか？	ELISA で検出抗体として使用する場合、選択した Fab を HRP 標識した BiCatcher (BiSpyCatcher2:HRP) または FcCatcher (hlgG1-FcSpyCatcher3:HRP) にカップリングすることを推奨します。SpyTag-SpyCatcher 結合抗体は、同じクローンを全長 IgG フォーマットで直接 HRP に結合させるよりも 4~10 倍低い濃度で使用でき、同じアッセイ感度という結果になりました。 SpyTag 付キャプチャー抗体と HRP 標識 Catcher タンパク質とを組み合わせるとサンドイッチアッセイやブリッジングアッセイを行う場合、キャプチャー抗体の SpyTag と反応する検出抗体の Catcher 部位が一部未結合のため、バックグラウンドが増加することがあります。SpyTag3 ペプチド(カタログ番号:BLP086)を加えた検出抗体では、このようなバックグラウンドが解消されます。 SpyCatcher 結合部位に対して 2.5 倍モル過剰のペプチド、すなわち SpyCatcher- では 2.5 倍過剰、BiCatcher- および FcCatcher- 結合抗体では 5 倍過剰を使用し、少なくとも 5 分間インキュベートすることを推奨します。
20	ELISA プレートなどの表面に抗体を固定化するために、SpyTag を使用することはできますか？	SpyCatcher は ELISA プレートに直接コーティングすることも、ビオチン化した Catcher をストレプトアビジン-コートしたプレートに固相化することも可能です。表面でのカップリング反応は溶液中と比較して遅く、使用する抗体濃度も通常のカップリング反応より低いいため、1 時間経過しても反応が完了しない場合があります。 抗体を SpyCatcher 表面にカップリングさせることにより、受動吸着による固相化に比べ、より活性の高い抗体を得ることができます。そのため、同じシグナルをより低い抗体濃度で検出可能になります。 また、ビオチン標識 SpyCatcher(SpyCatcher:Bio)に Fab を結合させ、ストレプトアビジン-コートしたプレートにビオチン化抗体を固相化することも可能です。

ご注文とお問い合わせ

*TrailBlazer カスタム抗体作製サービス

日本国内では、ジーンフロンティア株式会社を窓口として提供しております。詳しくは、ジーンフロンティア株式会社(<https://www.genefrontier.com>) またはバイオ・ラッド(メール:life_ps_jp@bio-rad.com)までお問い合わせください。利用制限がございますので下記をご参照ください。

[HuCAL 人工抗体の利用制限について]

HuCAL 人工合成作成サービスでご提供いたします抗体は、研究用途でのご使用に制限されており、医薬開発(therapeutic, prophylactic, palliativeを含む)目的でご使用頂くことはできません。
また、商業利用、治験内および診断用途等でご使用される場合は、別途契約が必要となります。
HuCAL generated antibodies are not intended for use in humans, and may not be used for therapeutic, prophylactic or palliative purposes. Bio-Rad is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. in certain jurisdictions. HuCAL, HuCAL PLATINUM, CysDisplay and RapMAT are trademarks of MorphoSys AG.

SpyCatcher カタログ製品

バイオ・ラッド並びにバイオ・ラッド販売代理店へお問い合わせください。

価格等:<https://bio-rad-antibody.jp>

References

Hentrich C et al. (2021). Periplasmic expression of SpyTagged antibody fragments enables rapid modular antibody assembly. Cell Chemical Biology 28, 1–12. [bioRxiv preprint](#)

Keeble et al. (2017). Evolving accelerated amidation by SpyTag/SpyCatcher to analyze membrane dynamics. Angew Chem Int Ed 56(52), 16,521–16,525

Keeble et al. (2019). Approaching infinite affinity through engineering of peptide–protein interaction. PNAS 116(52), 26,523–26,533

Keeble A and Howarth M (2020). Power to the protein: Enhancing and combining activities using the Spy toolbox. Chem. Sci., 11, 7,281–7,291.

Zakeri B et al. (2012). Peptide Tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. PNAS 109(12), 690–697.



バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

ライフサイエンス

bio-rad.com

本社 〒140-0002 東京都品川区東品川 2-2-24 Tel : 03-6361-7000 Fax : 03-5463-8480

製品の学術的なお問い合わせは

Mail : life_ps_jp@bio-rad.com Tel : 03-6404-0331 Fax : 03-6404-0334

*価格・仕様は予告なく変更になることがあります。
*価格(税抜き)は 2023 年 4 月現在のものです。メーカー希望小売価格です。
*本書に記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。
*本書に記載されている製品は、研究用であり、診断目的にはご利用いただけません。