

Dynabeads を用いたアプリケーション

オルガネラの免疫磁気分離

立教大学理学部生命理学科 後藤 聡 先生

【Keywords】細胞小器官、免疫磁気分離、二次抗体結合ビーズ

概要

ある特定のオルガネラ（細胞小器官）に局在するタンパク質や脂質組成を調べるための、オルガネラの単離方法をご紹介します。オルガネラの精製には、密度勾配などを使った分離方法がありますが、ここではオルガネラに特異的な抗体を用いて免疫磁気分離します。本方法はサンプル量が少ない時などに有用です。また、protein G sepharose などを用いるより、サイズと表面形状が均一な磁性担体である Dynabeads を用いる方が、バックグラウンドの軽減につながるのをお勧めです。

準備するもの

- 二次抗体結合 Dynabeads (DynaLife Technologies 社)
- Dynabeads 用磁石 DynaMag (DynaLife Technologies 社)
- 一次抗体（集めたいオルガネラの細胞質側を認識できるもの）
- DMP, Dimethyl pimelimidate・2HCl (Thermo Scientific #21666); 抗体を架橋化する場合のみ使用
- 適当なホモジナイズバッファー
(例: 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂ with protease inhibitor, pH7.5)
- ダウンス型（或いはポッター型）ホモジナイザー

プロトコール

<実験1 免疫磁気ビーズの作成>

Dynabeads の製品マニュアルに従う。簡単には以下のように行う。

1. 必要量のビーズを分注し、0.1% BSA/PBS で3回洗浄する（以降、洗浄には磁石を使用）。
2. 最初の分注と等量の0.1% BSA/PBS に懸濁する。
3. マニュアルに記載された結合量に従って一次抗体を加え、ローテーターで4℃、2時間インキュベートする。
4. 0.1% BSA/PBS で3回洗浄する。

(オプション - 抗体の架橋化)

以下は抗体の架橋化を行うためのステップなので、オルガネラ分離後の解析時に一次抗体を溶出させたくない場合に行う。

5. 0.2M トリエタノールアミン (pH8.2) で3回洗浄する。
6. 20 mM DMP/0.2M トリエタノールアミンを加え、ローテーターで、室温、20分インキュベートする。
7. 50 mM Tris-HCl (pH7.5) に換え、ローテーターで室温、15分インキュベートする。
8. 0.1% BSA/PBS で3回洗浄する。

<実験2 オルガネラの分離>

1. 組織および細胞を、ホモジナイズバッファー中でホモジナイズする。
2. 1,000 g で5分間遠心分離する。
3. 上清を回収する。
4. 実験1で作成した免疫磁気ビーズを、使用直前に0.1% BSA/PBS で洗浄し、3.の上清に加える。
5. ローテーターで4℃、1時間インキュベートする。
6. ホモジナイズバッファーで5回洗浄する。
7. 最後に洗浄液をきれいに取り去り、ビーズにSDS可溶性バッファーを加えて溶出し、解析に供する。

文献中での活用例

- ショウジョウバエ胚ゴルジ体の免疫磁気分離 -

【概要】

2種類の二次抗体結合 Dynabeads を用いて、ショウジョウバエ胚からFRINGECONNECTION (FRC、UDP-sugar transporter) とRHOMBOID (RHO、プロテアーゼ) の各タンパク質を発現するゴルジ体ユニットを免疫磁気分離した。その結果、FRCとRHOが異なるユニットに存在することが示唆された。同時に、固定した胚の免疫蛍光染色によっても同様のことが示唆された。

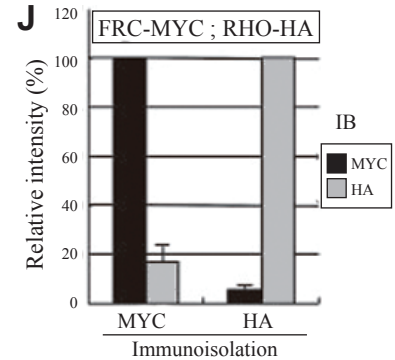
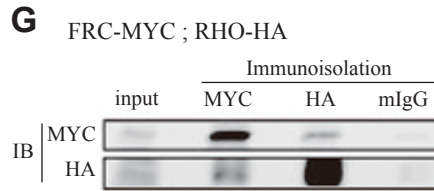
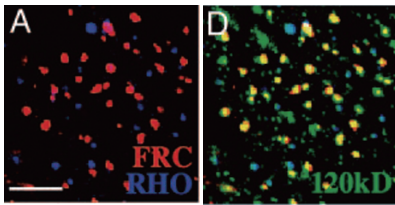


【方法】

ハエ胚に、MYC タグを付けた FRC (FRC-MYC) と HA タグを付けた RHO (RHO-HA) を共発現させた。免疫蛍光染色には固定した胚を用い、一次抗体に anti-MYC、anti-HA、および anti-120-kDa protein 抗体を使用した。免疫磁気分離は以下のように行った。凍結保存した 0.1 g の胚に Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, protease inhibitors) を加え、氷上でダウンス型ホモジナイザーを使用してホモジナイズした。1,000 g、4℃、5 分遠心して上清を回収し、anti-MYC 抗体と anti-HA 抗体を結合・架橋化した Dynabeads を加えて 4℃、1 時間インキュベートした。ビーズを回収して洗浄し、SDS-PAGE sample buffer 中でボイルして SDS-PAGE を行った。ウェスタンブロッティングは、一次抗体に anti-MYC および anti-HA 抗体、二次抗体に HRP 結合 anti-rabbit IgG 抗体を用いた。

【結果】

免疫蛍光染色では、anti-120-kDa protein により染色される全ゴルジ体ユニットのうち 88% が、anti-MYC か anti-HA 抗体のどちらかのみで染色された (下図 A、D)。一方、ハエ胚から anti-MYC または anti-HA 抗体を用いて免疫磁気分離した画分について、各抗体でウェスタンブロッティングを行い (G)、バンドの濃さを定量化したところ、anti-MYC 抗体で分離した画分には FRC-MYC が RHO-HA の 5.7 倍存在し、anti-HA 抗体で分離した画分には RHO-HA が FRC-MYC の 18 倍存在した (J)。以上の結果から、FRC-MYC と RHO-HA が異なるゴルジ体ユニットに存在することが示唆された。



参考文献

Yano H, Yamamoto-Hino M, Abe M, Kuwahara R, Haraguchi S, Kusaka I, Awano W, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Goto S. (2005) Distinct functional units of the Golgi complex in *Drosophila* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(38):13467-72

種類	商品コード	商品名	梱包単位
二次抗体結合ビーズ	DB11201	Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG	2 mL
	DB11202	Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG	10 mL
	DB11203	Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG	2 mL
	DB11204	Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG	10 mL
	DB11035	Dynabeads M-450 Sheep anti-Rat IgG	5 mL
	DB11039	Dynabeads M-450 Rat anti-Mouse IgM	5 mL
磁石	DB12321	DynaMag-2	1 個 (1.5 mL チューブ x 16 本用)
	DB12320	DynaMag SPIN	1 個 (1.5 mL チューブ x 6 本用)
	DB12303	DynaMag-5	1 個 (5 mL チューブ x 8 本用)
	DB12301	DynaMag-15	1 個 (15 mL チューブ x 4 本用)

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
 TEL.03-3593-3211 (代) FAX.03-3593-3216
 E-mail: veritas@veritastk.co.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>

ベリタスサイエンスレータは株式会社ベリタスが最新の情報のエッセンスを著者の理解を得てお届けしています。
 ご質問・ご意見は(株)ベリタス技術営業部 (TEL: 03-3593-3385 E-Mail: techservice@veritastk.co.jp) までお願致します。

RDBF-12-0165