

Dynabeads® Protein A / Gの免疫沈降

- 概要 -

免疫沈降(IP)は、特異的な抗体により標的タンパク質または抗原を溶液から沈殿させる技術です。

IPはサンプルから標的タンパク質の単離に加え、タンパク質複合体の一部と思われるタンパク質または抗原を標的とすることで細胞抽出液からのタンパク質複合体の単離もできます。

免疫沈降の利用例:

- ・分子量推定、同定または興味のあるタンパク質量の測定
- ・タンパク質-タンパク質相互作用の研究
- ・タンパク質濃度の決定
- ・標的タンパク質の発現レベルの解析

Protein AまたはProtein Gを表面に結合させた均一な超常磁性のDynabeads® (Figure 1A)は、標的タンパク質の高純度な免疫沈降のために最適な磁気ビーズです。キャプチャーした免疫複合体は磁気分離 (Figure 2)により上清から簡単に回収できます。Dynabeads®の磁気分離技術は、簡単で効率的な洗いを可能にします。高純度の沈殿物は、ビーズから溶出したのち、ウエスタンブロットングや質量分析により解析することができます。

実験操作のステップ:

1. サンプル調整
2. 免疫沈降
3. 溶出

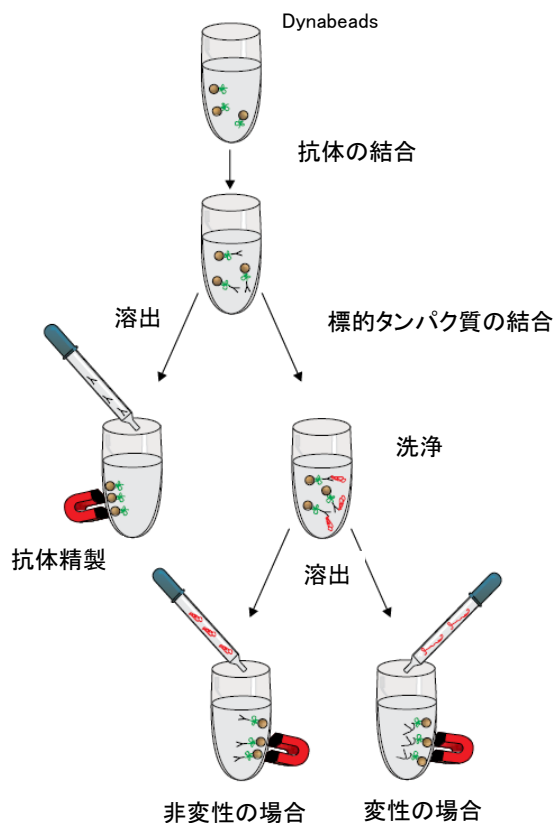


Figure 2—Dynabeads® Protein A / Gによる免疫沈降プロトコル。抗体をキャプチャーしたDynabeads®は、数分でのスモールスケールのIP および Co-IPを容易にします。標的タンパク質/抗原は、少量のバッファーで溶出可能です。個々の溶出プロトコルによっては、ビーズは再利用可能です。

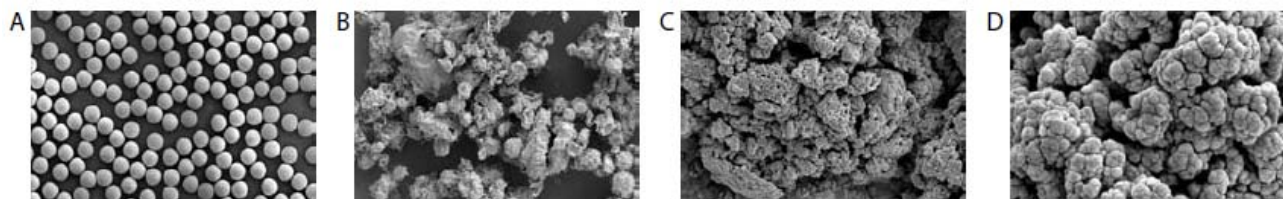


Figure 1—Monosized, superparamagnetic Dynabeads®. A. Dynabeads®は、バッチ内及びバッチ間が非常に均一です。B-D. 他社の磁性粒子

1. サンプル調整:

個々の特異的なIPアプリケーション及び、細胞内(核、細胞質基質、膜など)の標的抗原の局在により、構造を最大限保持するための適切な溶解方法が必要です。イオン強度(塩濃度)、界面活性剤の選択、および溶解バッファのpHは、抗原の構造保持と同様、IP効率に影響します。

界面活性剤の選択は必須であり、多くの因子によって影響を受けます。例えば、抗原の細胞内局在や、サブユニットの関連性、タンパク質-タンパク質相互作用を保存したいかどうか…等です。

タンパク質分解は、リソソームの内容物が、他の細胞区画からの内容物と混ざった時、起こり得ます。

使用する溶解方法にかかわらず、溶解液にはいつもプロテアーゼインヒビターを加えておくことを推奨します。

溶解物の調整に続き、タンパク質濃度を決定し、Lysis bufferまたはphosphate-buffered saline(PBS)で1-5 mg/mlの間に調整します。

細胞溶解に一般的に利用されている2つのバッファ:

- RIPAバッファは、IPでバックグラウンドをおさえます。しかし、いくつかのタンパク質はRIPAバッファにより変性します。もし、タンパク質-タンパク質相互作用のためにIPを行う場合、RIPAは、その相互作用を解離するので利用すべきではありません。
- NP-40バッファは、RIPAバッファに比べて変性させるたんぱく質が少なく、キナーゼ活性研究のリン酸化の実験に利用されます。NP-40はタンパク質-タンパク質相互作用の研究にも使用されます。NP-40はノニオン系界面活性剤であり、IP及び、ウエスタンブロットティングのための細胞溶解液中の界面活性剤として最も利用されています。

2. 免疫沈降:

IPは、直接法もしくは間接法を使い分けて行うことができます。

○直接法

- 標的タンパク質が豊富な時に選ばれる方法
- あらかじめ抗体結合ビーズのストックを用意できる
- 必要とする一次抗体が少なく済む

一次抗体は、製品のプロトコールに記載されているように、Dynabeads® Protein A / Gに結合します。ビーズとサンプルは、転倒・回転下室温もしくは、2-8°Cで混ぜながらインキュベートします。インキュベーション時間は、標的タンパク質の濃度及び、抗体の特異性に依存します(Table 1)。標的タンパク質の濃度が高い時、短いインキュベーション時間(10分)で十分ターゲットの捕捉が可能です。必要に応じて、インキュベーションは1時間まで延長できます。

○間接法

- 標的への抗体のアフィニティーが弱い時や標的タンパク質が少ない時に選ばれる方法
- サンプルとDynabeads®とのインキュベーションを最小限にすることが可能で、バックグラウンドの結合を少なくすることができる

まず、抗原抗体複合体を形成するために一次抗体は、細胞可溶化液とインキュベートします。その複合体は、サンプルにDynabeads® Protein A / Gを添加することでキャプチャーし、続いて磁気分離により回収します。注意点は、過剰の抗体の使用を避けることです。フリーな抗体は、抗原抗体複合体より早くビーズに結合します。そのため、ビーズ状の結合部位がフリーの抗体で満たされ、タンパク質の収量が減少する恐れがあります。

最適濃度を決定するために、一次抗体を適定します。ビーズの結合能に基づいて、一次抗体をキャプチャーするのに必要なビーズ量を計算します。迅速な反応速度及び、最適なタンパク回収を実現するためにインキュベーションの間はサンプルの濃度を維持します。添加するビーズ量は、サンプル量の1/10未満にならないようにします。

☆バッファ選択の注意点:

- 一般的に、タンパク質の可溶化には、弱アルカリpH及び、低イオンバッファが好まれる
- 高い塩濃度及び、酸性pHは、抗原の変性及び、溶液からの沈殿を起こす場合がある
- ノニオン(Tween®, Triton® X-100, NP-40など)または両性イオン(CHAPSなど)の界面活性剤は、非共有結合性のタンパク質-タンパク質相互作用を保存する傾向がある
- イオン性の界面活性剤(SDSおよび、sodium deoxycholate)は、タンパク質-タンパク質相互作用の変性効果を持つ傾向があり、標的抗原を認識する抗体の性能に悪影響を与えることがある

☆プレクリアの注意点:

- Dynabeads® Protein A / Gは、多くのサンプル種において、僅かに非特異結合する。ある種のサンプルにおいては、細胞溶解液中の少量の非特異結合体を減らすためや、プロテインAやプロテインGに高いアフィニティーを持つタンパク質を除去するためにプレクリアを必要とする場合がある
- プレクリアが必要となる場合は、等しい条件下で、非コートDynabeads® Protein A / Gとサンプルを混ぜる。プレクリアは再現性及び、IP手順の定量性を保持するために最小限にした方が良い

○洗浄

Dynabeads®に結合した免疫複合体は、RIPA, PBS, もしくは同等のバッファーで洗浄することができます。バッファーの選択は、下流のアプリケーションに依存します。RIPAバッファーは、PBSより強力であり、PBSを使用する場合は、非特異結合を減少させるため Tween®20 (0.01–0.1%) のようなノニオン界面活性剤を加えます。洗浄液の量は、IPで使用したビーズの量によって調整する必要があります。チューブ壁への吸着によるタンパク質やビーズのロスを避けるため、少ない量での繰り返し洗浄を推奨します(使用したDynabeads® Protein A / Gが50 µlの場合、200 µl x 3回の洗浄が適しています)。

○バックグラウンドの除去

バックグラウンドは、ソースの多様性から生じ、特異的または非特異的結合のどちらも起こる可能性があります。以下に、非特異的バックグラウンドの対処法をいくつか紹介します。

- ・疎水性相互作用を減少させるため界面活性剤を含むバッファーを使用する
- ・イオンの相互作用を減少するために塩濃度を上げる
- ・洗浄の回数を増やす
- ・洗浄時間を増やす
- ・最適な洗浄液を選択する
- ・インキュベーション時間を減らす(直接法)
- ・間接法を適用
- ・初期抗体の量を減らす
- ・プレクリアのステップを加える

ネガティブコントロールに使用する一次抗体は無関係なイムノグロブリンとします。注意点として、通常Protein A / Gまたは、ビーズ表面に対する微量なバックグラウンドの結合があるので、Dynabeads® Protein A / Gだけを、ネガティブコントロールとして使うことはできません。

Table 1—異なるイムノグロブリン(Igs)に対する結合特性. Protein A / Gは、種及び、サブクラスの異なるIgsに対してそれぞれ異なる結合を示します。例えば、ヒトIgG3はProtein A には弱く結合しますが、Protein Gには、強く結合します。S:強い結合; M:中位の結合; W:弱い結合; N:結合しない。

Species	Ig class	Protein A	Protein G
Human	Total Ig	S	S
	IgG1, IgG2, IgG4	S	S
	IgG3	W	S
	IgD	N	N
	IgA, IgM	W	N
	Fab	W	W
Mouse	Total Ig	S	S
	IgG1	W	M
	IgG2a, IgG2b, IgG3	S	S
	IgM	N	N
Rat	Total Ig	W	M
	IgG1	W	M
	IgG2a	N	S
	IgG2b	N	W
Goat	IgG2c	S	S
	Total Ig	W	S
	IgG1	W	S
Sheep	IgG2	S	S
	Total Ig	W	S
Cow	IgG1	W	S
	IgG2	S	S
Horse	Total Ig	W	S
	IgG(ab)	W	N
	IgG(c)	W	N
Rabbit	IgG(T)	N	S
	Total Ig	S	S
Dog	Total Ig	S	W
Cat	Total Ig	S	W
Pig	Total Ig	S	W
Guinea pig	Total Ig	S	W
Chicken	Total Ig	N	N

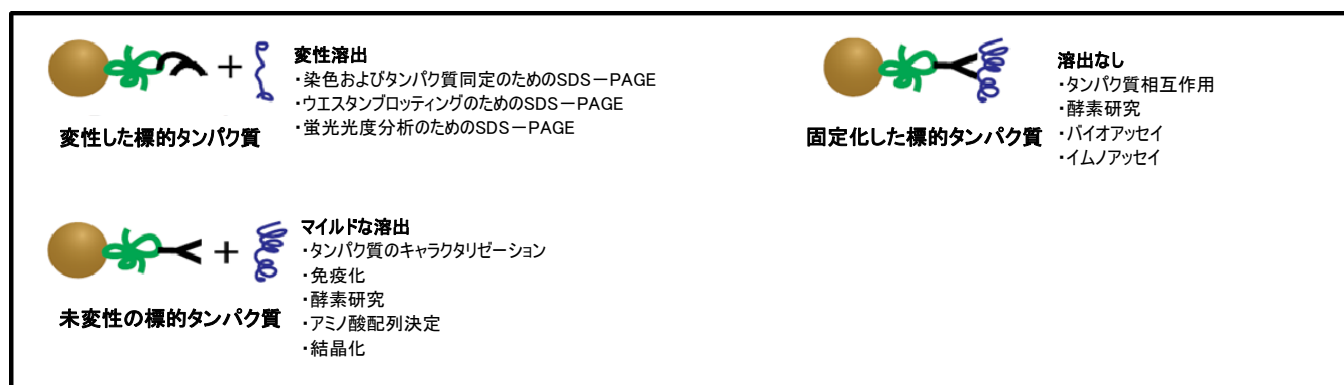


Figure 3—下流アプリケーションの違いに基づいた溶出プロトコールの選択.

3. 溶出:

Dynabeads®抗原抗体複合体はさらに、Co-IP実験に使用することができます。また、抗原は、その後の直接解析のために溶出することができます(例: SDS PAGEの後にウエスタンブロットング)。溶出プロトコールは、下流のアプリケーションに応じて選択することを推奨します(Figure 3)。

注意すべきは、アフィニティー結合一次抗体が標的抗原と共溶出されることです。これは、一般的に下流のアプリケーションには影響しません。しかし、場合によっては、抗体の共溶出を避けるため一次抗体とDynabeads® Protein A / Gを架橋する必要があります。

マイルドな溶出法も、ビーズから標的タンパク質を溶出するのに使うことができます。例えば、タンパク質は、0.1Mクエン酸塩(pH 2-3)のような酸性pHで2分間といった条件で溶出することができます。その後、タンパク質の構造を維持するために生理的pHに戻します。

IPのための他のDynabeads®:

Dynabeads® Protein A / Gに加え、以下のDynabeads®がIPに使用可能です。

- ・ストレプトアビジン結合Dynabeads®—ビオチン化抗体に使用。4つの異なるタイプのストレプトアビジン結合Dynabeads®が利用できる
- ・表面活性化Dynabeads®—ビーズに一次抗体を直接共有結合する場合に使用。標的タンパク質と一次抗体の共溶出を望まない時によく選択される。このDynabeads®は、抗体を結合することができ、その後、使用するために保存可能。保存は、0.02%アジ化ナトリウム(NaN_3)を加え、冷蔵保存
- ・二次抗体結合Dynabeads®—一次抗体と一緒に使用。これらのビーズは、ビーズ表面にマウスまたはラビットIgGに特異的な抗体を持ち、一次抗体がマウスまたはラビット由来の抗体である場合に利用可能

☆架橋の注意点:

- ・抗体の架橋には、最適な結果のために5mM BS_3 (bis(sulfosuccinimidyl) suberate(Pierce社)を推奨するが、他の架橋剤としてDMP (dimethyl pimelimidate) または、DSS (disuccinimidyl suberate)も使用可能
- ・架橋効率、100%ではない。架橋されなかった抗体によるコンタミネーションを防ぐため、酸性pHバッファーを使った溶出のステップを入れる必要がある。ビーズの懸濁液のpHは、溶出後すぐに通常のレベルに戻さなければならない
- ・架橋後であってもSDS-PAGE中のDTTまたは、 β -メルカプトエタノールのような還元剤の使用によって、抗体のジスルフィド結合が還元され、溶出の間に軽鎖が遊離する
- ・抗体中のいくつかの結合サイトが架橋されることもある。もし架橋後アフィニティーの欠損が認められる場合は、架橋を避ける。代替法としてビーズに抗体を共有結合可能な表面活性化Dynabeads®が利用可能

コードNO	品名	製品説明	梱包単位
試薬			
DB10001	Dynabeads® Protein A	Recombinant Protein Aを結合した磁気ビーズ	1mL
DB10002	Dynabeads® Protein A	Recombinant Protein Aを結合した磁気ビーズ	5mL
DB10003	Dynabeads® Protein G	Recombinant Protein Gを結合した磁気ビーズ	1mL
DB10004	Dynabeads® Protein G	Recombinant Protein Gを結合した磁気ビーズ	5mL
DB10006	IP Kit Dynabeads® Protein A	Dynabeads Protein Aと必要なバッファーのコンプリートキット	40回分 (2mL)
DB10007	IP Kit Dynabeads® Protein G	Dynabeads Protein Gと必要なバッファーのコンプリートキット	40回分 (2mL)
器具			
DB12321	DynaMag™-2	1.5-2mLの遠心チューブ16本用マグネット	1 unit
DB12320	DynaMag™-Spin	1.5mLの遠心チューブ6本用マグネット	1 unit

DynaMag™-2



DynaMag™-Spin



販売代理店

DYNAL®
invitrogen bead separations

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/>

RDBF-2952
(09.02.00)V