

Dynabeadsを用いた ファージディスプレイライブラリ構築の自動化

2011 ~ 2012

APPLICATION NOTE

Automated panning of phage display libraries using KingFisher

Matti Hoyhtya, VTT Biotechnology, Helsinki, Finland



Dynabeadsを用いた ファージディスプレイライブラリー構築の自動化

Automated panning of phage display libraries using KingFisher
Matti Hoyhtya, VTT Biotechnology, Helsinki, Finland

概要

今日、抗体断片 (Fab, scFv) は、免疫システムを再現するために大量に作製されている。抗体断片を作製するためのベクターやクローニング法は、ここ 10 年で急速に発達してきている。これらの技術により、100 億近い種類の異なる抗体断片を発現するライブラリーを構築することが可能となった。抗体断片を発現するファージパーティクルのスクリーニングは、panning と呼ばれる方法で行われている。panning 法でのセクションは、繰り返し目的の抗原に対し反応させることで行われる。4 ~ 6 回繰り返し panning を行った後、抗原特異的なファージのプールが濃縮され、個々の抗体断片を発言するベクターが単離される。これらの単離されたベクターは、再度、大腸菌へ形質転換し、抗体断片を大量に産生させる。Panning は、一般的に抗原がコートされたマイクロタイタープレートを用いて行われる。しかし、本実験では、抗原がコートされた磁気ビーズ (Dynabeads) を用いて行った。

方法

Dynabeads を用いた panning

1. マイクロチューブにビオチン化抗原とストレプトアビジンでコートされた Dynabeads を加え、一晩穏やかに攪拌し、抗原とビーズを結合させる。PBS で 3 回洗浄し、200 μ L KingFisher へ移す。
2. バックグラウンドの結合を抑えるために、100 μ L のファージライブラリーと抗原を結合させていない 20 μ L の Dynabeads を 30 分間穏やかに攪拌する。
3. ライブラリーと 20 μ L の抗原を結合させた Dynabeads を 30 分間穏やかに攪拌しながらインキュベートする。
4. 200 μ L の PBS で 8 回ビーズを洗浄する。(プレートを交換する)
5. ファージパーティクルを 100 μ L の 0.1M グリシン溶液 (pH2.5) で溶出させる。
6. 溶出させたファージパーティクルを 5 μ L の 1M Tris-HCl (pH9) で中和させ、大腸菌への形質転換に用いる。

Dynabeads とは . . . ?

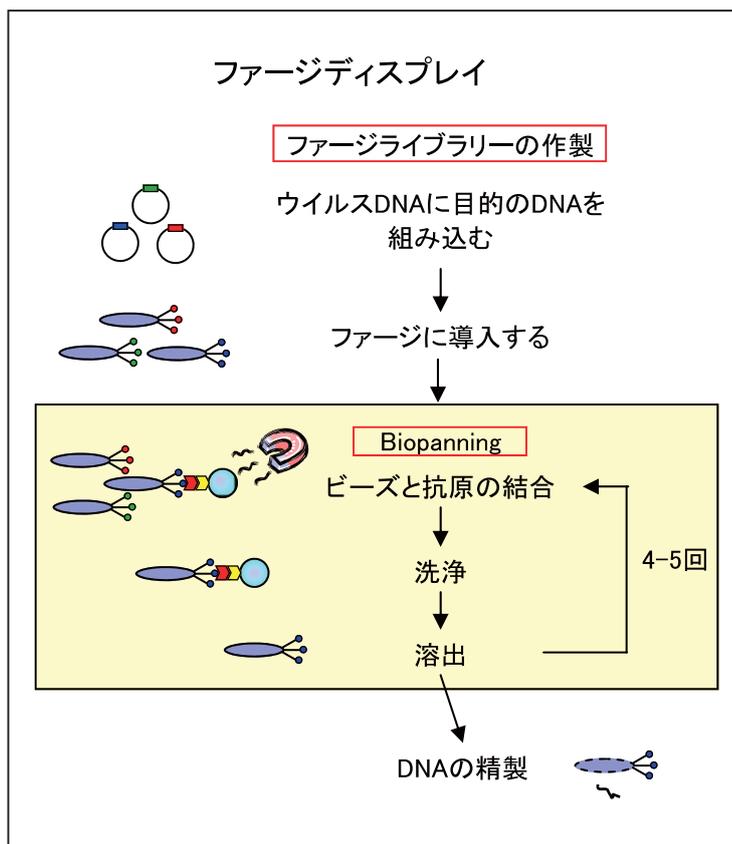
Dynabeads は可磁化物質が一様に分布した高分子ポリマーのコアを親水性ポリマーで覆った、粒刑が均一なビーズです。この高分子ポリマー製磁気ビーズは、IgM 抗体その他のタンパク質の物理吸着に適しています。この表面に種々の抗体を結合したビーズや、ある種のタンパク質あるいはヌクレオチドなどを結合したビーズは、強力磁石 (MPC) を併用することにより、細胞の分離ならびにタンパク質や核酸などの分離・精製をきわめて簡便な操作で、確実に速やかに行うことができます。



結果

ファージライブラリーを発見している抗体断片の panning を Dynabeads と KingFisher を用いて行った。Panning 操作では、リガンドと磁気ビーズの結合、磁気ビーズの洗浄、溶出の操作が含まれる。実験操作の流れを右図に示した。洗浄操作のステップでは、KingFisher が大変有用である。KingFisher を用いると、バックグラウンドのシグナルが大幅に低減される。マニュアル操作と比較すると、バックグラウンドのシグナルは、1/500 である。

また、KingFisher により操作時間が大幅に削減される。KingFisher とマニュアル操作で得られる結果には大きな違いは見られなかった。このように、KingFisher によりファージディスプレイを自動化することが可能であり、その時には Dynabeads が必須である。



結論

Dynabeads は、Panning に非常に適したものであり、マニュアル操作で行うよりも、操作時間を大幅に短縮することが可能である。Dynabeads は、その他、多くのファージディスプレイライブラリーの構築に応用することができる。



自動化機器 KingFisher

参考文献

Barbas et al.,(1991) Assembly of Combinatorial Antibody Libraries on Phage Surfaces: The Gene III Site. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,88(18):7978-82

Hoogen et al.(1991),Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage:methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains.Nucl.Acids Res.,19,(15),4133-7

今回使用したビーズ

商品コード	商品名	梱包単位	希望小売価格
DB65601	Dynabeads MyOne Streptavidin T1	2 mL	¥55,000
DB65602	Dynabeads MyOne Streptavidin T1	10 mL	¥202,000

その他、各種精製用磁気ビーズも取り揃えております。

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/>

