

VERITAS SCIENCE LETTER

～ Dynabeads ～

Basic Research Vol. 1, 2011

低いバックグラウンドと高い S/N 比で、免疫沈降の迅速かつ再現性に優れた結果を実現

磁気ビーズは Sepharose® (/agarose) よりも免疫沈降に適した技術

序文

免疫沈降 (IP) は、特異的な抗体との相互作用を介して溶液から標的タンパク質を捕捉するために広く使用されている手法である。IP の方法は複数あるが、最近多くの研究者に使用されているのは Sepharose® (/agarose) および磁気ビーズ法である。

この 5 年間で、多数の研究者が IP に磁気ビーズ法を用いるようになった。ライフテクノロジーズ社は、*Nature* 誌に掲載された論文中で用いられた IP 法についての解析をおこなった。この解析の結果、従来の Sepharose® (/agarose) ではなく特定の磁気ビーズを使用した発表論文の数が 5 年間で 200% 近く増加したことが明らかになった。(図 1)

この白書では、磁気ビーズ法が Sepharose® (/agarose) に比べて IP に適している理由を下記に挙げて説明する。

- ・タンパク質を迅速に分離できる
- ・高い S/N 比が実現できる
- ・再現性のある結果が得られる

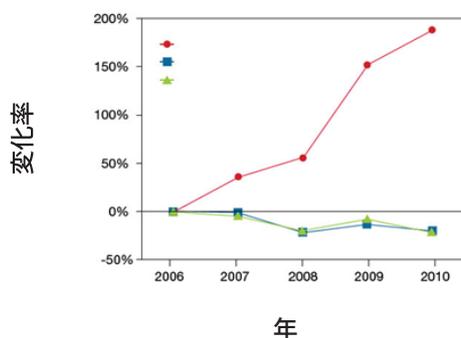


図 1. *Nature* に発表された免疫沈降 (IP) に関する論文の本数
agarose (緑)、Sepharose (青) または一定の種類磁気ビーズ (赤)
が IP に使用されている *Nature* 発表論文本数の増加率または減少率。
出店: Google Scholar, 2011 年 2 月。

磁気分離技術

単一タンパク質の IP や、複数のタンパク質をタンパク質複合体として分離する共免疫沈降法 (Co-IP) において、磁気ビーズが選択される機会が増えている。ビーズは磁性を帯びているため、溶液中の目的分子を迅速かつ穏やかな条件下で分離できる。抗体を固定化したビーズやタンパク質を結合させたビーズをチューブの壁面に引き寄せることで、ビーズに結合していない分子を含む上清を遠心分離なしで除去できる。

磁気ビーズには複数の種類があり、粒子のサイズと均一性に基づいて分類できる。単分散磁気ビーズは球状でサイズが均一であるため、すべてのビーズが同じ結合能を有し、磁石に対し同じ反応を示す。一方、多分散粒子はサイズが不均一で、これが結合能と磁石への反応の両方に影響し、結果にばらつきが生じる可能性がある。IP でもっとも再現性の高い結果が得られるのは、タンパク質が均一に結合する表面を持つ単分散磁気ビーズを使用したときである。

Sepharose および Agarose 技術

Sepharose® (/agarose) は、生体分子分離用のレジンとして使用されるゼラチン状の多孔質基質である。Sepharose® (/agarose) は多孔性で総表面積が大きいため、タンパク質捕捉に使用する抗体の固定化容量が大きく、目的タンパク質に対する潜在的な結合能は高い。しかし、内部に固定化された抗体にはタンパク質が接触できないことがあるため、標的タンパク質、特に複合体中の標的タンパク質をすべて捕捉することはできない。

小径で均一な磁気ビーズと比べ、多孔性の Sepharose® (/agarose) には拡散距離が大きい、反応速度が遅く、インキュベーション時間が長いといった欠点がある。

また、不要なタンパク質が多孔性の Sepharose® ビーズの内部やビーズ間に捕捉されるコンタミネーションおよび

びバックグラウンドシグナルの増大を回避するためには十分な洗浄を必要とする。洗浄操作には遠心分離がおこなわれるが、これによってタンパク質複合体が破壊されることがある。また、IP を完了させるために必要な時間が長くなる。

迅速な免疫沈降

反応速度が速く、インキュベーション時間が短かければ、実験時間の短縮に役立つだけでなく、得られたデータの全体的な品質が改善される。IP を1時間以内で行える技術はいくつか存在するが、ある磁気ビーズを用いたプロトコルでは30分という短時間でIPを行える。典型的なプロトコルで用いられる50%のSephacel[®] 50 μ L中には、平均径約90 μ mのSephacel[®]が150,000個含まれている。結合と洗浄をおこなうには、抗体および目的タンパク質がこの多孔性ビーズの内側とその外側に分散する必要がある。Dynabeads[®] 50 μ L中には、Sephacel[®]の1000倍近い数の磁気ビーズが含まれている。個々の磁気ビーズのサイズはSephacel[®]ビーズのわずか30分の1である。目的タンパク質がビーズ表面に固定化された抗体に結合される確率は相当に高くなり、その結果、反応速度が速くなる(図2)。

Sephacel(/agarose)のIPプロトコルでは、洗浄ステップで複数回の遠心分離操作が必要となるために時間が長くなる。非多孔性の磁気ビーズを使用すれば、遠心分離と洗浄を繰り返す必要はない。単分散磁気ビーズを用いた磁気分離技術は、Sephacel[®](/agarose)に比べ反応速度が速い。そのために、目的タンパク質が確実に分離される確率が高くなり、IPの結果も改善される。

タンパク質複合体の中には不安定なものがある。インキュベーション時間が短ければ不安定な複合体を未変化のまま捕捉でき、複合体を構成する全タンパク質の分析を可能にするために役立つ(図3)。

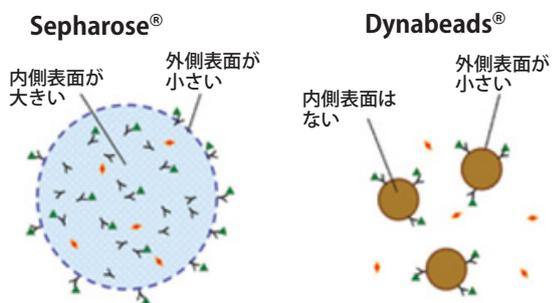


図2. 動態と総結合能

Sephacel[®]ビーズ(左)は多孔性であるため、内側表面が大きい。結合能は使用できる抗体の量で決まり、結合、洗浄および溶出は混合と拡散の動態によって決まる。Dynabeads磁気ビーズ(右)の場合、抗体は表面に固定化されているため、目的タンパク質の結合はすべて輪郭の規定された外側表面で生じる。それと同時に動態が速いことから、インキュベーション時間が短くなり、洗浄の効率が改善され、プロトコルの時間が短縮される。

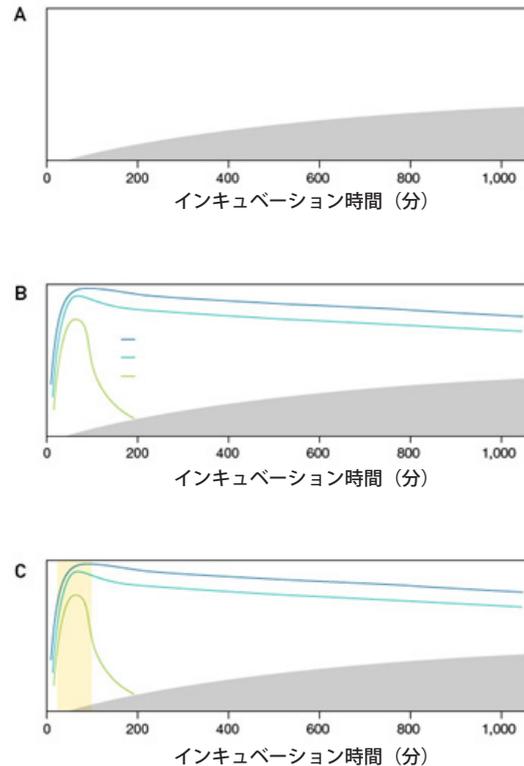


図3. プロトコル時間の短縮により改善された結果

(A) 時間が経つにつれ非特異的結合(バックグラウンド)が増大する。
(B) タンパク質複合体の中にはあまり安定でないものがあり、構成タンパク質を分析できるタイミングが限られることがある。
(C) インキュベーション時間が短いとバックグラウンドレベルが低くなる。最適な回収率を得るために好ましいインキュベーション時間は5分から1時間の間である。(黄色の影の部分)。

高いS/N比を得る

高いS/N比が確保されるIPを行えば、捕捉した標的タンパク質を明確に同定できると同時に、サンプル中に存在する不要なタンパク質によるバックグラウンドノイズを最小限に抑えられる。

ある磁気ビーズは、粒子径が均一なビーズ表面にのみ抗体を有し、存在量の少ないタンパク質を含む標的タンパク質を高い効率で捕捉できる。磁気ビーズ法は反応速度が速いために標的タンパク質の収量が高くなり、バックグラウンド結合は低くなることから、高いS/N比が得られる。(図4)

長い(一晩の)インキュベーションの必要がなくなれば、タンパク質やタンパク質複合体が解離または分解するリスクははるかに低くなる。一方Sephacel[®](/agarose)では、長いインキュベーションが必要なことが多く、これは本質的にバックグラウンド結合の増大につながる。さらに、多孔性のSephacel[®](/agarose)の遠心分離ではゼラチン状のペレットがチューブの底に残り、ここに不要なタンパク質が捕捉されると測定値に誤差が生じ、バックグラウンドが増大する可能性がある。

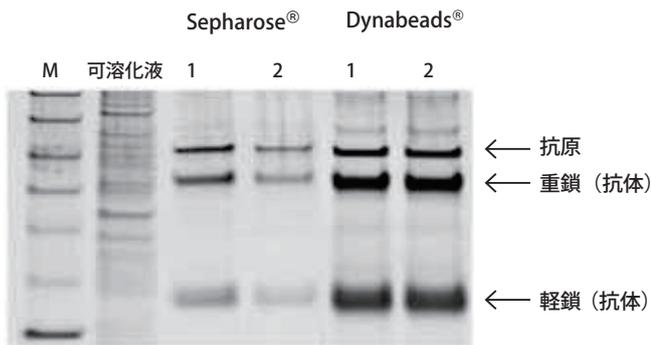


図4. 磁気ビーズを使用することで高いS/N比が得られ再現性が改善する

細胞可溶化液にHASを添加し、2通りのIPに同量の抗体(5 μ g)と可溶化液を用いた。プロテインGと結合させた磁気ビーズ(Dynabeads[®] 磁気ビーズ)では、バックグラウンドが低いと同時に、一貫してS/N比が高い。

再現性のある結果

IPを成功させるためには、実験誤差と結果のばらつきが最小限に抑えることである。単分散磁気ビーズはサイズと形状が均一である。すなわち表面積が同じであり、目的分子への抗体の接触しやすさと目的分子と抗体との相互作用が安定している。そのために、一貫した結果が得られやすい(図4)。

一方、Sepharose[®] (/agarose)の場合、サンプル処理の工程が多いため、結果の再現性が損なわれることが多い。そのために、誤差やオペレーター間でのばらつきが生じる可能性が高くなる。たとえば、Sepharose[®] (/agarose)を洗浄・遠心分離し、ピペット操作によりバッファーを除去するとき、そこにたまったペレットの一部を乱すとサンプルのロスが生じる。これを避けながら全ての洗浄バッファーを除去することが困難なことが多い(図5)。これが、同じSepharose[®] (/agarose)を使用しても実験間あるいは研究者間でしばしば結果の不一致が見られることの一因となっている。

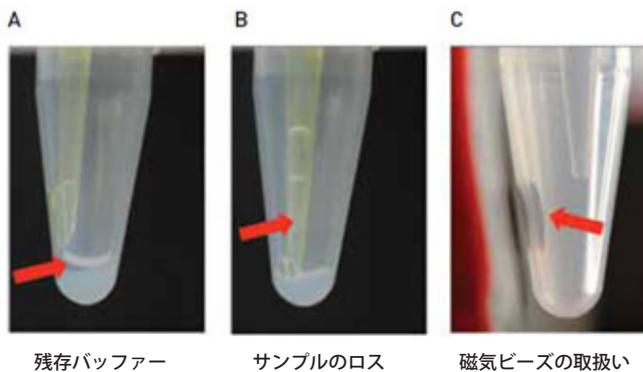


図5. Sepharose[®] スラリーおよび磁気ビーズの洗浄とピペット操作

ペレットを乱すとサンプルの一部が失われる(B)ため、これを避けながらSepharoseスラリーからバッファーを除去することは困難な場合がある(A)。チューブの側に引き寄せた磁気ビーズペレット周辺では、液体のピペット操作がきわめて容易である(C)

結論

過去5年間で、IPに使用する技術を研究者がSepharose[®] (/agarose)から磁気ビーズに変更する傾向が見られた。Sepharose[®] (/agarose)では遠心分離と長いインキュベーション時間が必要であり、孔に不要な分子が捕捉される可能性があるため徹底した洗浄が求められる。磁気ビーズを使用することで、Sepharose[®] (/agarose)に比べ時間が短縮され、S/N比が高くなり、再現性が改善されるという利点が得られる。

粒子径が均一で整った表面を持つ単分散磁気ビーズに結合した抗体はすべて標的分子に対して充分接触可能な状態にあり、目的タンパク質と結合することができる。磁気ビーズはサイズが均一で反応速度が速いことから、IPプロトコルの時間が短縮され、低存在量のタンパク質や不安定なタンパク質複合体についても捕捉と分析が可能である。さらに、単分散磁気ビーズは取扱いが簡単なため、洗浄手順の効率が改善される。

日本販売代理店

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/>

