

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

Dynabeads™で純度および再現性の高い免疫沈降が40分で可能に！

免疫沈降でサンプル容量が2mL未満の場合、またはCo-IP、ChIP、ChIP-Seq、RIPをおこなう場合はDynabeadsが最も適しています。

自動化にも対応しているため、多検体処理も可能です。

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。サーモフィッシャーサイエンティフィック社は、Nature誌に掲載された論文の中で用いられたChIP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Dynabeadsを使用した発表論文数が5年間で6倍近く増加したことが明らかになった。(図1)。

ここでは、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

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。

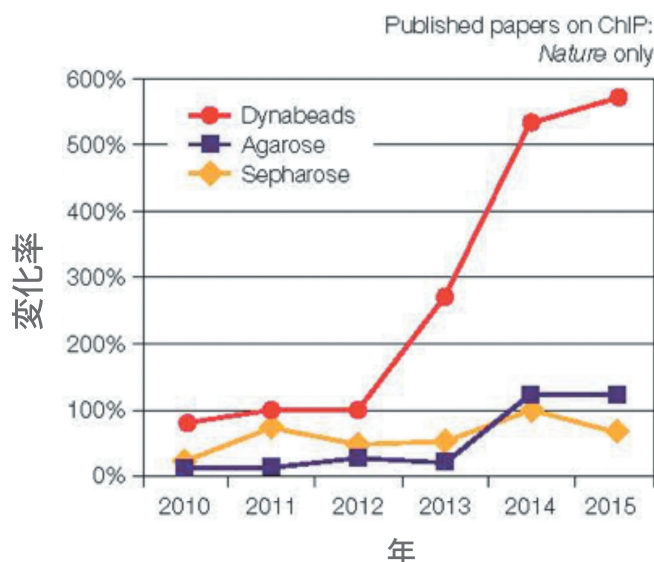


図 1. Nature に発表された免疫沈降 (IP) に関する論文の本数 agarose (紫)、Sepharose (黄) と Dynabeads (赤) が ChIP に使用されている Nature 発表論文本数の増減率

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。

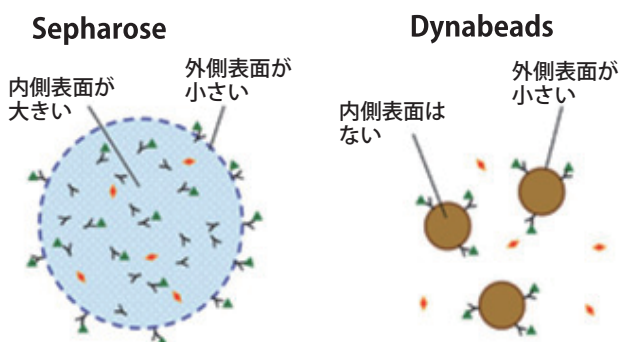


図2. 動態と総結合能

Sepharose 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)。

迅速な免疫沈降

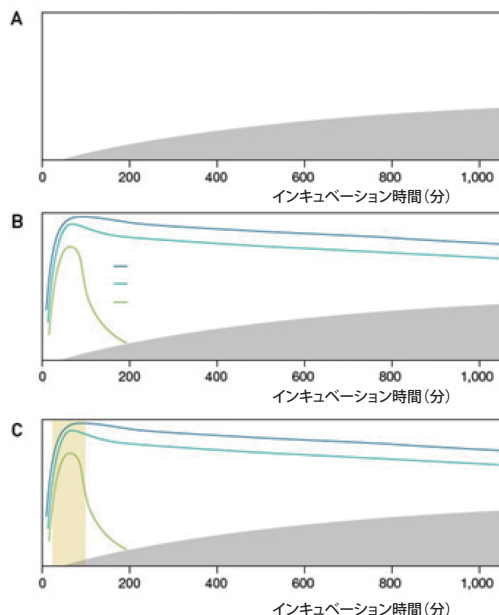
反応速度が速く、インキュベーション時間が短ければ、実験時間の短縮に役立つだけでなく、得られたデータの全体的な品質が改善される。IP を 1 時間以内で行える技術はいくつか存在するが、Dynabeads を用いたプロトコルでは 40 分という短時間で IP を行える。

典型的なプロトコルで用いられる50%のSepharose50 μ L中には、平均径90 μ mのSepharose®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。Dynabeads50 μ L中には、Sepharose®の1,000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Sepharose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す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)。

Sepharose (/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。

Dynabeadsを用いた磁気分離技術は、Sepharose (/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)。



高いS/N比を得る

Dynabeads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、Sephacrose(/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Sephacrose(/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。

再現性のある結果

IPを成功させるためには、結果のばらつきを最小限に抑えることである。Dynabeads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)。

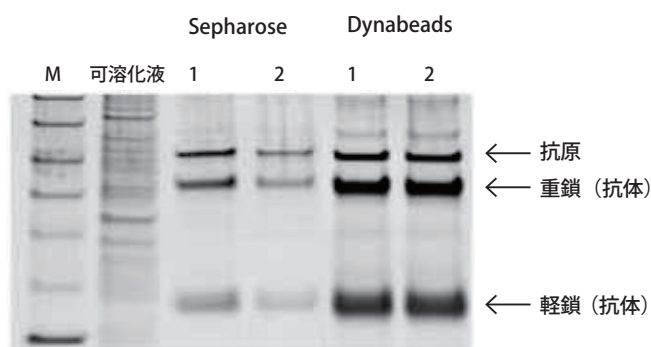


図4. Dynabeadsを使用することで高いS/N比が得られ再現性が改善する。細胞可溶化液にHASを添加し、2通りのIPに同量の抗体(5 μg)と可溶化液を用いた。プロテインGと結合させた磁気ビーズ(Dynabeads磁気ビーズ)では、バックグラウンドが低いと同時に、一貫してS/N比が高い。

一方、Sephacrose(/agarose)の場合、サンプル処理の工程が多いために、結果の再現性が損なわれることが多く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、Sephacrose(/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、底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は困難なことが多い(図5)。これが同じSephacrose(/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。

結論

過去5年間で、IPに使用する技術を研究者がSephacrose(/agarose)から磁気ビーズに変更する傾向が見られた。Sephacrose(/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、細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、Sephacrose(/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Dynabeads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、Dynabeadsは取り扱いが簡単なため、洗浄手順の効率が改善される。

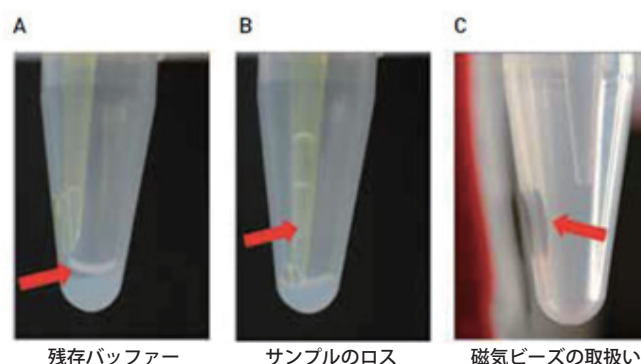


図5. SephacroseスラリーおよびDynabeadsの洗浄とピペット操作。ペレットを乱すとサンプルの一部が失われる(B)ため、これを避けながらSephacrose スラリーからバッファーを除去することは困難な場合がある(A)。チューブの側に引き寄せた磁気ビーズペレット周辺では、液体のピペット操作がきわめて容易である(C)。

製品選択ガイド

あなたがお持ちなのは?	そのタイプは?	Dynabeads 表面には	MSとの互換性	非特異結合	IP所要時間	主な利点	製品
ターゲットタンパク質を認識する抗体	ほとんどの動物種の一次抗体は Protein A あるいは G と結合するが、サブタイプにより異なる	Protein A,G	No	少ない	~40 分	<ul style="list-style-type: none"> ●速い、簡単 ●低い非特異結合 	<ul style="list-style-type: none"> Dynabeads Protein A Dynabeads Protein G Dynabeads Protein A Immunoprecipitation Kit Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kit
	Mouse IgG あるいは Rabbit IgG	Secondary antibodies	No**	少ない	~40 分	<ul style="list-style-type: none"> ●速い、簡単 ●低い非特異結合 ●mouse あるいは rabbit IgG への特異的な結合 	<ul style="list-style-type: none"> Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG
	あらゆるタンパク質	Epoxy基*	Yes	非常に少ない	Dynabeadsと抗体との結合に: overnight; Co-IP 処理に: 30-40 分	<ul style="list-style-type: none"> ●抗体を共有結合することで非常に少ない非特異結合 ●クロスリンク不要 ●タンパク質複合体も優しく、効率的にCo-IPできる 	<ul style="list-style-type: none"> Dynabeads Antibody Coupling Kit Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit
	ビオチン標識された抗体	Streptavidin	Yes	少ない	30-40 分	<ul style="list-style-type: none"> ●ビオチン化されたタンパク質なら使用可 ●IgG が多く混在しているサンプルの処理 ●Fc 領域を欠乏したりコンピナント抗体 	<ul style="list-style-type: none"> Dynabeads M-280 Streptavidin Dynabeads M-270 Streptavidin Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Dynabeads MyOne Streptavidin T1

* 他の表面活性化 Dynabeads の選択肢もありますので、お問い合わせください。

**Contains Tween-20 detergent that is contaminating for the mass spectrometry.

日本総代理店
株式会社

ベリタス

〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目18-16
住友浜松町ビル6階
TEL.03-5776-0078(代) FAX.03-5776-0076
E-mail: veritas@veritastk.co.jp
<https://www.veritastk.co.jp/>