

Dynabeads を用いたアプリケーション

「Mild enrichment procedure」
～ Dynabeads を用いた弱活性レクチンの単離～Kiichiro Totani^a, Haruka Miyazawa^a, Shino Kurata^a, Yukishige Ito^b^a Department of Materials and Life Science, Seikei University, 3-3-1 Kichijoji-kitamachi, Musashino-shi, Tokyo 180-8633, Japan^b RIKEN Advanced Science Institute and ERATO Japan Science and Technology Agency, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan
Analytical Biochemistry **411**: 50-57, 2011. Magnetic beads-assisted mild enrichment procedure for weak-binding lectins

要約

活性の弱い未知のレクチンを調べることは、ヒトの体内での糖鎖関連の現象を理解するためには重要なこととされてきました。しかしながら、そのようなレクチンは結合力が弱いため、実験室内での検出作業には重大な困難を伴いました。糖鎖ビーズを用いた従来の方法では、洗浄操作の段階で、そういった結合力の弱いレクチンがバッファーの中において、ビーズの近傍で遊離した状態にあることが多いからです。一方で、結合力の強いレクチンであれば、そのほとんどがビーズに固く結合した状態になっているので、検出は容易です。結果、活性の弱いレクチンは、従来の検出方法では洗浄操作の段階でバッファー廃棄とともに大量に捨てられてしまうため、レクチンの検出感度に大きな損失をもたらしてしまうという大きな問題点がありました。

このような問題点を解決するために、今回ご紹介している文献中で、著者らは糖鎖ビーズを用いた洗浄操作の際に、バッファーを半分だけ捨てて、その後新しいバッファーを元の分量まで加えて再び洗浄するという操作を数多く重ねるという方法を開発することによって、結合力の弱いレクチンの検出感を強化しようと試みました。このような手法を著者らは「mild enrichment procedure」と名付けました。従来のレクチン検出方法であるバッチ法と今回著者らが考案した mild enrichment procedure との比較実験の結果、レクチンの一種 ConA (コンカナバリン A) 及び PNA (ペプチド核酸) において mild enrichment procedure を用いた検出方法により、従来のバッチ法を用いた場合よりも強力な検出力を発揮することに成功しましたので、本記事の中でご紹介します。

文献中での Dynabeads の活用例

I : 磁気ビーズ上への糖鎖の固定化

磁気ビーズ表面に、検出対象となるレクチンと親和性をもつ糖鎖を予め固定化させるための反応を行った。

【実験に使用した試薬】

- Dynabeads M-280 Tosylactivated
- マルトース (0.292 mmol)
- NH_4HCO_3 飽和溶液
- ジオキサン
- NaHCO_3 (1.43 mmol)
- クロロアセチルクロリド (59 μL , 0.72 mmol)
- 20% MeOH
- 30% アンモニア溶液
- グリシン (9.8 μg , 0.13 μmol)
- 0.1M ホウ酸溶液 pH 9.5
- 0.1M Na-phosphate pH7.4
- 3M 硫酸アンモニウム pH7.4
- PBS pH7.4

【方法】

1. マルトース (100 mg, 0.292 mmol) を NH_4HCO_3 飽和溶液 2 mL に溶かし、40°C で 24 時間攪拌した。
2. 反応液を減圧濃縮した。
3. 濃縮した残留物をジオキサン - 水 1:1 混合溶液 5 mL に溶解し、0°C 条件下で NaHCO_3 (1.43 mmol) を 120 mg 加えた。
4. 混合物を 0°C 条件下で攪拌しながら、クロロアセチルクロリド (0.72 mmol) を 15 分おきに 59 μL ずつ 3 回加えた。
5. 0°C 条件下でさらに 30 分間攪拌した後、反応液を減圧濃縮した。

6. 残留物を Sep-Pak C18 column (20% MeOH 含む) を用いて精製し、30% アンモニア溶液 5 mL に溶解した。
7. 混合物を 24 時間室温で攪拌後、減圧濃縮し、マルトース-グリシン (46%) を 54.5 mg 得た。
8. Dynabeads M-280 Tosylactivated を 0.1M ホウ酸溶液 pH 9.5 (1 mL) に懸濁し、磁石の力で沈降させて上澄みを除去する操作を 4 回繰り返した。
9. 磁気ビーズをマルトース-グリシン (50 μ g, 0.13 μ mol)、グリシン (9.8 μ g, 0.13 μ mol)、0.1M Na-phosphate pH7.4 (740 μ L) 及び 3M 硫酸アンモニウム pH7.4 (500 μ L) で処理した。
10. 37°C で 24 時間インキュベート後、磁石の力でビーズを沈降させ、バッファーを PBS pH7.4 (1 mL) に置き換える操作を 3 回繰り返し、マルトース結合ビーズ (Mal-Gly) を完成させた。

【結果】

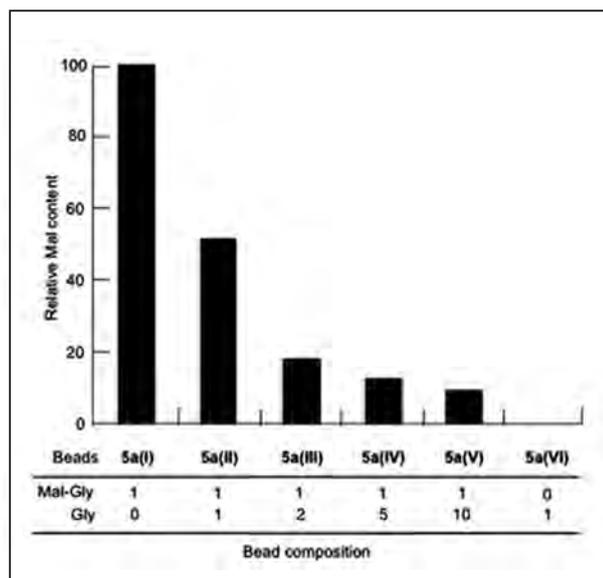


図 1. 糖鎖結合ビーズ表面におけるマルトース (Mal) の含有率

実際に作製した糖鎖 (マルトース : Mal) 結合ビーズ表面における Mal の含有率に関して、図 1 における 5a (I) ~ 5a (VI) のように、100% から 0% (Mal が全くビーズ表面に結合していない組成) まで広く幅をもたせることに成功した。

II : 糖鎖ビーズを用いた ConA の単離

「I」で作製したマルトース結合ビーズを用いて、検体中の ConA を特異的に単離する実験を、従来のバッチ法と今回開発した mild enrichment procedure で行い、両者の検出感度の違いを比較した。

【実験に使用した試薬】

- 「I」で作製したマルトース結合ビーズ (Mal-Gly)
- Protein Free (PBS) Blocking Buffer
- ConA
- BSA
- WGA (Wheat Germ Agglutinin)
- 1 mM CaCl₂
- 0.5 mM MnCl₂
- 0.5 M NaCl
- 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
- 5% sodium dodecyl sulfate [SDS]
- 6% 2-mercaptoethanol
- 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8
- 200 mM methyl α -D-mannopyranoside

【方法】

バッチ法

1. マルトース結合ビーズ (Mal-Gly) 0.6 mg を、Protein Free (PBS) Blocking Buffer 1 mL に混ぜ、4°C で 1 時間インキュベートした。
2. Mal-Gly を磁石の力で沈降させ、液相を除去した。
3. 0.1 mg の ConA、0.1 mg の BSA、0.1 mg の WGA、1 mM CaCl₂、0.5 mM MnCl₂、0.5 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.4) を加えて、全量 1 mL の反応液を作製した。
4. 4°C で 60 分間、反応液を転倒攪拌したのち、磁石の力でビーズを沈降させ、液相を除去した。
5. 反応バッファー (1 mM CaCl₂、0.5 mM MnCl₂、0.5 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)) を、液相を除去した後のビーズに、元の分量と同じになる量まで加え、4°C で 5 分間攪拌した。
6. 磁石の力でビーズを沈降させた。
7. 反応バッファー液相を全て除去した。
8. 5 ~ 7 の操作を 10 サイクル繰り返した。
9. Mal-Gly を 500 μ L の反応バッファー中に懸濁させ、0.5 mL の溶解バッファー (5% SDS、6% 2-mercaptoethanol、0.25 M Tris-HCl, pH 6.8) を加え、100°C で 5 分間インキュベートした。
10. 一連の操作で得られた抽出物及び洗浄液 (反応バッファー液相) を SDS-PAGE にかけた。

Mild enrichment procedure

1. マルトース結合ビーズ (Mal-Gly) 0.6 mg を、Protein Free (PBS) Blocking Buffer (1 mL) に混ぜ、4°Cで1時間インキュベートした。
2. Mal-Gly を磁石の力で沈降させ、液相を除去した。
3. 0.1 mg の ConA、0.1 mg の BSA、0.1 mg の WGA、1 mM CaCl₂、0.5 mM MnCl₂、0.5 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.4) を加えて、全量 1 mL の反応液を作った。
4. 4°Cで60分間、反応液を転倒攪拌したのち、磁石の力でビーズを沈降させ、上澄みを半分除去した。
5. 反応バッファー (1 mM CaCl₂、0.5 mM MnCl₂、0.5 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)) を、上澄みを半分除去した後のビーズに、元の分量と同じになる量まで加え、4°Cで5分間攪拌した。
6. 磁石の力でビーズを沈降させた。
7. 反応バッファーの上澄みを半分除去した。
8. 5～7の操作を20サイクル繰り返した。
9. Mal-Gly を 500 μL の反応バッファー中に懸濁させ、0.5 mL の溶解バッファー (5%SDS、6% 2-mercaptoethanol、0.25 M Tris-HCl, pH 6.8) を加え、100°Cで5分間インキュベートした。
※9の操作において、溶解バッファーを 200 mM methyl α-D-mannopyranoside にして、37°Cで15分間インキュベートしてもよい。
10. 一連の操作で得られた抽出物及び洗浄液 (反応バッファー液相) を SDS-PAGE にかけた。

【結果】

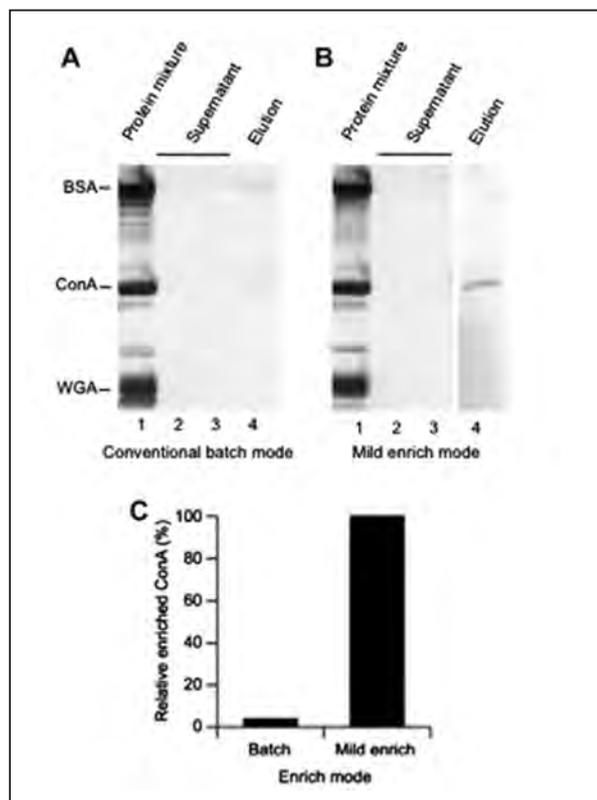


図2. バッチ法と mild enrichment procedure による検体からの ConA 単離の結果

従来のバッチ法で ConA を単離した時の泳動の結果 (図 2-A) と、mild enrichment procedure を用いて ConA を単離した場合の結果 (図 2-B) では、後者の方が明瞭に ConA のバンドが見られた。また、実際に単離できた ConA の濃度を比較すると、mild enrichment procedure で行った場合の方が、バッチ法の時よりも顕著に高濃度であった (図 2-C)。このことから、ConA の単離においては糖鎖結合ビーズを用いた mild enrichment procedure が従来の方法よりも高い威力を発揮することが明らかになった。

Ⅲ：糖鎖ビーズを用いた PNA の単離

「I」と同様の手法で作製したラクトース結合ビーズ (Lac-Gly) を用いて、検体中の PNA を特異的に単離する実験を、従来のバッチ法と今回開発した mild enrichment procedure で行い、両者の検出感度の違いを比較した。

【実験に使用した試薬】

- ラクトース結合ビーズ (Lac-Gly)
- Protein Free (PBS) Blocking Buffer
- PNA
- 5% sodium dodecyl sulfate [SDS]
- 6% 2-mercaptoethanol
- 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8
- 200 mM galactose

【方法】

Mild enrichment procedure

1. ラクトース結合ビーズ (Lac-Gly) 0.6 mg を、Protein Free (PBS) Blocking Buffer (1 mL) に混ぜ、室温で1時間インキュベートした。
2. Lac-Gly を磁石の力で沈降させ、液相を除去した。
3. 0.03 mg の PNA、0.3 mg のマウス肝臓由来サイトゾル抽出液、PBSを加えて、全量 1 mL の反応液を作った。
4. 37°Cで60分間、反応液を転倒攪拌したのち、磁石の力でビーズを沈降させ、上澄みを半分除去した。
5. 反応バッファー (PBS) を、上澄みを半分除去した後のビーズに、元の分量と同じになる量まで加え、4°Cで5分間攪拌した。
6. 磁石の力でビーズを沈降させた。
7. 反応バッファーの上澄みを半分除去した。
8. 5～7の操作を20サイクル繰り返した。

- Lac-Gly を 500 μ L の反応バッファー中に懸濁させ、0.5 mL の溶解バッファー (5% SDS、6% 2-mercaptoethanol、0.25 M Tris-HCl、pH 6.8) を加え、100 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。
※ 9 の操作において、溶解バッファーを 200 mM galactose にして、37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートしてもよい。
- 一連の操作で得られた抽出物及び洗浄液 (反応バッファー液相) を SDS-PAGE にかけた。

【結果】

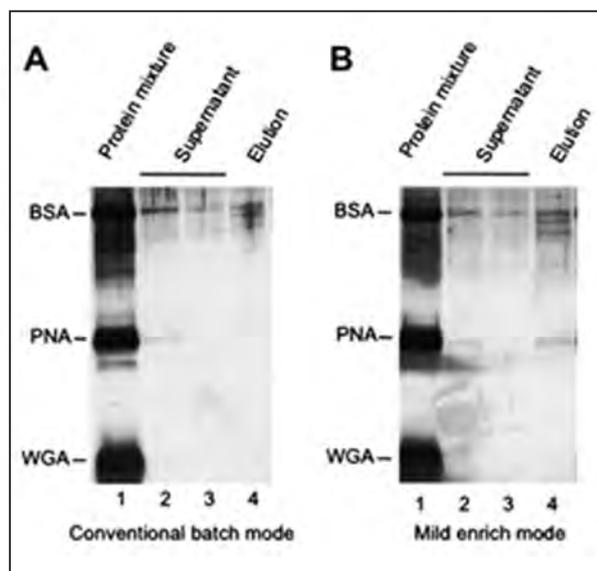


図 3. バッチ法と mild enrichment procedure による検体からの PNA 単離の結果

バッチ法で PNA の単離を試みた結果を図 3-A に示した。バッチ法では洗浄操作中の上澄みの中に PNA が溶出したため、うまく PNA を単離することができなかった。一方、mild enrichment procedure で行った結果を図 3-B に示した。Mild enrichment procedure では、PNA を電気泳動で可視的に捉えられる程度に検出することに成功した。PNA の単離においても糖鎖結合ビーズを用いた mild enrichment procedure が有効であることが明らかになった。

● 使用者のコメント

Dynabeads は粒径や表面修飾に関し多くの選択肢が用意されており、私どもにとって磁気ビーズを用いる際に最初に検討する製品であります。また、形状が均一で非特異結合が少ないことも実験の再現性を確保するのに役立っております。今回の論文にはデータとして掲載はしていませんが、Gly バッファーを用いて結合したレクチンを糖鎖磁気ビーズ上から除去した場合、回収した糖鎖磁気ビーズが 5 回程度再利用できることを確認しております。

成蹊大学理工学部
物質生命理工学科
生体分子化学研究室 准教授
戸谷 希一郎先生

表面活性化 Dynabeads のご案内

今回使用した「Dynabeads M-280 Tosylactivated」をはじめ、表面活性化 Dynabeads は抗体、抗原タンパク、レクチンなど種々の物質を化学結合あるいは物理吸着でビーズ表面に結合可能な汎用性の磁気ビーズです。

商品コード	商品名	梱包単位	粒径
DB14011	Dynabeads M-450 Epoxy	5mL	4.5 μ m
DB14013	Dynabeads M-450 Tosylactivated	5mL	4.5 μ m
DB14203	Dynabeads M-280 Tosylactivated	2 mL	2.8 μ m
DB14204	Dynabeads M-280 Tosylactivated	10 mL	2.8 μ m
DB14301	Dynabeads M-270 Epoxy	60 mg	2.8 μ m
DB14302	Dynabeads M-270 Epoxy	300 mg	2.8 μ m
DB14305	Dynabeads M-270 Carboxylic Acid	2 mL	2.8 μ m
DB14306	Dynabeads M-270 Carboxylic Acid	10 mL	2.8 μ m
DB14307	Dynabeads M270 Amine	2 mL	2.8 μ m
DB14308	Dynabeads M270 Amine	10 mL	2.8 μ m
DB65011	Dynabeads MyOne Carboxylic acid	2 mL	1.0 μ m
DB65012	Dynabeads MyOne Carboxylic acid	10 mL	1.0 μ m
DB65501	Dynabeads MyOne Tosylactivated	2 mL	1.0 μ m
DB65502	Dynabeads MyOne Tosylactivated	10 mL	1.0 μ m

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ター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了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) までお願い致します。

ADBL-12-0192