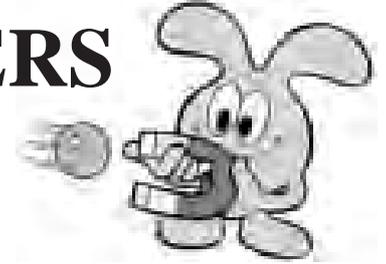


DYNABEADS LETTERS



プラスミノーゲン結合 Dynabeads を用いた異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の分離法

(独) 農業技術研究機構動物衛生研究所プリオン病研究センター
高田 益宏

1. はじめに

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、ウシ海綿状脳症 (BSE)、ヒツジスクレイピー等の診断では、異常プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}、Sc は Scrapie 型の意) の有無を指標とした方法が用いられる。ELISA またはウエスタンブロットでは、正常プリオン蛋白質 (PrP^c、c は cellular 型の意) がプロテアーゼ消化され易く、PrP^{Sc} がプロテアーゼ抵抗性であることを利用して両者を区別し検査を行う。プロテアーゼ消化を行わない状態で検体の中にある PrP^{Sc} のみを検出する方法が Fisher らによって報告された。その報告によれば、プラスミノーゲンは、PrP^{Sc} と結合するが、PrP^c とは結合しないという性質を、Dynabeads を用いた実験で証明している。それらは我々の研究室でも追試可能であった。若干のヒント及び注意点を付け加えて、プラスミノーゲン結合 Dynabeads による PrP^{Sc} の検出法を紹介する。

2. 用意するもの

- Dynabeads M-280 Tosylactivated (1mL) (DynaL biotech、コード No. DB14203)
- プラスミノーゲン (1mg)
市販プラスミノーゲンは安定化剤としてリジンを含む。リジンは必ず完全に除去しておくこと。今回はウシプラスミノーゲン (シグマ P9156) を使用した。
- ウシ血清アルブミン FrV。今回はナカライテスクのものを使用した。
- 0.1M ホウ酸緩衝液 (pH9.5) 10mL 程度
プラスミノーゲンを Dynabeads に共有結合させる際の緩衝液
- 0.1% Tween20 を含む PBS (PBST) 10mL 程度
- 0.1% BSA を含む PBS 10mL 程度
- 0.1% BSA を含む 0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 10mL 程度
Dynabeads 表面をブロッキングする緩衝液
- 微量のアジ化ナトリウム (長期保存の場合にのみ必要)
- Dynabeads 用磁石 MPC-S (DynaL biotech、コード No. DB12020)
- ラウンドボトムタイプの 2mL チューブ
- 37℃ 及び室温で連続転倒混和できる装置
- 0.5% NP40、0.5% sodium deoxycholate を含む PBS
脳乳剤作成用緩衝液、他の組成を使用すると PrP^{Sc} の結合収量が低下するのでこの組成で行うこと
- 3% NP40、3% Tween20 を含む PBS (プラスミノーゲンと PrP^{Sc} を結合させる際の緩衝液)
- 2% NP40、2% Tween20 を含む PBS (プラスミノーゲン / PrP^{Sc} 複合体を洗浄する際の緩衝液)
- 各研究室で使用しているウエスタンブロットの試薬・器具一式。但し検出感度を上げるため、化学発光で行うこと。

3. プラスミノーゲン結合 Dynabeads の作成

- 1) 1mg のプラスミノーゲンを 0.1M ホウ酸緩衝液 1mL に溶解する。リジンを含んでいる場合は十分に buffer 交換を行って、完全にリジンを除去しておくこと。
- 2) 1mL の Dynabeads M-280 Tosylactivated を 1mL の PBS で 2 回洗浄する。
- 3) 洗浄済みの Dynabeads のペレットに 1mL のプラスミノーゲン溶液（ホウ酸緩衝液置換済み）を加えて十分に混和する。
- 4) 37℃、24 時間、転倒混和する。この時、2mL のラウンドチューブだと混和が上手くいく。
- 5) 上清を捨て、Dynabeads を 1mL の 0.1%BSA を含む PBS 1mL で 2 回洗浄する。
- 6) 洗浄した Dynabeads のペレットに 0.1%BSA を含む 0.2M トリス塩酸緩衝液（pH8.5）を 1mL 加える。
- 7) 37℃、4 時間～ON、転倒混和して Dynabeads 表面の Tosyl 基をブロッキングする。この時、2mL のラウンドチューブだと混和が上手くいく。
- 8) 上清を捨て、Dynabeads を 1mL の 0.1%BSA を含む PBS 1mL で 1 回洗浄する。
- 9) PBST で 1 回洗浄する。
- 10) 上清を捨て、Dynabeads を 1mL の 0.1%BSA を含む PBS 1mL で 1 回洗浄する。
- 11) 上清を捨て、0.1%BSA を含む PBS 1mL で懸濁する。終濃度 0.02% アジ化ナトリウムを加える（すぐに使い切る場合には不要）。4℃で数カ月保存可能であった。半年程度経過すると明らかな結合能の低下が認められた。

4. プラスミノーゲン結合 Dynabeads と PrP^{Sc} との結合

- 1) 脳乳剤作成緩衝液（0.5%NP40、0.5%sodium deoxycholate を含む PBS）を用いて 10% 脳乳剤を作成する。この時他の組成の緩衝液を用いると結合収率が低下する。
- 2) 結合緩衝液（3%NP40、3%Tween20 を含む PBS）に 10% 脳乳剤 2 μ L ~ 100 μ L 相当（サンプル中の PrP^{Sc} 含量による）、プラスミノーゲン結合ビーズ 20 μ L（原著では 50 μ L 使用。5 μ L 程度でも一応分析可能だが測定誤差が大きくなる）を加え、室温で連続転倒混和する。転倒混和の時間は原著では 1.5 時間であるが、当方の経験からすると、少なくとも 3 日まで延長可能で、収率は時間の延長とともに高くなる。なお、結合緩衝液に他の組成のものを使用すると結合収率が低下する。
- 3) 非特異的結合した蛋白質を除去するため、1mL の洗浄緩衝液（2%NP40、2%Tween20 を含む PBS）で 3 回洗浄する。通常は各 10 分、3 回の連続転倒混和で十分であるが、オーバーナイトで洗浄しても差し支えない。バックを下げて、PrP^{Sc} のバンドをきれいに検出したい場合には、オーバーナイト～3 日程度洗浄すると、良い結果が得られる。プラスミノーゲンと PrP^{Sc} の結合は非常に安定であるため、通常の洗浄操作で解離しない。
- 4) PrP^{Sc} を結合しているプラスミノーゲン結合ビーズに対し、SDS サンプル緩衝液（還元剤含む）を加え 95℃ 10 分加熱し、上清を SDS 電気泳動する。以下は各研究室のウエスタンブロット手法に従う。
- 5) 膜に転写する。我々はミリポアの Immobilon-P を使用。
- 6) ブロッキングする。我々は大日本製薬のブロックエースを使用。室温 1 時間。
- 7) 一次抗体（anti-PrP）を加えてインキュベート。室温 1 時間。
- 8) PBST で洗浄する。3 分 5 回。
- 9) 二次抗体（anti-Mouse IgG）を加えてインキュベート。室温 45 分。
- 10) PBST で洗浄する。3 分 5 回。
- 11) 化学発光検出試薬の使用説明書に従って検出する。我々は SuperSignalWestDura（PIERCE 34075）を使用し、画像解析装置（alpha innotech 社）を用いて解析している。X 線フィルムを用いて検出することも可能である。

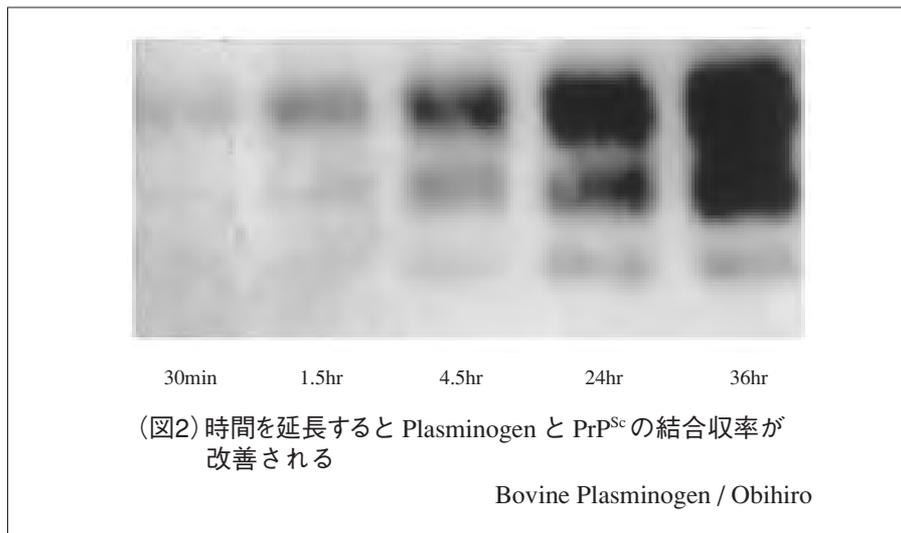
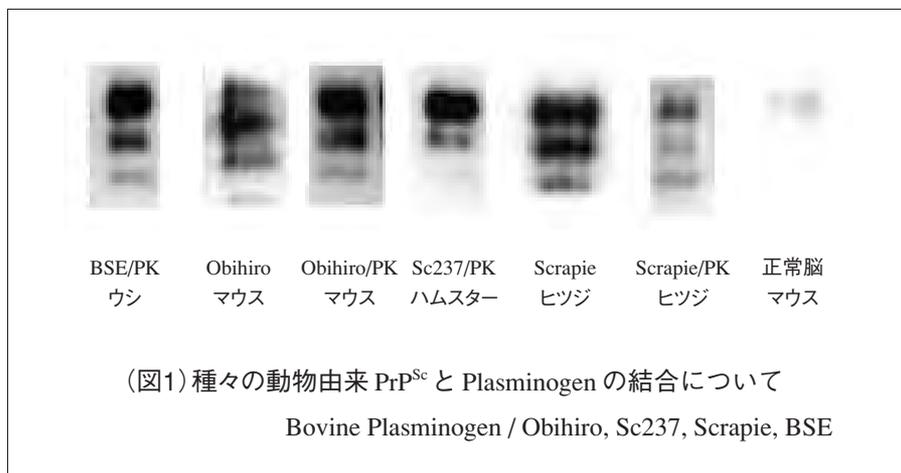
5. 結果と考察

プラスミノゲン結合ビーズは種々の PrP^{Sc} を結合した (図 1)。PK 未消化の PrP^{Sc} でも、PK 消化した PrP^{Sc} でも結合したが、PK 消化した試料の方が全体的なバックは低かった。PrP^{Sc} の動物種を選ばずに結合し、一方 PrP^C とは結合しないことから、プラスミノゲンは抗体程の厳密さは無いものの、PrP^{Sc} に共通の何らかの構造に対して親和性を持っていることが確かめられた。

脳乳剤作成緩衝液や結合緩衝液に他の組成のものを用いると結合収率は著しく低下した。緩衝液の組成については原著通りで実施するべきである。一方、結合収率を上げるためには結合時間は原著の時間よりも長い方が良いと思われる (図 2)。

PrP^{Sc} とプラスミノゲンの結合は非常に強固で pH 変化等では解離しないためビーズの再生は不可能である。PrP^{Sc} の回収が必要な場合には、プラスミノゲン結合ビーズ丸ごとに 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の proteinase K を加えて 37°C に保つと、プラスミノゲンが消化されて、上清に PrP^{Sc} (PK 処理された状態のもの) が遊離してくる。

また、必要な場合にはプラスミノゲンの代わりに血清アルブミン FrV を結合した Dynabeads を同時に作成しておくこと非特異吸着に関するコントロールとして使用できる。実験の性格によってはアルブミン結合 Dynabeads の結果をネガティブコントロールとして使用した方が良い。正しく作成され、十分に洗浄したアルブミン結合 Dynabeads では PrP^{Sc} は全く検出されない。

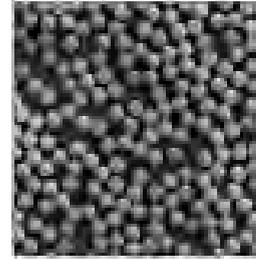


6. 文献

- 1) Fisher M.B. et al, Nature 2000;408,479-483 (原著)
- 2) Maissen M. et al, LANCET 2001;357,2026-2028 (原著)
- 3) Shaked Y. et al, J. Neurochem. 2002;82,1-5 (Detergent が無い場合に結合が不十分になることを指摘)

タンパク精製用 Dynabeads®

Dynabeads® は、粒子のサイズが一定で、表面形状も均一なため、安定した化学的・物理的特性を持っています。そのため抗体やタンパク等を結合して使用する際に、洗浄効果が高く、高純度で再現性のある安定した結果が得られます。Immunoassay、タンパクの精製等にぜひ御利用ください。



【特徴】

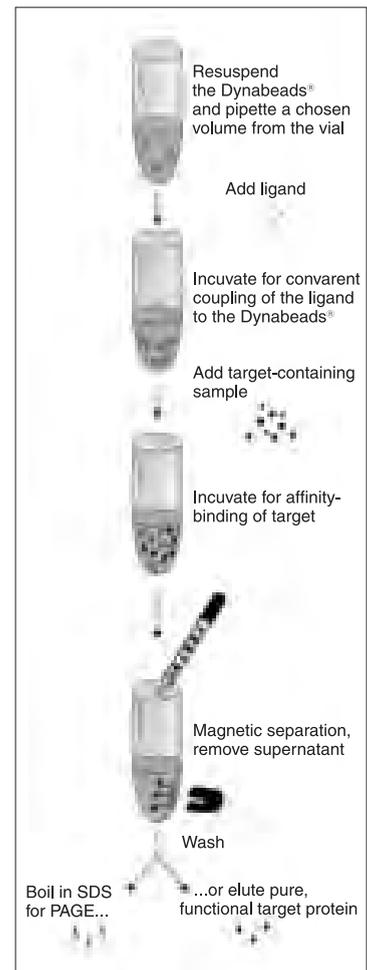
- 貴重な少量サンプルから高純度のタンパクを精製できる
- すべてを1つのチューブ内で行うため、取扱いが容易
- 非特異結合や凝集が起こりにくい
- 自動化も可能

品名	濃度	梱包単位	コード No.
Dynabeads Protein A	Isolate 250 μ g human IgG/mL beads	1 mL	DB10001
Dynabeads Protein G	Isolate 640 μ g mouse IgG/mL beads	1 mL	DB10003
Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG	$6-7 \times 10^8$ beads/mL	2 mL	DB11201
Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG	$6-7 \times 10^8$ beads/mL	2 mL	DB11203
Dynabeads M-280 Tosylactivated	30mg beads/mL 100mg beads/mL	2 mL 10 mL	DB14203 DB30101
Dynabeads M-270 Epoxy	30mg beads/mL*2	60 mg*1	DB14301
Dynabeads M-270 Carboxylic Acid	30mg beads/mL	2 mL	DB14305
Dynabeads M-270 Amine	30mg beads/mL	2 mL	DB14307
Dynabeads M-500 Subcellular	30mg beads/mL	2 mL	DB15001
Dynabeads M-280 Streptavidin	10mg beads/mL	2 mL	DB11205
Dynabeads M-270 Streptavidin	10mg beads/mL 50mg beads/mL	2 mL 10 mL	DB65305 DB35302
Dynabeads MyOne Streptavidin	10mg beads/mL	2 mL	DB65001

*1 Freeze-dried

*2 溶媒懸濁時

この他にも、それぞれについて容量の大きい製品もございます。お問い合わせください。



抗体・タンパク等の結合方法の詳細など資料をご希望のかたは、弊社までご請求ください。

- Dynal Cell separation and Protein purification ハンドブック
- Protein Isolationパンフレット

発行元

日本ダイナル
株式会社

お問合せは

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