

赤血球凝集活性測定法

赤血球凝集活性測定の概要

赤血球凝集活性は、レクチン活性測定法として最も一般的な方法です。この方法で、様々な起源からのレクチンのスクリーニングを簡単におこなうことができます。さらに、糖あるいは糖タンパク質を添加することで凝集の阻害が見られた場合、そのレクチンの糖結合特異性を知ることができ、レクチンの研究においては必須の手法となっています。

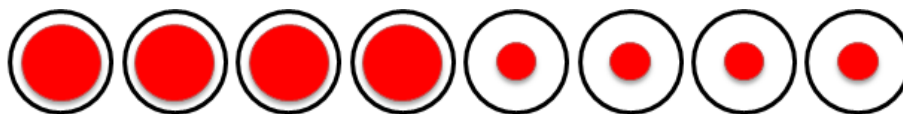
レクチンの活性は、赤血球凝集を引き起こす最大希釈倍率で表されます。(希釈倍率が大きいほどレクチン活性は強いと言えます。) また、レクチン溶液の濃度が判っているときは、赤血球凝集を引き起こすレクチンの最低濃度(χ μ g/mL)で活性の強さを数値で表示することもできます。(最低濃度値が小さいほどレクチン活性は強いと言えます。)

通常、ヒトまたはウサギの赤血球を使用しますが、ときにはトリプシンやシアリダーゼであらかじめ処理した赤血球を使用することもあります。これらの処理により、レクチンの認識する糖鎖が露出、または消失して凝集活性が変化することがあるため、さらに情報を得ることができます。

測定方法

1. 保存血液2~3mLをねじ口試験管に取り、4~5倍量のPBSを加え、2,000rpmで5分間遠心後、上清を捨てる。
この操作を3~4回繰り返し、保存血から赤血球画分を得る。
2. 1.にPBSを加え、2% (v/v) 赤血球浮遊液とする。(赤血球が0.2mLであれば、10mLにPBSでメスアップ)
3. 96穴タイタープレート(U底)の各ウェルの2~11列目に25 μ LずつPBSを分注する。
4. レクチン溶液50 μ Lを96穴タイタープレートの1列目に入れ、1列目のレクチン溶液を25 μ L採り、右隣のウェル(2列目)に移し入れ、ピペティングで搅拌する。この操作を11列目まで繰り返し、2倍希釈列を作成する。
5. 1~11列目に2% (v/v) 赤血球浮遊液を50 μ Lずつ分注し、室温で30~60分放置する。
6. 各ウェルの底部への赤血球の沈降状態により凝集の有無を判定する。

凝集あり：赤血球が沈降せず、ウェル全体に広がる(+)
凝集なし：沈降した赤血球が小さな点となる(-)



凝集の有無	+	+	+	+	-	-	-	-
希釈	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷
希釈倍	1	2	4	8	16	32	64	128

<活性の算出>

活性は赤血球を凝集させることのできるレクチンの最低濃度をタイタープレート上の終濃度で示す。

上の図において、赤血球を凝集させることのできるレクチンの最大希釈倍率は 2³ (=8) である。

レクチン初濃度が 0.5mg/mL のとき、赤血球凝集を引き起こすレクチンの最低濃度は以下のように算出される。

$$0.5 \text{ (mg/mL)} \div 3 \div 2^3 = 0.0208 \text{ mg/mL} (=20.8 \mu\text{g/mL})$$

ウェル上での希釈倍率 =
レクチン溶液 25ul + 赤血球溶液 50ul

トリプシン処理赤血球の調製方法

1. 保存血液2~3mLをねじ口試験管に取り、4~5倍量のPBSを加え、2,000rpmで5分間遠心後、上清を捨てる。
この操作を3~4回繰り返し、保存血から赤血球画分(約200-300 μ L)を得る。
2. トリプシンを2mg秤取り、マイクロピペットでPBS400 μ L添加し、溶解する。(やや白濁するが、沈殿がないことを確認する。)(酵素濃度0.5%)
3. 赤血球画分(約200-300 μ L)に等量のトリプシン溶液を加え、静かに攪拌した後、37 $^{\circ}$ C湯浴中で10分間静置する。
4. PBSを加え、2,000rpmで5分間遠心後、上清を捨てる。再びPBSを加えて攪拌する。この操作を3~4回繰り返す。
5. 得られた赤血球画分(200 μ L)にPBSを加え、2%(v/v)トリプシン処理赤血球溶液とする。

シアリダーゼ処理赤血球の調製方法

1. 保存血液2~3mLをねじ口試験管に取り、4~5倍量のPBSを加え、2,000rpmで5分間遠心後、上清を捨てる。
この操作を3~4回繰り返し、保存血から赤血球画分(約200-300 μ L)を得る。
2. シアリダーゼ(ノイラミニダーゼ)(*Arthrobacter ureafaciens*由来)にマイクロピペットで純水を1mL添加し、溶解する。(酵素濃度1unit/mL) シアリダーゼ溶液をPBSでさらに10倍に希釈する。(酵素濃度0.1unit/mL)
3. 赤血球画分(約200-300 μ L)にPBSを2mL程度加え、パストゥールピペットで攪拌する。さらに、調製したシアリダーゼ溶液をマイクロピペットで400 μ L加え、パストゥールピペットで静かに攪拌する。37 $^{\circ}$ C湯浴中で60分間静置する。
4. PBSを加え、2,000rpmで5分間遠心後、上清を捨てる。再びPBSを加えて攪拌する。この操作を3~4回繰り返す。
5. 得られた赤血球画分(200 μ L)にPBSを加え、2%(v/v)シアリダーゼ処理赤血球溶液とする。