

ビオチン標識レクチンの使い方

メンブレン上の糖タンパク質の染色への利用

<ドットプロット法¹⁾>

●特長

- ・操作が簡単
- ・多サンプル、多種類のレクチン染色が一度にできる
- ・精製サンプルが必要

●方法

1. サンプルの調製: サンプルをPBS^{*1} に溶解後 (濃度1mg/ml)、2倍希釈列を調製する。
2. メンブレンへのプロットング:
ドットプロットング装置^{*2} にメンブレン^{*3} をセットする。ウェルにサンプルを30~40 μl のせて、室温で15分間静置する。
3. 洗浄: サンプルを吸引濾過し、そのまま各ウェルにPBS 50 μl を加える。2回繰り返したら、吸引濾過をしたままドットプロットング装置からメンブレンをはずす。

(以下、ドットプロット、レクチンプロット共通操作)

4. メンブレンのブロッキング:
ブロッキングバッファー^{*5} にメンブレンを浸し、室温で10分間、緩く攪拌する。ブロッキングバッファーを交換して、さらに2回繰り返す。
5. ビオチン標識レクチン反応:
ブロッキングしたメンブレンをビオチン標識レクチン溶液 (2~5 μg/ml, ブロッキングバッファーで希釈) に浸す。室温で1時間、緩く攪拌する。
6. 洗浄: ビオチン標識レクチン溶液を捨て、ブロッキングバッファーに浸し、室温で10分間、緩く攪拌する。ブロッキングバッファーを交換して、さらに2回繰り返す。
7. HRP 標識アビジン反応: 洗浄したメンブレンを HRP 標識アビジン溶液 (ブロッキングバッファーで約1000倍希釈程度) に浸す。室温で30分間、緩く攪拌する。
8. 洗浄: HRP 標識アビジン溶液を捨て、ブロッキングバッファーに浸し、室温で10分間、緩く攪拌する。ブロッキングバッファーを交換して、さらに2回繰り返す。
9. 発色: 発色液^{*6} に浸す。<室温で1~10分間> 発色液を捨て、純水で洗浄し、反応を停止させる。
10. 乾燥: メンブレンは風乾し、保存する。

<レクチンプロット法²⁾>

●特長

- ・サンプルが少量でよい
- ・精製されていないサンプルが使用できる

●方法

1. サンプルの調製: サンプルをPBS^{*1}などで適当な濃度に調製する。
未精製サンプルの場合には濃度を高めにする。(血清の場合50倍程度)
2. 電気泳動
3. メンブレンへのプロットング:
プロットングバッファー^{*4} で平衡化したメンブレン^{*3} とゲルを密着させ、電氣的に転写する。

(以下、ドットプロット法 4. メンブレンのブロッキング 以降と同じ操作)

*1 PBS: Phosphate-buffered saline (pH7.2)

*2 ドットプロットング装置: バイオドット (バイオ・ラッド), ドットプロットレプリケーター(ATTO) など

*3 メンブレン:

ニトロセルロース(NC)膜: 純水で1分間浸漬し、使用する。

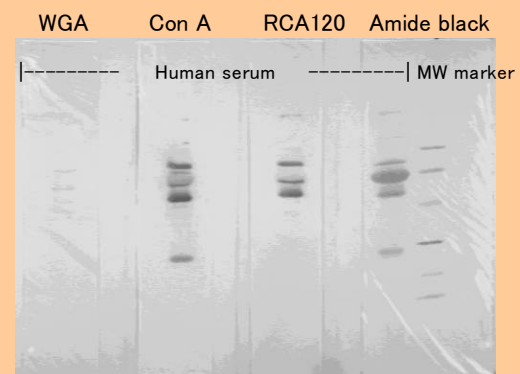
ポリビニリデンジフロライド(PVDF) 膜: メタノールに20秒後、軽く攪拌しながら純水に15分間浸漬し、使用する。

*4 プロットングバッファー: 25mM Tris, 192mM Glycine, 20%メタノール

*5 ブロッキングバッファー: 10mM Tris-HCl pH7.4 + 0.15M NaCl(WGAの場合0.5M NaCl) + 0.05% Tween20

*6 発色液: POD イムノステインキット (和光純薬工業) や

0.03% DAB (ジアミノベンジジン) / PBS + 0.003% H₂O₂ など



サンプル: 健康人血清50倍希釈液を5 μl

図1 レクチンプロット法でのレクチン染色結果



各タンパク量は No.1 が 90 μ g。以下 3 倍希釈列で No.11 が 1.5ng。No.12 は blanks。

図2 ドットプロット法でのレクチン染色結果

組織染色での利用^{3) 4) 5) 6)}

<組織検体の調製>

- 凍結切片 :
PLP (過ヨウ素酸-リジン-パラホルムアルデヒド) 固定
PFA (パラホルムアルデヒド) 固定
- パラフィン切片: 脱パラフィンの後、0.3% H₂O₂ メタノール処理(内因性ペルオキシダーゼの除去)

<染色操作>

- 標本をPBS*1 に浸す。<室温10分間>
- ビオチン標識レクチン溶液 (5~10 μ g/ml、PBS希釈) に浸す。<室温30分~1晩>
- PBSで洗浄する。<室温5分間×3回>
- HRP標識アビジン溶液に浸す。<室温30分間>
- PBSで洗浄する。<室温5分間×3回>
- 発色液*2 に浸す。<室温2~5分間>
- 純水で洗浄する。
- 核染色後、脱水して封入する。

*1 PBS : Phosphate-buffered saline (pH7.2)

*2 発色液 : 0.03% DAB (ジアミノベンジジン) / 50mM

Tris-HCl pH7.4 + 0.005% H₂O₂

凍結切片の場合には、10mM NaN₃を加える。

<用時調製>

セルソーターへの応用^{7) 8) 9)}

細胞自動解析分離システム (Fluorescein activated cell sorter ; FACS) は、特定の細胞を迅速に単離するシステムです。特異抗体とFACSを組み合わせた方法で、細胞の分化・異常の追跡、遺伝子組換え材料の分離にと広く応用されています。特異抗体をレクチンに置き換えると、細胞を糖鎖特異的に分離することができます。

<方法>

- 細胞のシングルサスペンション (2 × 10⁷ cells/ml) をバッファー (0.1% BSA, 0.02% NaN₃ / PBS) に浮遊する。
- ビオチン標識レクチン (5~40 μ g/ml) を加える。
<氷冷 30分間>
- 細胞をバッファーで3回洗浄する。
- FITC標識アビジン (20 μ g/ml) を加える。
<氷冷 30分間>
- 細胞をバッファーで3回洗浄する。

※二重染色する場合には Phycoerythrin 標識アビジン (5 μ g/ml) でおこない、その後に FITC 標識 Anti-Thy-1 でインキュベーションする。(T cell の場合)

ELISA 法での利用^{10) 11) 12)}

マイクロプレートで特定タンパク質の定量などをおこないます。抗体を用いて定量、結合定数を測定することは一般的におこなわれています。抗体をレクチンに変えることで、定量の他、糖鎖の情報などを得ることができます。

文献

- 1) Chadli, A., Caron, M., Joubert, R., Bladier, D., Kocourek, J., *Anal. Biochem.*, **204**(1), 198 (1992)
- 2) Seo, Y., Takahama, K., *Res. Pract. Forens. Med.* (法医学の実際と研究), **37**, 155 (1994)
- 3) Uehara, F., Sameshima, M., Unoki, K., Okubo, A., Yanagita, T., Sugata, M., Iwakiri, N., Ohba, N., *Jpn.J.Ophthalmol.*, **38**(4), 364 (1994)
- 4) Suzuki, K., Ogawa, K., Taniguchi, K., 味と匂のシンポジウム論文集, **27**, 49 (1994)
- 5) Ueda, T., et al., *Okajimas Folia. Anal. Jpn.*, **73**, 325 (1997)
- 6) Takada, K., et al., 細胞工学別冊「グライコバイオロジー実験プロトコール」, P.236-240 (1996)
- 7) Imai, Y., et al., *Mol. Immunol.*, **25**, 419 (1988)
- 8) Yamashita, Y., et al., *Mol. Immunol.*, **26**, 905 (1989)
- 9) Takano, M., et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 1228 (1989)
- 10) Duk, M., Lisowska, E., Wu, J. H., Wu, A. M., *Anal. Biochem.*, **221**(2), 266 (1994)
- 11) Mengeling, B. J., Smith, P. L., Baenziger, J. U., *Anal. Biochem.*, **199**(2), 286 (1991)
- 12) Keusch, J., et al., *Clinica. Chimica. Acta*, **252**, 147 (1996)