

LECTIN & GLYCOANALYSIS NEWS

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. メンブレンへのブロッキング：ドットプロット装置^{*2}にメンブレン^{*3}をセットする。ウェルにサンプルを30～40μl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 50μl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。

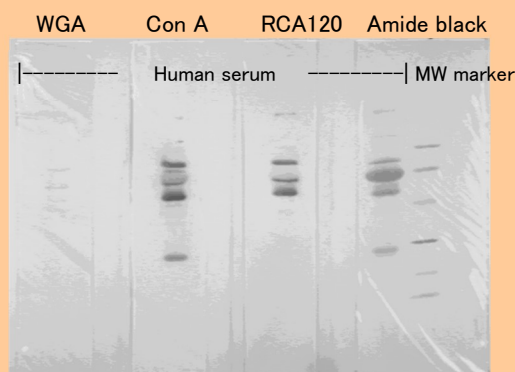
(以下、ドットプロット、レクチンプロット共通操作)

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（2～5μg/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。

- *1 PBS : Phosphate-buffered saline (pH7.2)
- *2 ドットプロット装置 : 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 ブロッキングバッファー : 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5μl

図1 レクチンプロット法でのレクチン染色結果

<レクチンブロット法²⁾>

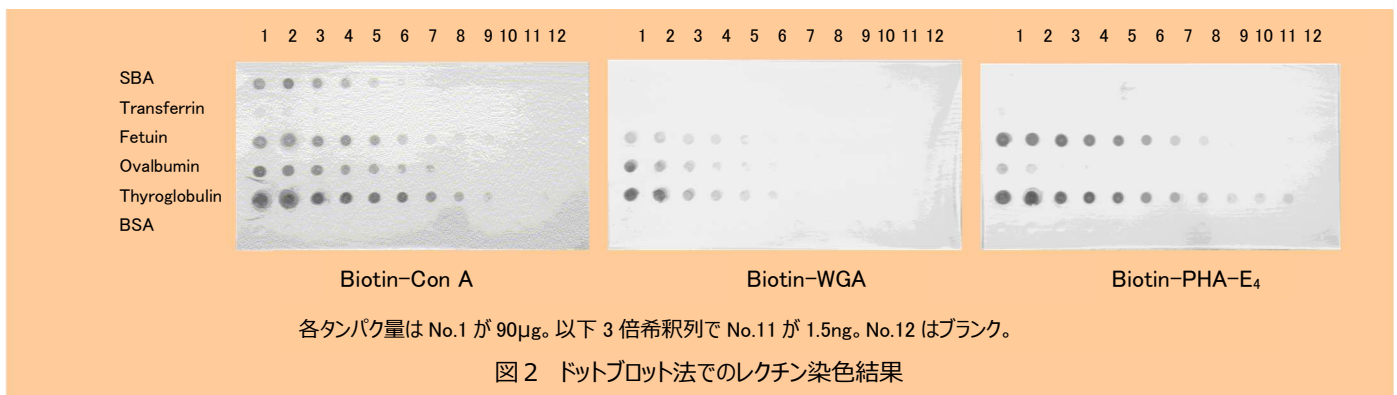
●特長

- ・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. メンブレンへのブロッティング：
ブロッティングバッファー^{*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、ドットブロット法 4. メンブレンのブロッキング 以降と同じ操作)



組織染色での利用^{3) 4) 5) 6)}

●組織検体の調製

1. 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
2. パラフィン切片:脱パラフィンの後、0.3% H₂O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

1. 標本をPBS^{*1}に浸す。 <室温10分間>
2. ビオチン標識レクチン溶液 (5~10 μg/ml、PBS希釈) に浸す。 <室温30分~1晩>
3. PBSで洗浄する。 <室温5分間×3回>
4. HRP標識アビジン溶液に浸す。 <室温30分間>
5. PBSで洗浄する。 <室温5分間×3回>
6. 発色液^{*2}に浸す。 <室温2~5分間>
7. 純水で洗浄する。
8. 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

1. 細胞のシングルサスペンション（ 2×10^7 cells/ml）をバッファー（0.1% BSA, 0.02% NaN_3 / PBS）に浮遊する。
2. ビオチン標識レクチン（5～40 $\mu\text{g/ml}$ ）を加える。＜氷冷 30分間＞
3. 細胞をバッファーで3回洗浄する。
4. FITC標識アビジン（20 $\mu\text{g/ml}$ ）を加える。
＜氷冷 30分間＞
※二重染色する場合には Phycoerythrin 標識アビジン（5 $\mu\text{g/ml}$ ）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）
5. 細胞をバッファーで3回洗浄する。

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)