

APPLICATION SHEET

『 β ラクトグロブリンとその抗体の相互作用』

九州計測器株式会社 ケミカルセンシンググループ

http://www.qk-net.co.jp/RANA_Site/top-r.html

【本社】福岡県福岡市博多区山王一丁目 6-18

TEL:092-441-3200 FAX:092-441-3264

1. はじめに

表面プラズモン共鳴センサは分子間の相互作用の検討に用いることができる。センサ表面に β ラクトグロブリンを固定化し、アフィニティ精製した β ラクトグロブリン抗体をアナライトとしてインジェクトし固定化した抗原との相互作用の測定例について、センサ表面作製法および測定方法を紹介する。

2. 実験方法

2.1 試薬など

- NHS : 115 mg の N-hydroxysuccinimide を 10 mL の蒸留水で溶解する。要時調製だが、小分けして -30°C で凍結保存が可能。
- ECD : 750 mg の N-ethyl-N'- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride を 10 mL の蒸留水で溶解する。要時調製だが、小分けして -30°C で凍結保存が可能。
- Ethanolamine : ethanolamine hydrochloride を NaOH で pH 8.5 に調整し、蒸留水でフィルアップし濃度を 1 M にしたもの。
- 抗 β ラクトグロブリン抗体 : Bethl laboratories inc.社の A10-125A を使用した。免疫動物はウサギ、アフィニティ精製品で、Isotype は IgG。
- Buffer A : 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.005% Tween20
- Buffer B : 10 mM 酢酸 buffer, pH 5.0
- Buffer C : 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.005% Tween20, 4% BSA

2.2 センサ表面の作製

2.2.1 センサチップの洗浄と自己組織化単分子膜の形成

- ①チップをイソプロピルアルコール (5 min)、メタノール (5 min) の順に超音波洗浄し、蒸留水でリンスして乾燥。
- ②SAM 形成用 PDMS を 1.35 M HCl で 5 min 超音波洗浄し、蒸留水でリンスして乾燥。
- ③PDMS をチップに装着しエタノールに溶解した 1 mM 7-carboxy-1-heptanethiol (同仁化学研究所) を投入し、カバーガラスで蓋をして密封容器に入れ室温でオーバーナイト。
- ④チップを蒸留水でリンスして、エタノールに浸漬して 30 s 超音波洗浄し、蒸留水でリ

スして乾燥。アネロパック（脱酸素剤：三菱ガス化学）とともに密封し、使用まで4℃で保存しておく。

2.2.2 チップ表面へのβラクトグロブリンの固定化

- ①チップに5chフローセル（PDMS製）と5chインジェクションプレートをセットし、各チャンネルにBuffer Aを20 μLインジェクト^{注1)}し、センサグラムが安定するまで待つ。
- ②NHSとECDを等量混合したものをch3とch4にそれぞれ20 μLインジェクトして10min保持。
- ③NHS/ECD混合液を除いて20 μLのBuffer Aを2回インジェクトし、3min保持。
- ④ch3にBuffer Bに溶解した100 μg/mLのβラクトグロブリン（シグマアルドリッチ）を、ch4にBuffer Aをそれぞれ20 μLインジェクトし^{注2)}、10min保持。
- ⑤20 μLのBuffer Aを2回インジェクト。
- ⑥20 μLのEthanalamineを2回インジェクト。10min保持。
- ⑦20 μLのBuffer Aを2回インジェクト。

注1) 必要に応じてインジェクションプレートの液溜の溶液を取り除いた。

注2) 目的のタンパク質を固定化したchと何も固定化しないリファレンス用のchを作成する必要がある。

2.3 相互作用の測定

- ①SPRセンサを起動し温度が安定するまで静置。
- ②調製した試薬類を室温にしておく。
- ③βラクトグロブリンを固定したチップをセンサにセットし、Cross1フローセルとCross1インジェクションプレートをセットする。
- ④Buffer C^{注3)}を60 μLインジェクトし、測定開始。3min保持して、0点調整を行う。
- ⑤Buffer Cで所定濃度に希釈した抗βラクトグロブリン抗体を60 μLインジェクトし3min保持。
- ⑥60 μLのBuffer Cを2回インジェクト。
- ⑦60 μLの100 mM HClを2回インジェクト。
- ⑧60 μLのBuffer Cを2回インジェクトして3min保持。
- ⑨抗βラクトグロブリン抗体の濃度を変えて④から繰り返す。

注3) タンパク質の非特異的な結合を抑えるためにRunning bufferとしてBuffer AにBSAを溶解したものをを用いた。

3. 結果

チップ表面へのβラクトグロブリンの固定化を図1に示した。矢印3でBuffer Bに溶解した100 μg/mLのβラクトグロブリンをインジェクトした際にBuffer Bの屈折率が

Buffer A に比べて低いため一旦ベースラインが下がるが、 β ラクトグロブリンが固定化されるにしたがって徐々にシグナルが増加しており、 β ラクトグロブリンが固定化されていることが分かる。

次に固定化 β ラクトグロブリンとその抗体との相互作用を図2に示した。抗 β ラクトグロブリン抗体の抗原との濃度に応じた結合と、100 mM HCl による解離が観察された。

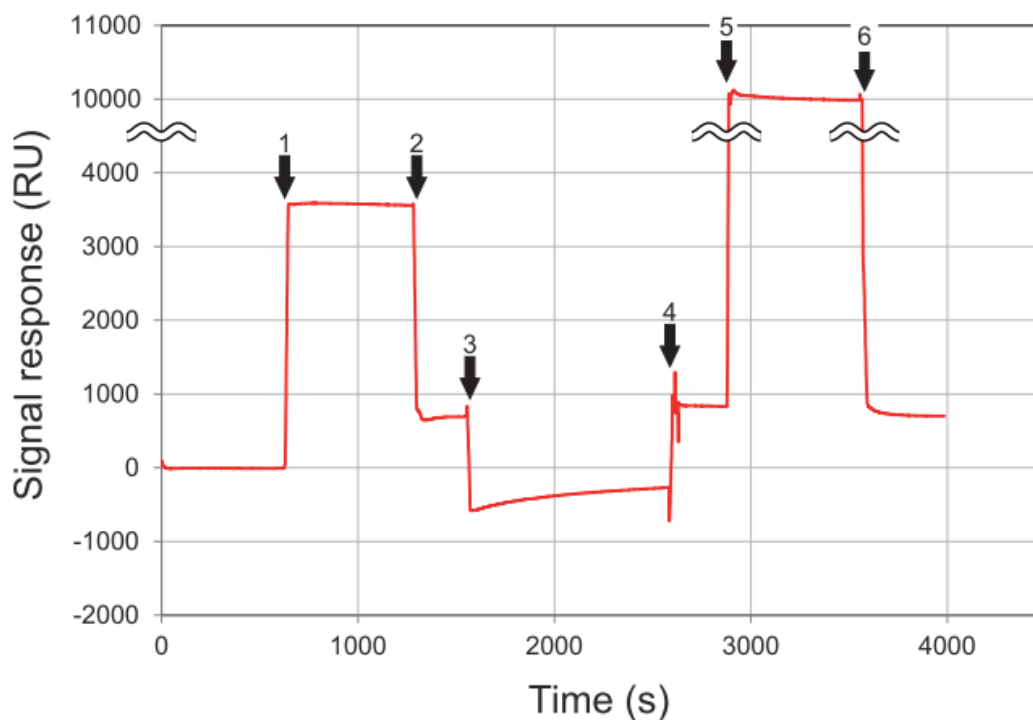


図1 チップ表面への β ラクトグロブリンの固定化

矢印は次の溶液のインジェクトを示している。1: NHS/ECD 混合液、2: Buffer A、3: Buffer B に溶解した 100 μ g/mL の β ラクトグロブリン、4: Buffer A、5: Ethanolamine、6: Buffer A。Signal response は RU 値で表示した。1 RU は 1/10000 度の共鳴角変化を示す。

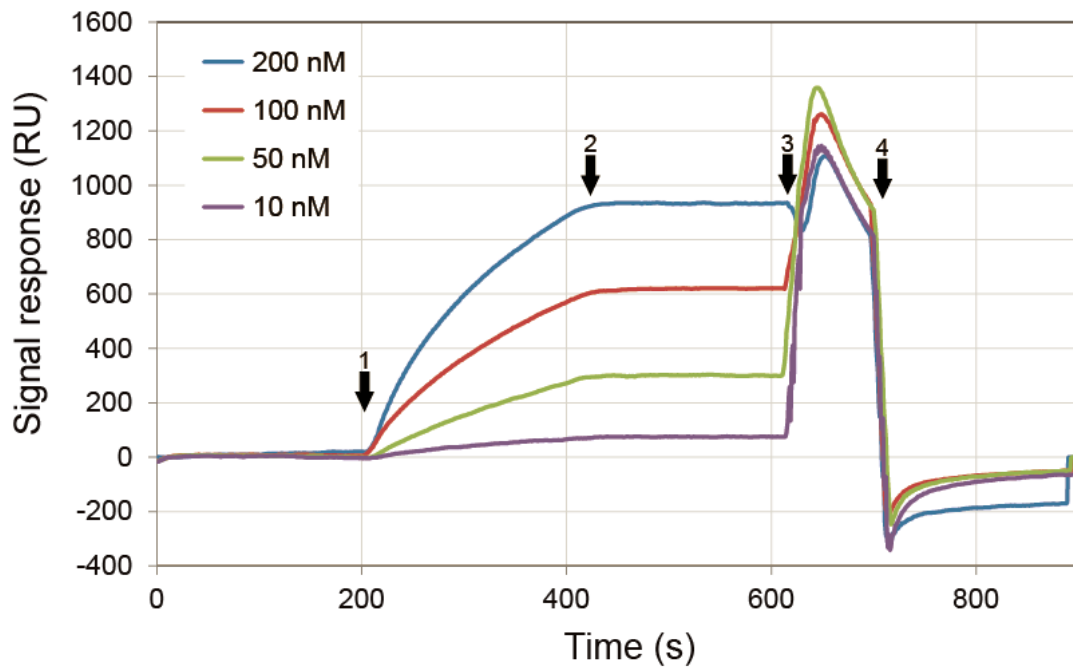


図2 固定化 β ラクトグロブリンとその抗体との相互作用

矢印は次の溶液のインジェクトを示している。1: Buffer Cで希釈した抗 β ラクトグロブリン抗体、2: Buffer C、3: 100 mM HCl、4: Buffer C。それぞれのSignal responseは β ラクトグロブリンを固定したch3の応答から何も固定していないch4の応答を減算したものの。