

Glycolipid binding assay에 최적!! TaKaRa GlycoArray

TaKaRa Code 4470 2매

- Slide glass 위에 24종류의 Glycolipid가 5단계의 농도로 고정화 되어 있다.
- Glycolipid와 Glycolipid 결합성 단백질의 binding assay가 용이하다.

면역계 cell의 상호작용, 세균이나 바이러스 cell로의 감염, cell과 독소의 결합 등의 메커니즘에서 cell 표면에 있는 Glycoprotein이나 Glycolipid 등의 당쇄와 여러가지 단백질의 결합이 매우 중요하다는 것이 알려져 있다. 당쇄와 당쇄 결합성 단백질의 결합 특이성을 밝히는 것은 각각의 기능을 밝히는 매우 유용한 방법이다.

TaKaRa GlycoArray는 24종류의 Glycolipid를 slide glass위에 고정화한 Glycolipid array로, Glycolipid 결합성 단백질과 Glycolipid의 특이한 결합을 간단하게 검출할 수 있다. 본 고에서는 Glycolipid 결합성 단백질로서 cholera toxin B subunit와 anti GK1b antibody를 사용하여, Glycolipid와의 결합성을 검출한 예를 소개하고자 한다.

제품의 개요

TaKaRa GlycoArray는 아래에 표시된 24종류의 Glycolipid를 butyl silane으로 코팅한 slide glass 위에 spot하여 glycolipid의 지질부분과 glass 표면의 소수적 상호 작용을 이용하여 고정화한 Glycolipid array이다. 그림 1에 나타난 것과 같이 각 Glycolipid가 5배 희석되어 5단계 농도로 연속해서 spot되어 특이적인 결합을 농도 의존적으로 검출할 수 있다. Glycolipid 결합성 단백질(antibody, lectin, 독소 등)을 직접 형광 표식하거나 이를 인식하는 형광 표식 antibody를 사용하여 Glycolipid와의 결합을 신속하고 간편하게 검출할 수 있다. 검출에는 DNA microarray용 해석 시스템(스캐너 혹은 해석 소프트웨어)이 필요하다.

실험 예 1 : TaKaRa GlycoArray를 이용한 cholera toxin B subunit과 GM1의 binding assay

세균이 표적 cell에 감염된 경우나 cell 독소가 표적 cell에 결합된 경우, 세포막에 의존하는 Glycolipid를 receptor로 이용할 수 있다. 그 중 cholera toxin B subunit과 GM1의 binding assay를 TaKaRa GlycoArray를 이용하여 실험하였다.

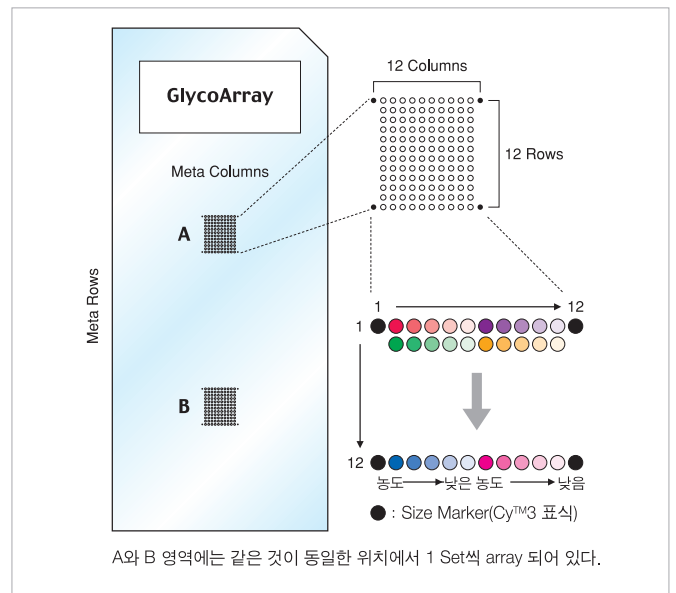


그림 1 TaKaRa GlycoArray에 spot된 Glycolipid의 위치

[Spotting된 Glycolipid [유래]]

- asialo-GM1 [bovine] · asialo-GM2 [human] · CTH [porcine] · Fucosyl GM1 [bovine]
- Galactocerebroside(non-hydroxy fatty acids) [bovine] · Galactocerebroside(2-hydroxy fatty acids) [bovine]
- Gb4 [porcine] · GD1a [bovine] · GD1b [bovine] · GD3 [bovine] · Glucocerebroside [bovine]
- Glucocerebroside [plant] · Glucopsychosine [bovine] · GM1 [bovine] · GM2 [human]
- GM3 [bovine] · GM3(NeuGc) [bovine] · GQ1b [bovine] · GT1b [bovine]
- Lactosylceramide [porcine] · Lactosylceramide [bovine] · Sialyl lactotetraosylceramide [합성]
- α(2-6) sialyl lactotetraosylceramide [합성] · Sulfatide [bovine]

Glycolipid의 구조식에 대해서는, <http://lipidbank.jp/index00.shtml>를 참조하기 바랍니다.

[방법]

TaKaRa GlycoArray를 PBS로 세정한 후 1% BSA/PBS를 사용하여 실온에서 2시간 blocking하여 PBS로 세정하였다. 시판 중인 cholera toxin B subunit를 1% BSA/PBS로 10 μM로 희석하고 200 μl를 TaKaRa GlycoArray에 증충하였다.

Cover glass로 덮고 37℃, 1시간 동안 배양하고, PBS로 세정한 후 2,000배로 희석한 goat anti cholera toxin antibody을 증충하고 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 또한 PBS로 세정한 후 500배로 희석한 Alexa 546 표식 Donkey anti goat IgG antibody(Molecular Probes사)를 증충하고, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 세정한 후 10 mM Acetic acid-Triethylamine Solution (buffer, pH 7.3)으로 세정하고 저속 원심분리하여 수분을 제거하여 충분히 건조 시킨 후 Affymetrix®를 사용하여 형광 signal을 스캐닝하여 해석 소프트웨어 ImaGene™(TaKaRa Code BD001)으로 해석하였다.

[결과]

TaKaRa GlycoArray상에서 Fucosyl GM1 또는 GM1이 농도 의존적으로 signal 강도가 강해지는 것이 관찰되었고 그 밖의 Glycolipid에서는 강한 결합은 보이지 않았다(그림 2).

이것으로 cholera toxin B subunit과 GM1이 특이적으로 결합한다는 것을 알 수 있었다.

실험 예 2 : TaKaRa GlycoArray를 사용한 anti GD1b antibody와 GD1b의 binding assay

TaKaRa GlycoArray를 사용하여 anti GD1b antibody와 GD1b의 binding assay를 하였다.

[방법]

실험 예 1과 같은 전 처리를 한 후 1% BSA/PBS로 100배 희석한 mouse anti GD1b antibody 200 μl을 TaKaRa GlycoArray에 증충하고 4℃에서 하루 동안 배양한다(Glycolipid-antibody 반응은 4℃에서 하루 동안 반응하면 비 특이적 반응을 억제할 수 있다). PBS로 세정한 후 500배 희석한 Alexa546 표식 goat anti mouse IgG antibody(Molecular Probes사)를 증충하고, 37℃에서 1시간동안 배양한다. 세정한 후 10 mM Acetic acid-Triethylamine Solution (buffer, pH 7.3)으로 세척하고 TaKaRa GlycoArray를 충분히 건조시킨 후 Affymetrix® 428Array Scanner를 사용하여 형광 signal을 스캐닝하여 해석 소프트웨어 ImaGene™으로 해석하였다.

[결과]

TaKaRa GlycoArray상에서 GD1b의 signal 강도가 농도 의존적으로 강해졌으나, 그 밖의 Glycolipid에서는 강한 결합은 나타나지 않았다(그림 3). 이것으로 anti GD1b antibody와 GD1b가 특이적으로 결합하고 있다는 것을 알 수 있었다.

이와 같이 TaKaRa GlycoArray를 이용하면 Glycolipid 결합성 단백질과 Glycolipid과의 결합성을 간편하게 검출할 수 있다.

이번 실험 예에서는 형광 표식된 이차 antibody를 사용하여 간접적으로 검출했으나 목적 단백질을 Cy3™등으로 형광 표식하여 직접 검출이 가능하다.

또한 Glycolipid 결합성 단백질뿐 아니라, 미생물이나 동물 cell를 그대로 사용하여 Glycolipid와의 결합분석 등 다양한 응용이 가능하다.

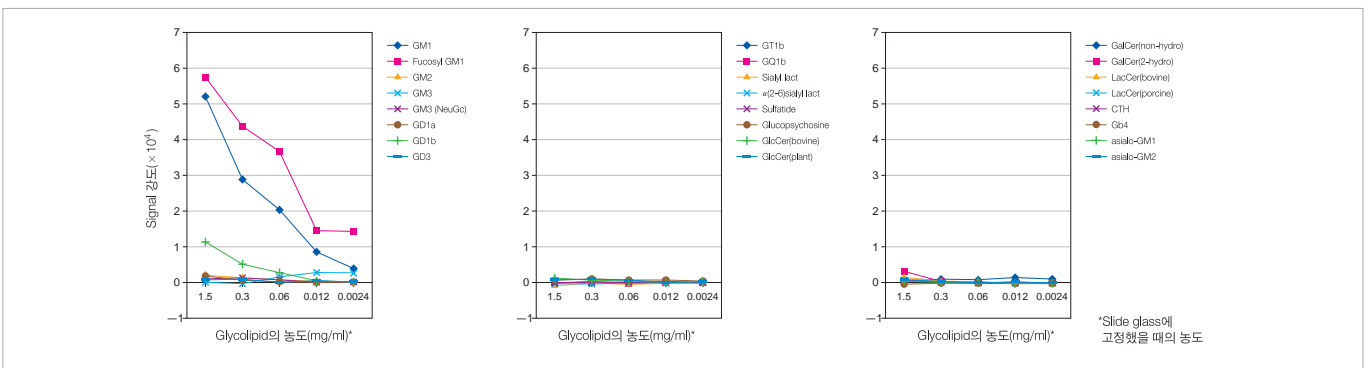


그림 2 Cholera toxin B subunit의 결합 특성

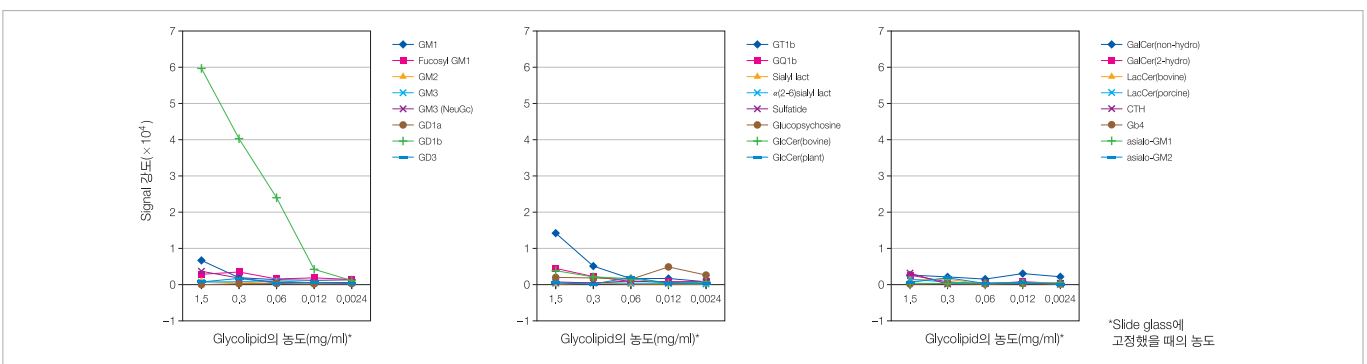


그림 3 Anti GD1b antibody의 결합 특성