

■ DNA への転写因子結合

センサー上に二本鎖DNA (NF- κ B標的配列) を固定化し、転写因子(p50)の反応及び抗体による信号増幅 (増感) を行いました。

1. プロトコル

NAPiCOS Auto (マイクロ流路)

センサー: 30MHz ツインセンサー

流速: 2 μ L/min

サンプル量: 50 μ L

送液バッファー:

10mM Tris (pH7.6) , 50mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.5mM DTT

転写因子: NF- κ B (p50ホモ二量体) 5 μ g/mL

DNA:

ビオチン化オリゴDNA (25mer)

biotin-5'-CACAGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3'

相補DNA (25mer) 10 μ g/mL

3'-GTGTCAACTCCCTGAAAGGTCCG-5'

* 赤字はNF- κ B標的配列

上記2つの合成DNAを混合して50 μ g/mLとし、二本鎖を形成させておきます。

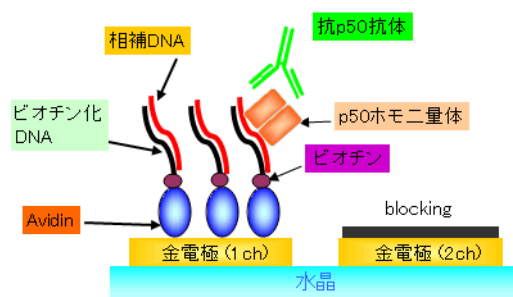


図1: 模式図

反応電極側にアビジンを固定し、リファレンス電極側をブロッキングします。ビオチン化二本鎖DNAを流し、反応電極側に固定した後、p50の結合反応を見ます。その後、抗p50抗体を流し、反応の増幅を見ます。

2. 反応波形

2-1

ビオチン化二本鎖DNAを流し、アビジン固定電極に固定しました。

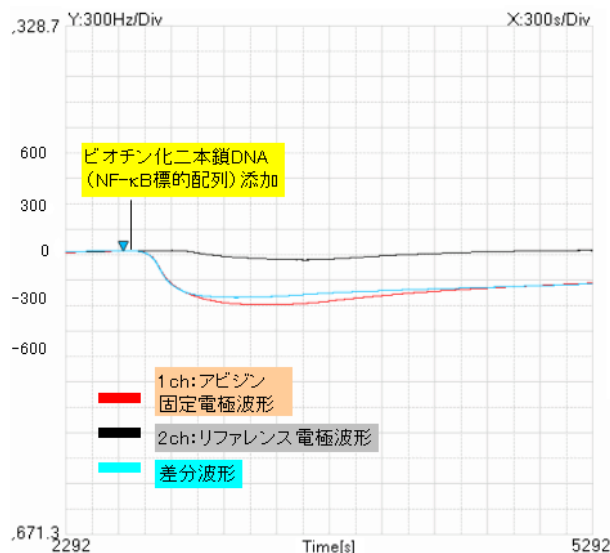


図2: ビオチン化二本鎖DNA固定波形

2-2

引き続きp50を添加した後、抗体を流して増感しました。

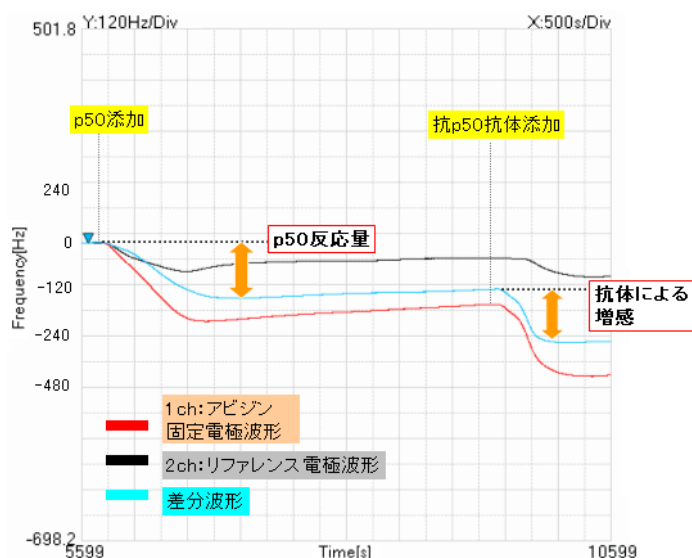


図3: p50及び抗p50抗体結合波形

■ DNA への転写因子結合

2-3 特異性評価のため、ランダム配列のビオチン化二本鎖DNAをアビジン電極に固定し、その後にp50を流しました。

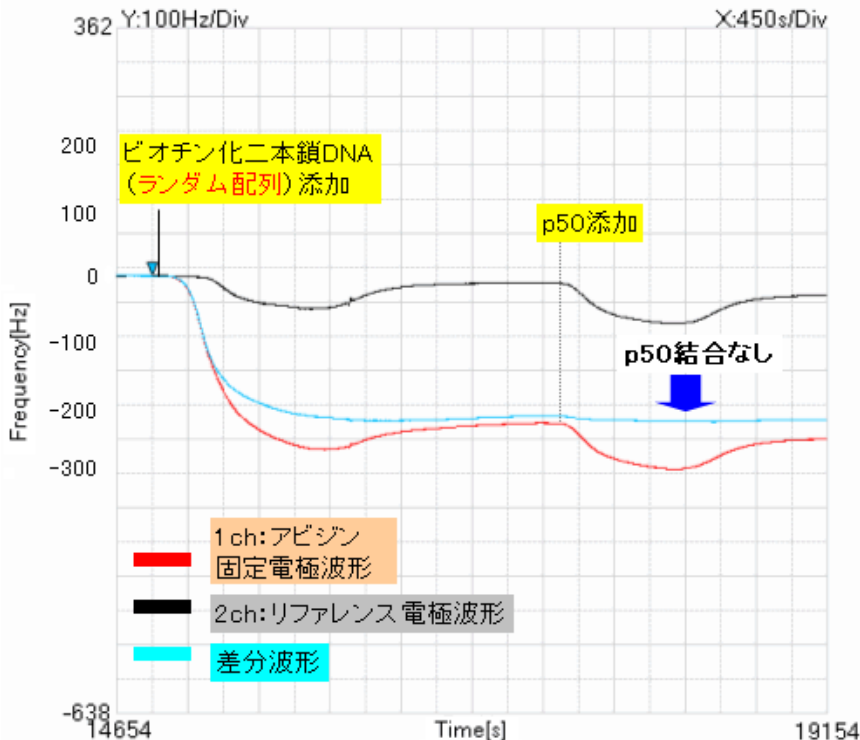


図4：ランダムDNA固定、p50添加波形

3. 反応量

2項の波形から、差分反応量を取得しました。p50はNF-κB標的配列特異的に結合していることが分かります。

		反応量 (Hz)	
		添加サンプル・濃度	反応量 (Hz)
DNA配列		ビオチン化二本鎖DNA	p50
		50 μg/mL	5 μg/mL
	(1) NF-κB標的配列	248.57	129.91
	(2) ランダム配列	211.15	6.17

表1：DNAとp50の反応量

*ランダム二本鎖DNAは20merであり、分子量がNF-κB二本鎖DNAの約80%です。このため反応量も約80%となります。

4. 用語解説

- 転写因子** DNAに結合するタンパク質の総称で、DNAの遺伝情報をRNA（リボ核酸）に転写する機能を持ちます。
- NF-κB (Nuclear Factor Kappa B)** NF-κBはp50（分子量約50,000のタンパク質）とp65（分子量約65,000のタンパク質）で構成されている転写因子です。活性化されると標的DNA配列に結合します。p50はp65とのヘテロ二量体のみではなく、p50-p50のホモ二量体も形成します。NF-κBは細胞死を抑制したり、炎症を促進する機能を持つことから、癌の進行を促進するとされています。
- DTT (Dithiothreitol)** 低分子の還元剤です。タンパク質のSH基を保護し、安定化します。
- ホモ二量体** 同一物質2つの複合体です。異なる2つの複合体はヘテロ二量体と呼びます。