

ELISA In Situ: 内在性BDNFの放出を検出するための高感度ツール



By Agnieszka Balkowiec, Ph.D., and David M. Katz, Ph.D.

Department of Neurosciences, Case Western Reserve University School of Medicine,
10900 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44106, USA

はじめに

BDNFがシナプスの発生や可塑性の活性依存のプロセスに重要な役割を果たすことが認識されるようになってから、ニューロンからのニューロトロフィンの放出を制御するメカニズムに興味を持たれるようになりました。しかし、同定したニューロンからの内在性ニューロトロフィンの分泌の解析は、生理的刺激の際に放出されるこれらの因子の量が比較的小量であるため、従来のアッセイでは検出に限界がありました。そのため、従来の研究では組織スライスからの放出を検出したり、因子を過剰発現した細胞が使われていました。過剰発現の手法では、非常に高濃度にBDNFが発現されることにより得られたデータが、BDNFの通常の輸送や放出を反映しているかどうかは確認されていませんでした。初代知覚ニューロンからの内在性のBDNFの放出を調べるために筆者らは従来のELISAの変法であるELISA in situを行いました。ELISA in situでは、NPGニューロンをプロメガのAnti-BDNF mAbでコートした96ウェルのELISAプレートで培養し、放出されたBDNFを捕獲し、BDNF E_{max}[®] ImmunoAssay System（カタログ番号G7611、G7610）で抗体サンドイッチ法を用いて、その量を定量します。

ELISA in situによる持続性脱分極に続くBDNF放出の検出

図1のように、従来のBDNF ELISAのプロトコルを使うとコントロールの培養ではかなり低いレベルのBDNFしか検出されず、KCl処理したグループでもコントロールと比較してBDNFの濃度に大きな違いはありませんでした。一方、BDNF ELISA in situを用いるとより高いレベルのBDNFがコントロール培養で測定でき、持続性脱分極に続いてかなりの量のBDNFの放出が検出できました。

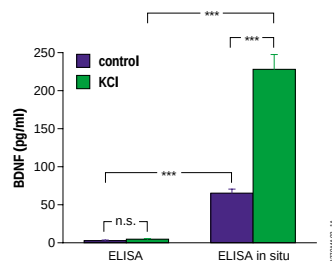


図1. 標準的なELISAとELISA in situにより検出した内在性BDNFの細胞外量。脱分極化濃度のカリウム（40mM; KCl）の存在下および非存在下で72時間培養した新生NPG（Nodose-petrosal ganglion）ニューロンの姉妹培養において平均のBDNF量を測定した。

*** P<0.001; n. s., not significant

迅速な捕獲が放出されたBDNFのTrk B受容体への結合を阻止する

筆者らはin situプロトコルによるBDNF検出能力の増加は、放出されたBDNFを迅速に捕獲固定し、細胞への結合や分解が起こりにくくするためではないかと仮定しました。この可能性を確認するために、まず外来のBDNFを培地のみあるいはNPG分離培養に加え、72時間後に従来のELISAとELISA in situによりBDNF量を比較しました。培地のみではこれらのレベルにほとんど差が見られませんでした（図2）。この結果はこれらの2つのアッセイが感度において変わらないことを示しています。しかし、NPG培養ではBDNFの量に大きな差が見られました。標準のELISAではBDNF量はBDNFを添加していないNPG培養と変わらず、NPG細胞の存在下ではBDNFが時間とともに培地から失われることが示されました。この結果は、BDNFが分解されたりTrk B受容体に結合することによって考えられました。実際に、Trk Bの機能を阻止する抗Trk B抗体で細胞を処理すると、従来のELISAで標準のNPG培養に添加されたBDNFを検出する能力が著しく増加します。したがって、標準のELISAでNPG培養中のBDNF放出がほとんど検出されないのはBDNFが培養細胞のTrk Bに結合するためであることが示唆されました。

結論

分泌されたBDNFの検出能力は、プロメガのBDNF E_{max}[®] ImmunoAssay SystemをELISA in situアッセイに適用することによって、大きく向上することが示されました。ELISA in situ技術を用いれば、従来よりもより生理学的条件に近い条件で放出の特性を調べたり、他の分泌型ニューロンタンパク質の解析に用いることができます。

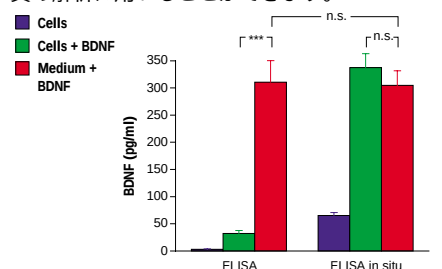


図2. 標準的なELISAとELISA in situによる外来のBDNFの検出感度

BDNF（カタログ番号G1491；500pg/ml）をプレート作成時に培養NPGと培地のみのコントロールに添加し、Anti-BDNFモノクローナル抗体の存在下（ELISA in situ）および非存在下（標準ELISA）で72時間培養した。外来のBDNFが添加されていないコントロール培養でもBDNFレベルを測定した。

*** P<0.001; n. s., not significant

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格（¥）
BDNF E _{max} [®] ImmunoAssay Systems	2×96回分	G7610	50,000
	5×95回分	G7611	100,000
Recombinant Human BDNF	5μg	G1491	48,500
Anti-NGF mAb	100μg	G1131	79,000
	20μg	G1132	17,000