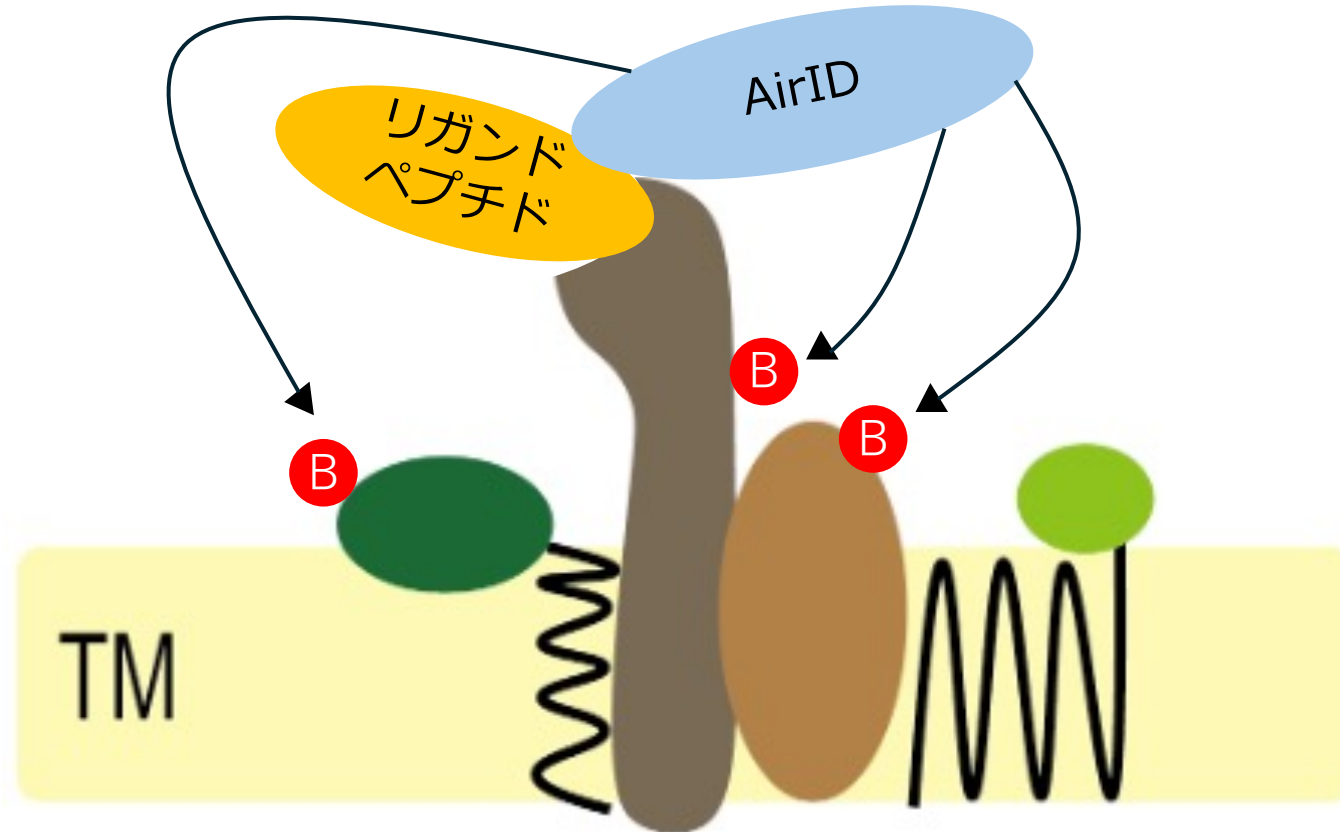


# 生体内ビオチン標識組織 検出プローブの開発

**PROS**  
Proteo-Science Center, Ehime Univ.

愛媛大学  
プロテオサイエンスセンター  
無細胞生命科学部門  
横田和俊

# 精製AirID融合タンパク質による処理

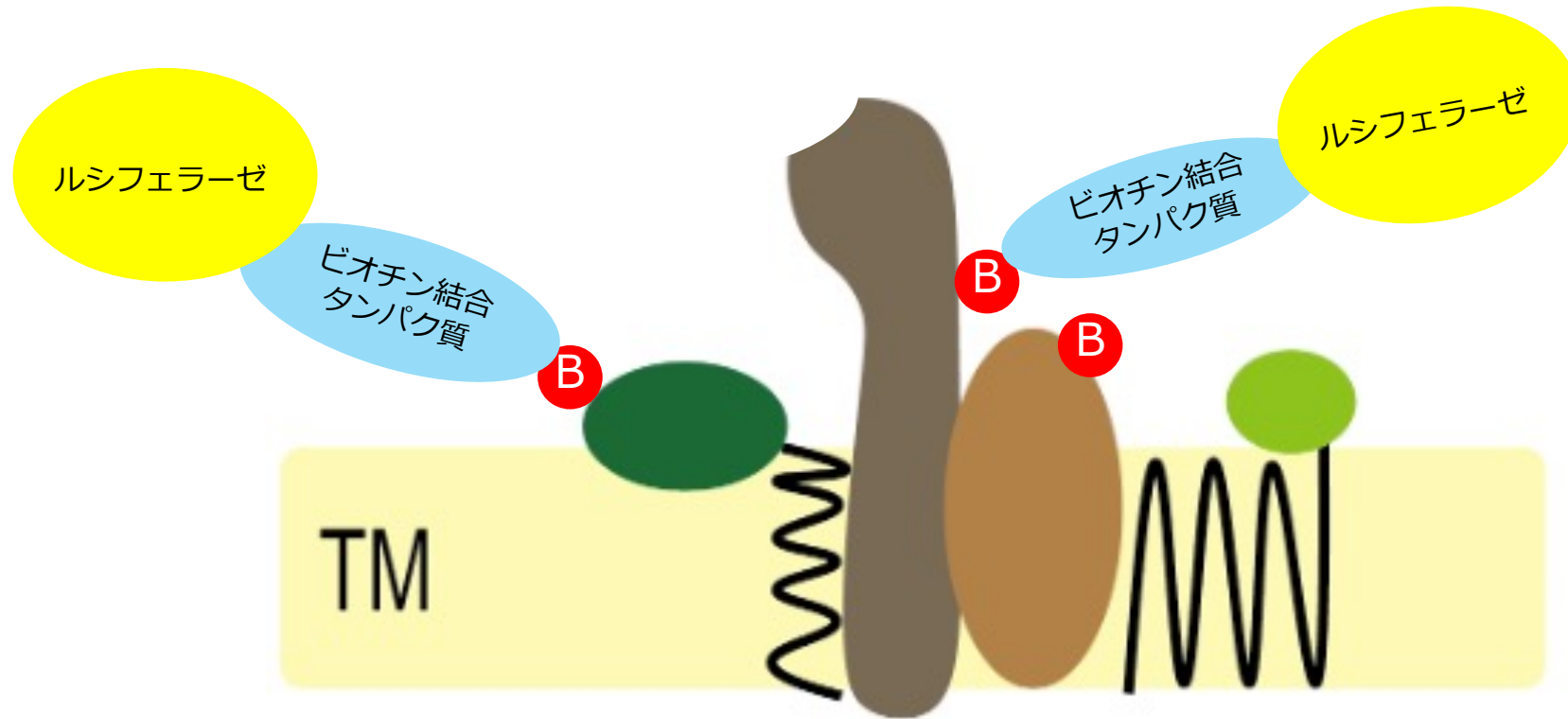


生体内の環境を反映して受容体を探索することができる



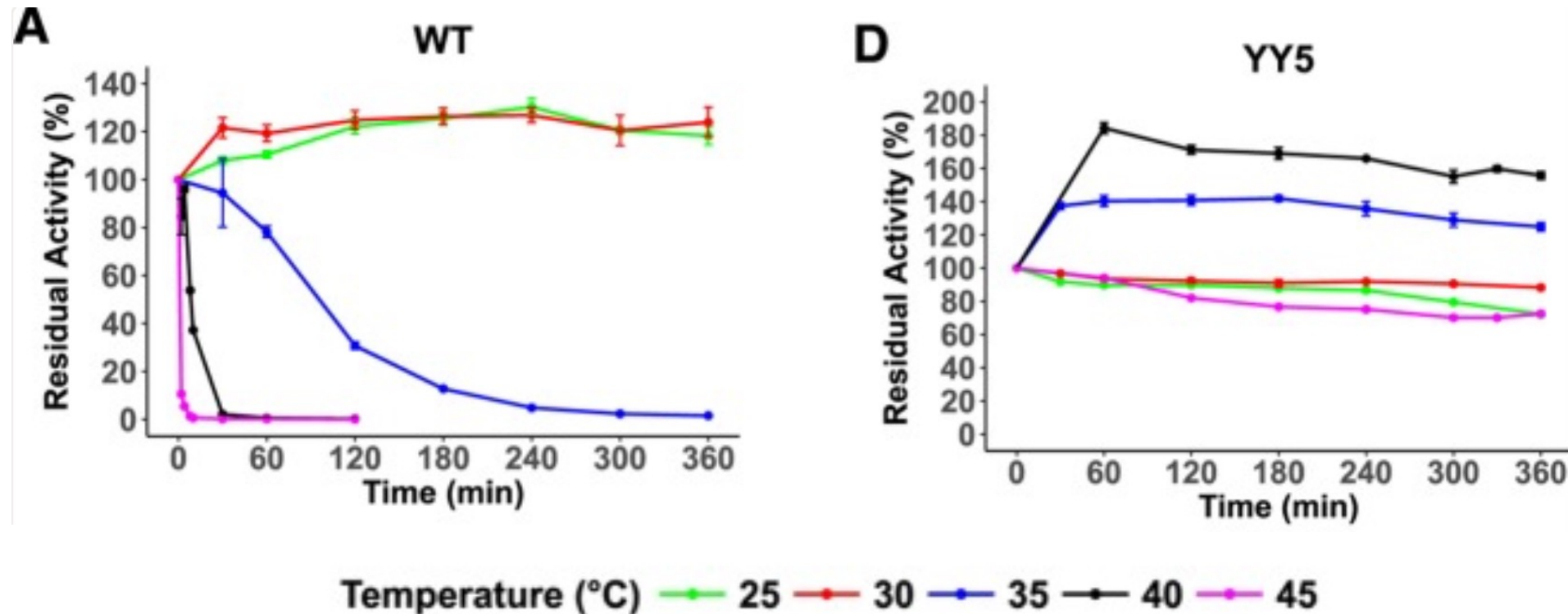
しかし、どこの組織がビオチン化されたかがわからない

# 生体内ビオチン標識組織の検出



ルシフェラーゼの発光によってビオチン標識組織を検出

# ホタルルシフェラーゼの変異体YY5



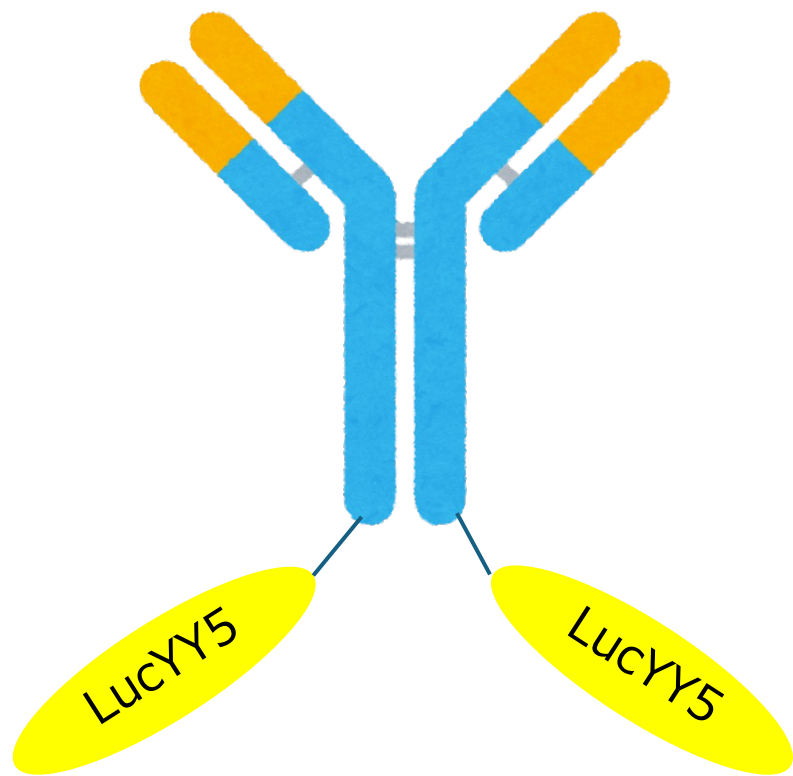
Tania Pozzo., et al. *ACS Omega*. 2018)

<https://doi.org/10.1021/acsomega.7b02068>

YY5はWTよりも高活性・高安定性なのでin vivo imagingに適している

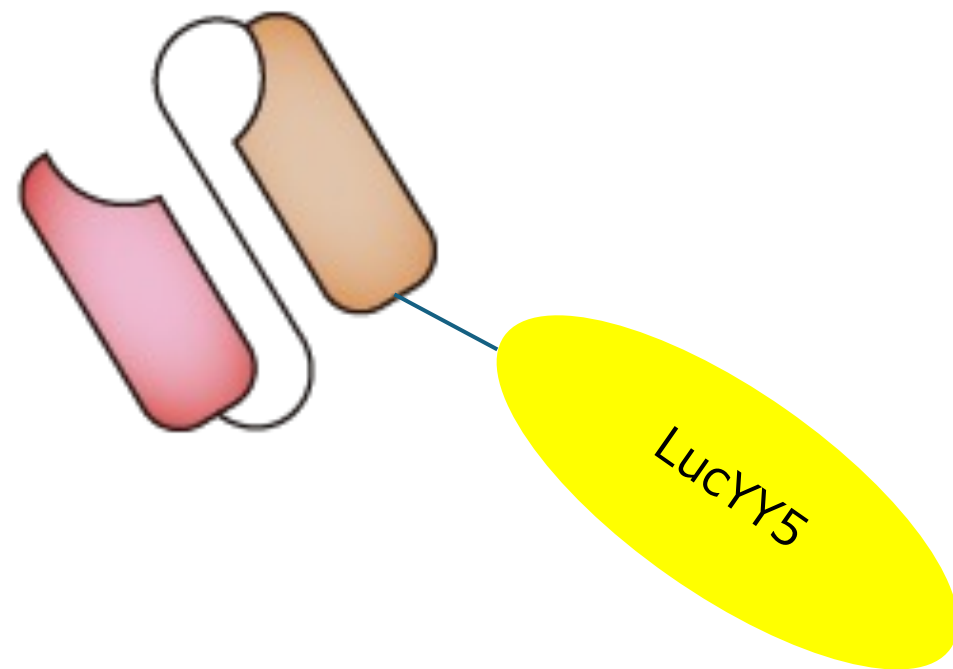
# ビオチン結合タンパク質との融合

IgG抗体



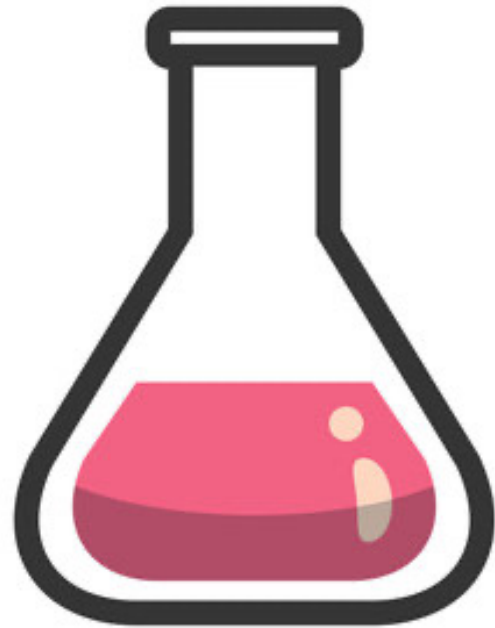
BB-IgG-LucYY5-His  
(IgG-Luc)

scFv



BB-LucYY5-His  
(BB-Luc)

# Expi293F細胞によるタンパク質合成

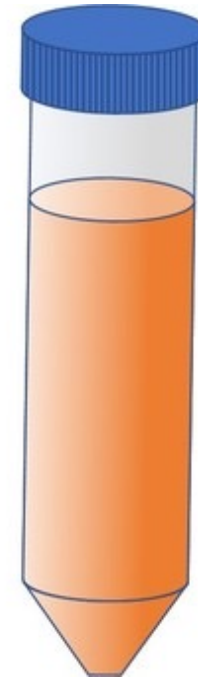


Expi293F

トランスフェクション

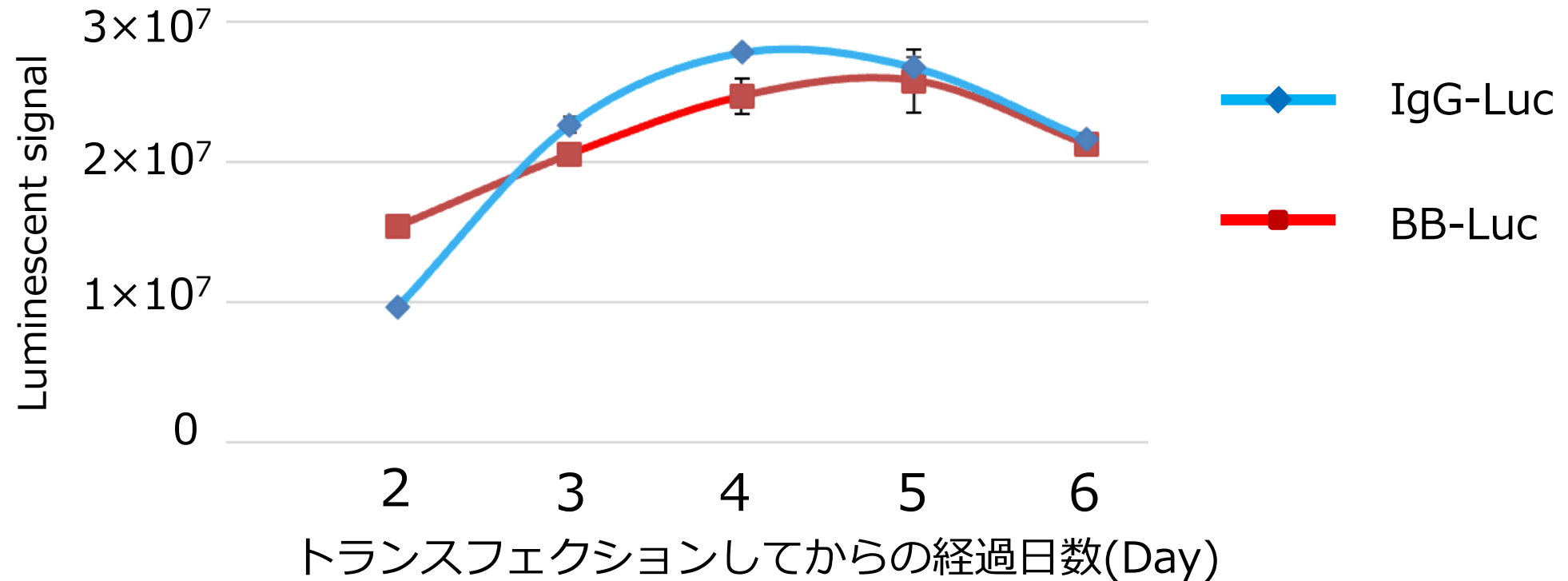


培養日数最適化



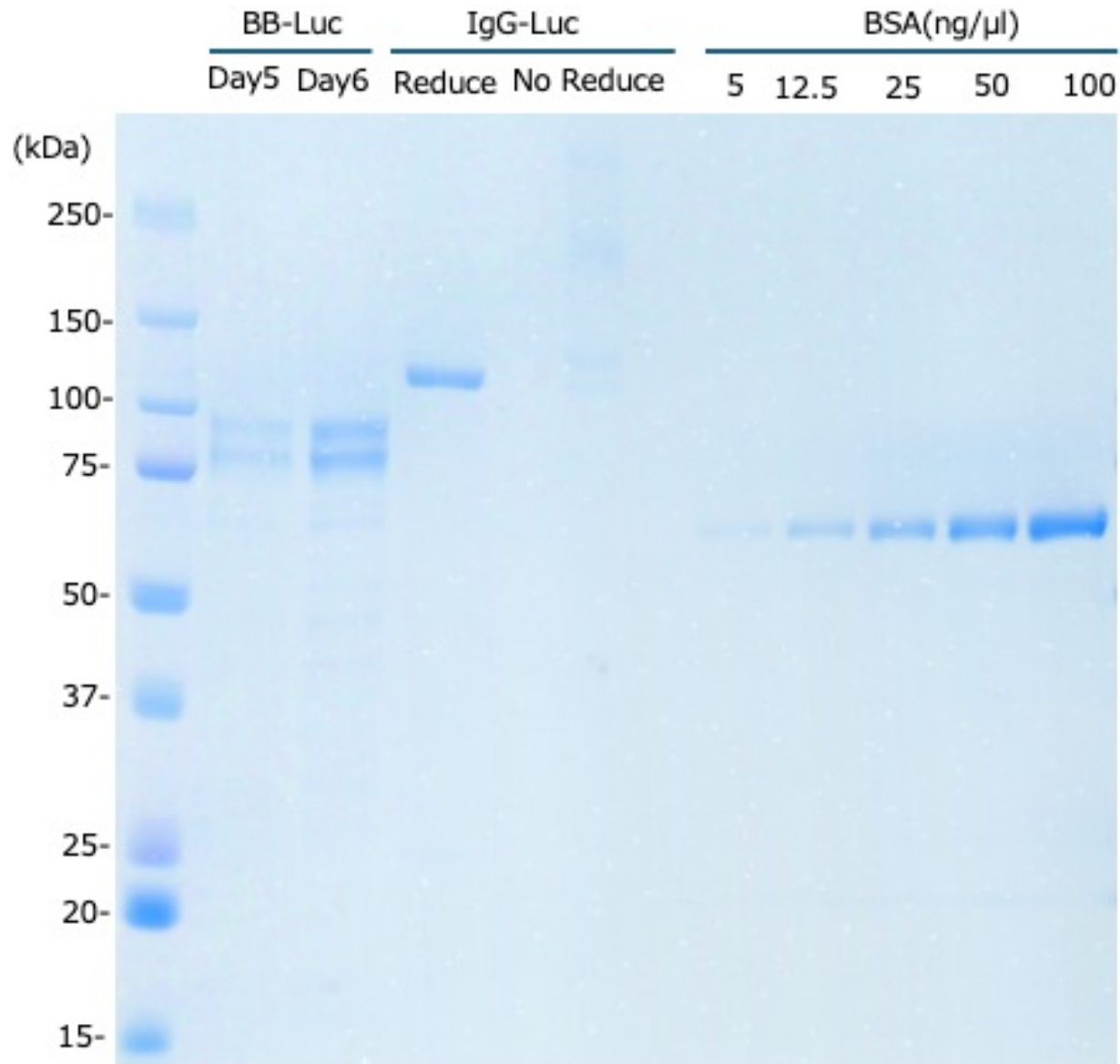
培養液を回収

# 培養日数とシグナル強度



IgG-LucはDay 4、BB-LucはDay 5に最も高い発光活性があった

# 精製したBB-LucとIgG-LucのCBB染色

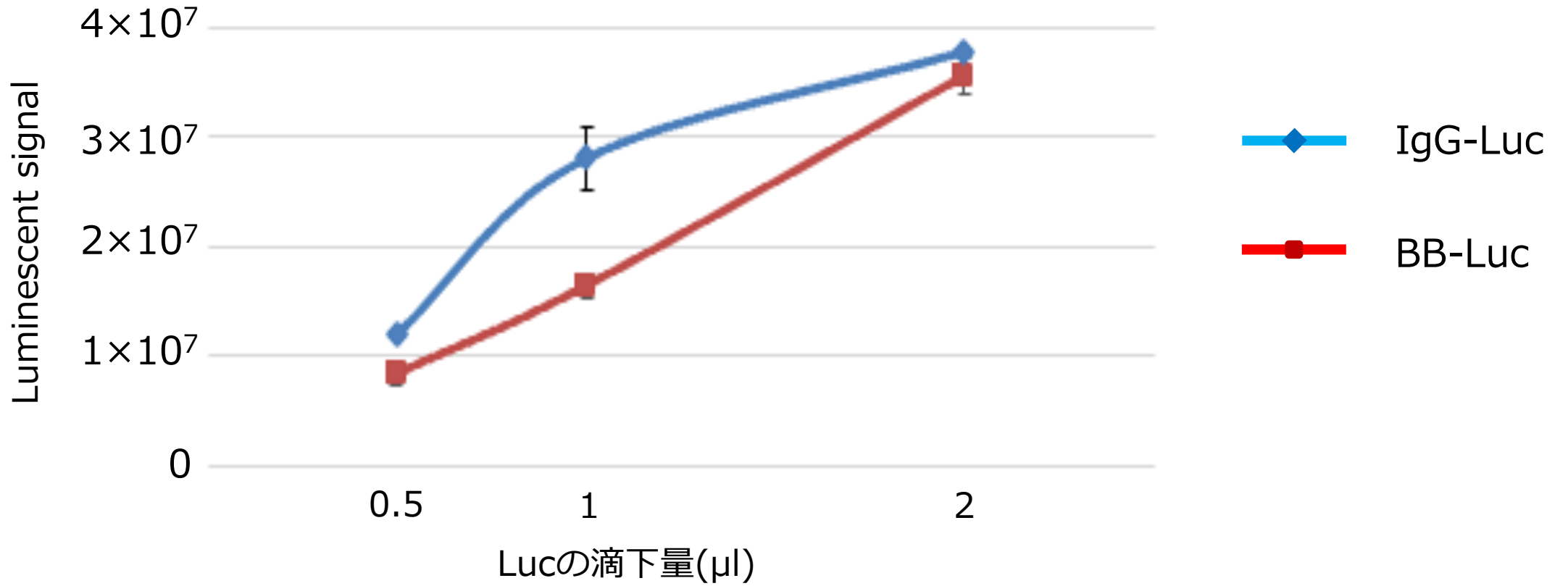


BB-Luc Day5 : 10 ng/μl

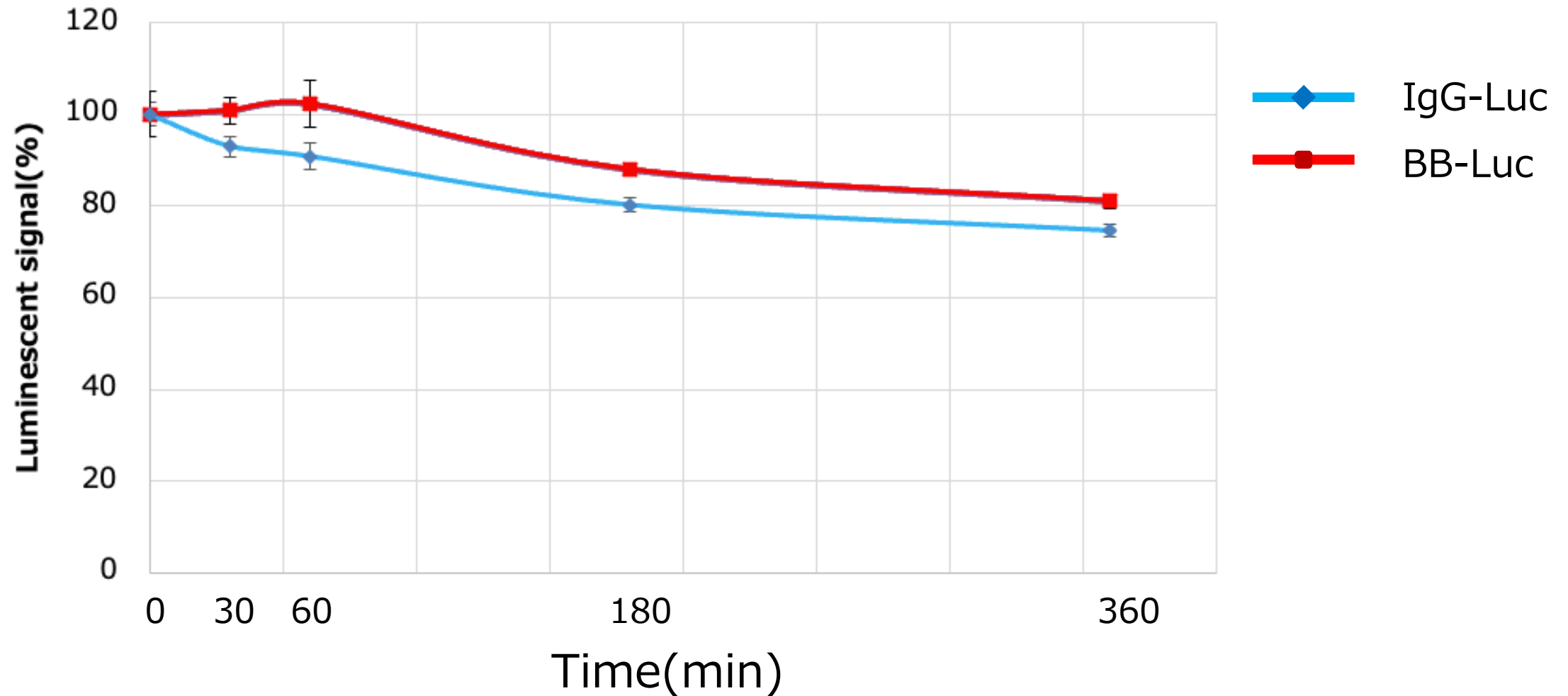
BB-Luc Day6 : 54 ng/μl

IgG-Luc Day4 : 143 ng/μl

# 精製後のシグナル強度

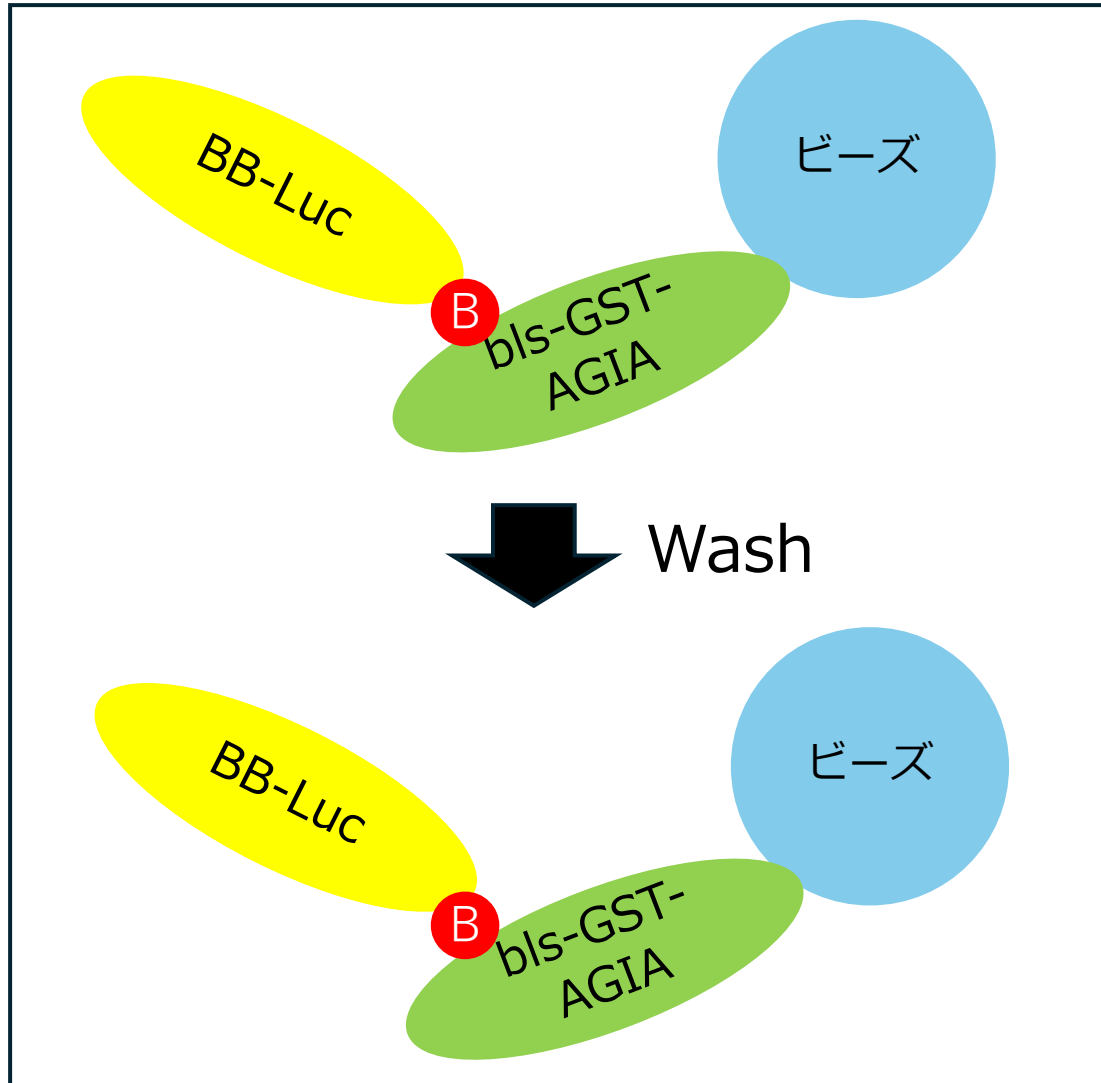


# 37°CでのIgG-LucとBB-Lucの熱耐性

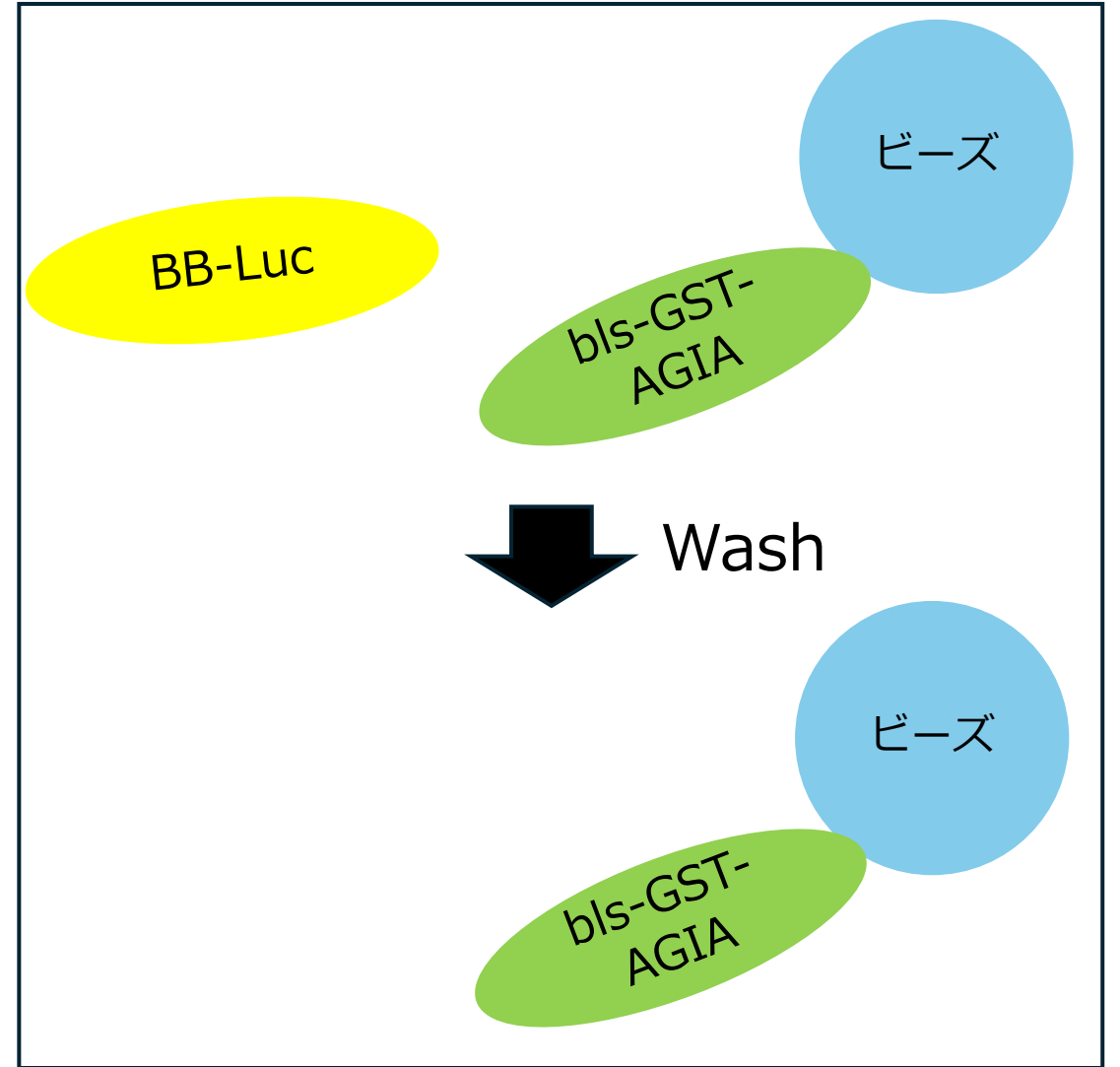


# IgG-LucとBB-Lucのビオチン結合能の評価

Biotinylated bls-GST-AGIA

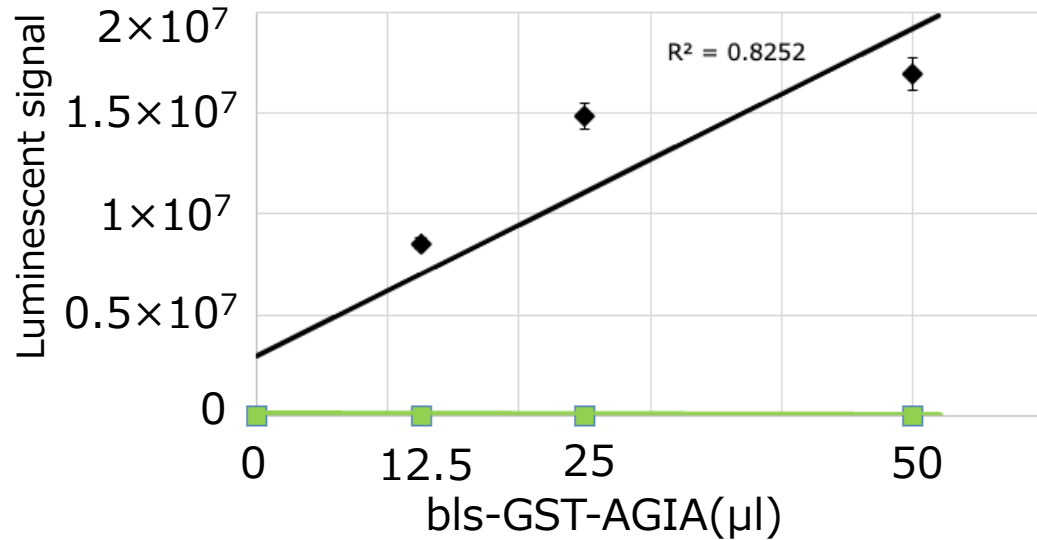


Non-Biotinylated bls-GST-AGIA

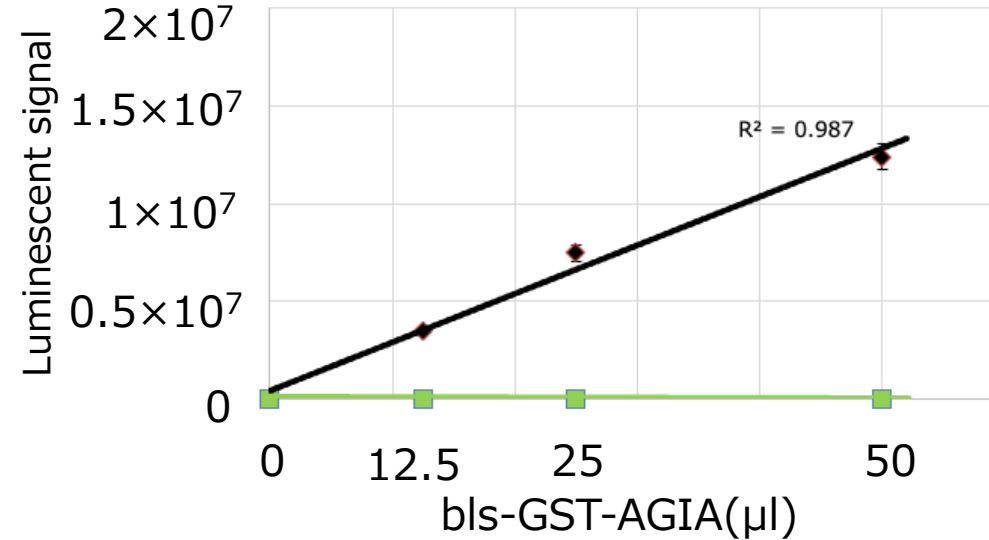


# IgG-LucとBB-Lucのビオチン結合能の評価

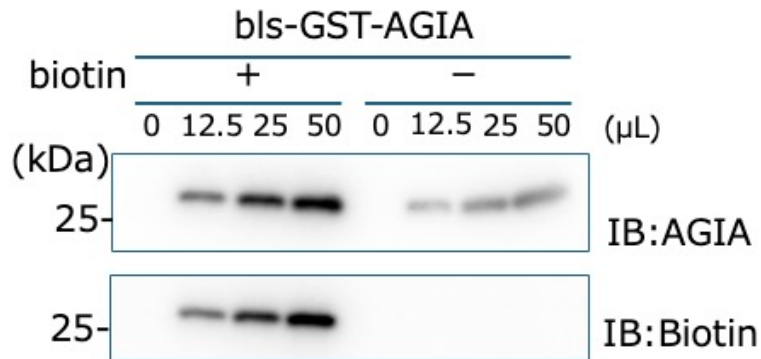
## IgG-Luc



## BB-Luc

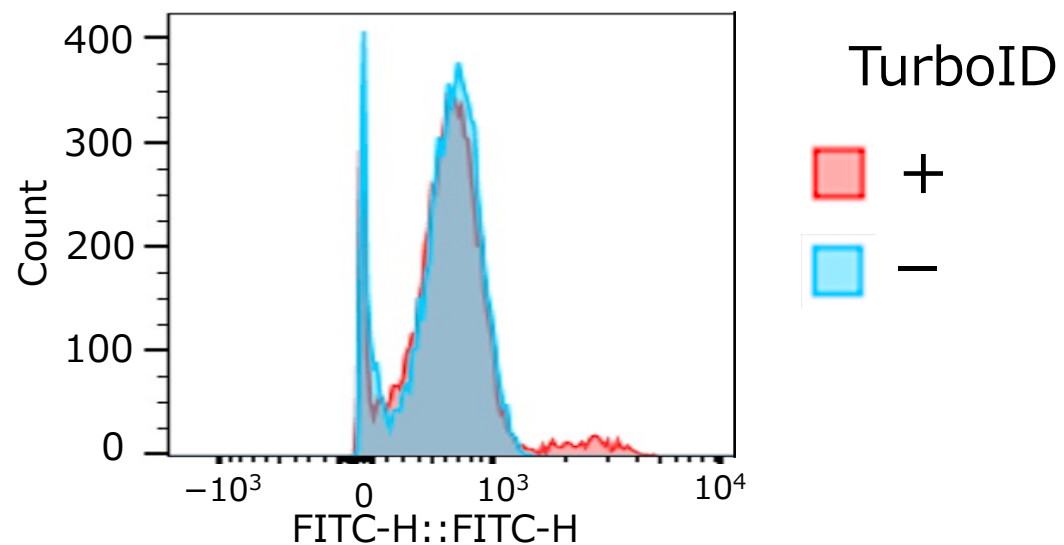
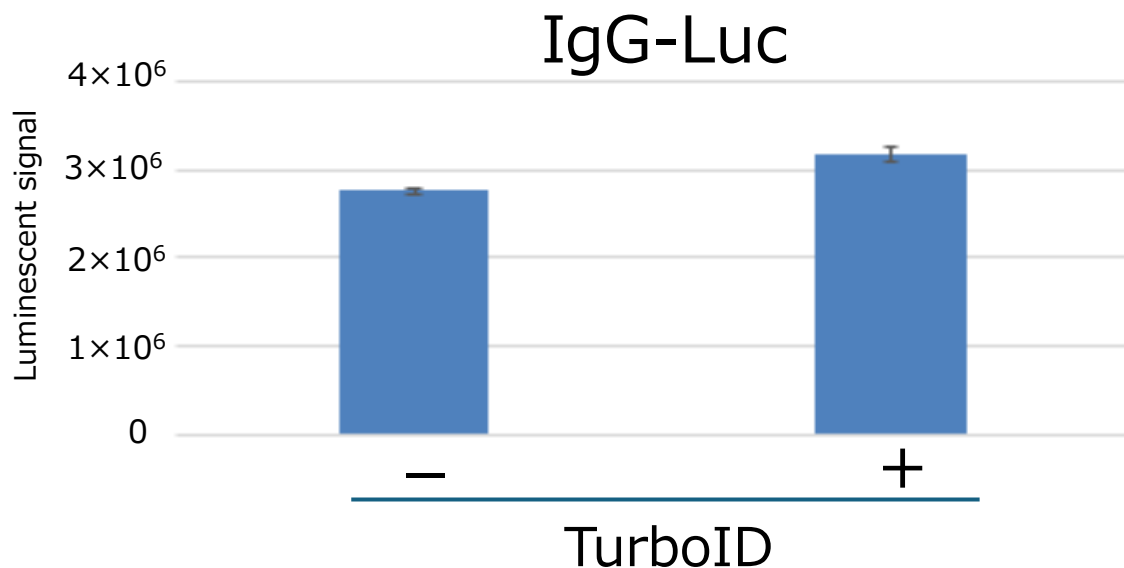
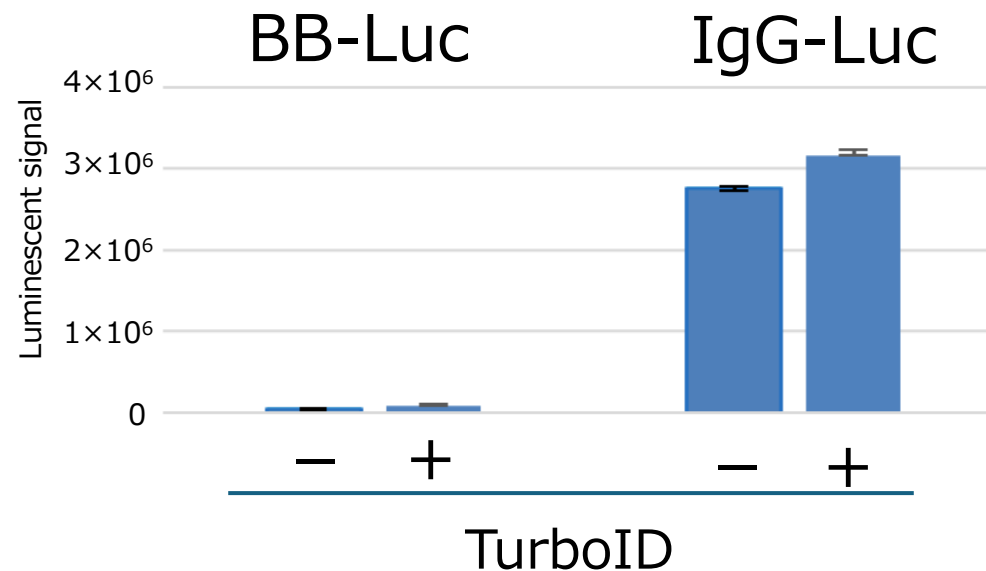
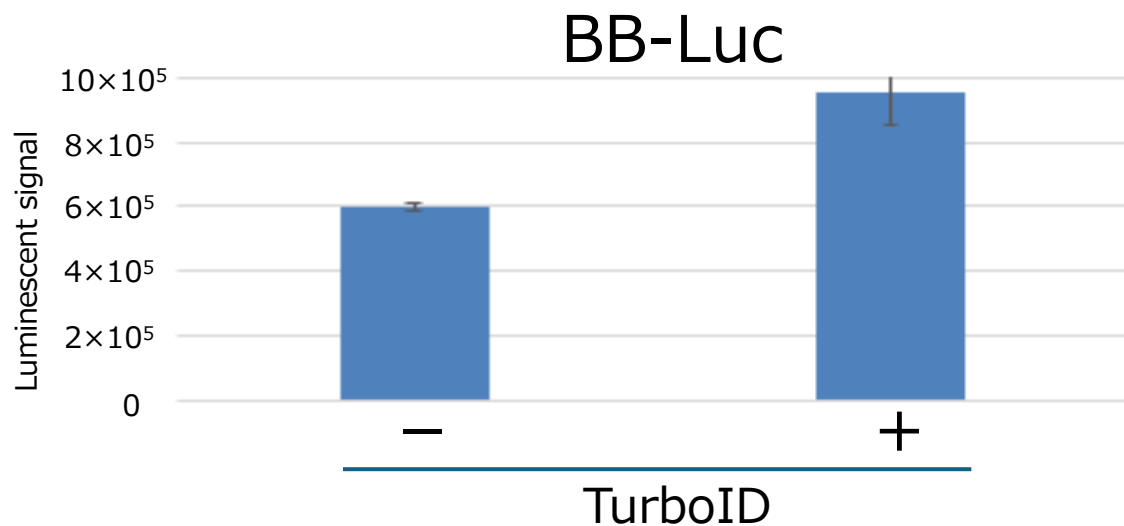


bls-GST-AGIA  
—◆— biotin  
—■— No biotin



IgG-LucとBB-Lucがビオチン化タンパク質に結合することを確認できた

# 細胞外ビオチン化細胞への結合能の評価



IgG-LucとBB-Lucが細胞外ビオチン化細胞に結合することを確認できた

# 今後行う実験

細胞外ビオチン化細胞を免疫不全マウスに移植して、IgG-LucまたはBB-Lucで検出できるかを検証する。