

Identification of immunoreactive proteins by accurate superimposing of Deep Purple-stained PVDF membrane and its immunoblotting images.

Deep Purple で染色した PVDF 膜画像とそのイムノブロット画像の正確な重ね合わせによる抗体反応性タンパク質の同定

吉田 豊先生
新潟大学大学院医歯学総合研究科附属腎研究施設 構造病理学分野

Key Word : ● Deep Purple ● PVDF 膜 ● イムノブロットング ● in-gel digestion ● MS 解析

はじめに

抗原が複数ある抗体、例えば抗リン酸化チロシン抗体と反応するタンパク質をイムノブロットングで検出した場合、そのタンパク質を同定することが困難なことがあります。イムノブロットングで検出されたタンパク質のバンド（あるいは二次元電気泳動の場合はスポット）と実際に Coomassie Blue あるいは銀染色で検出されるタンパク質バンドを正確にマッチさせることが技術的に難しいことが原因となります。ここでは、PVDF 膜に転写したタンパク質を Deep Purple Total Protein Stain (Deep Purple) で染色して Typhoon 9400 でスキャンした画像と、染色後抗体と反応させて ECL Plus により検出した画像を正確に重ね合わせる方法について解説します。Deep Purple で染色した PVDF 膜のタンパク質バンド（スポット）のパターンは、実際のポリアクリルアミドゲルで分離し、銀染色したタンパク質のパターンとほとんど一致しており、この方法を用いることで実際のポリアクリルアミドゲルで分離された抗体反応性タンパク質を特定し、質量分析計により同定することが容易になります。

使用した製品

Deep Purple Total Protein Stain (RPN6305)
Silver Staining kit, Protein (17-1150-01)
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents(RPN2132)
Typhoon 9400
Immobiline DryStrip pH 4-7, 18cm (17-1233-01)

その他の試薬

試料 : ラット腎臓系球体
抗体 : 抗リン酸化チロシン抗体 (P-Tyr-100, Cell Signaling Technology)

実験方法

Wistar ラットをジエチルエーテル麻酔下で開腹し、1 mM Na orthovanadate を含む PBS で灌流した腎臓の皮質からシービング法で糸球体を精製しました。糸球体は Lysis solution (1 % NP-40、0.1 % DOC、150 mM NaCl、1 mM EDTA、50 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM Na orthovanadate、25 mM NaF、protease inhibitor cocktail) 中で Polytoron を用いてホモジナイズし、4°C、12,000 rpm で 20 分間遠心して得た上清を SDS-PAGE の試料としました。二次元電気泳動 (2-DE) を行なう場合は、精製糸球体を直接 rehydration buffer (9.8 M urea、2 % NP-40、0.2 % Pharmalyte pH 3-10、100 mM DTT、0.01 % BPB、protease inhibitor cocktail) 中でホモジナイズし、同様な方法で試料としました。SDS-PAGE は Laemmli の方法で行い、10 % の分離ゲルを用いました。2-DE は一次元目の等電点電気泳動に 18 cm の Immobiline DryStrip pH 4-7 を用い、二次元目の SDS-PAGE に 20 × 20 cm の 10 % 分離ゲルを用いて常法に従って行いました。ウェスタンブロットングは不連続バッファー系を用いてセミドライ法で PVDF 膜に転写しました。Deep Purple 染色は製品プロトコールに従いました。イムノブロットングは一次抗体に抗リン酸化チロシン抗体 (P-Tyr-100)、二次抗体に horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (Envision、DAKO) を用い、ECL Plus により X 線フィルムに露光することにより可視化しました。また泳動後のポリアクリルアミドゲルを銀染色する場合は Silver Staining kit を用い質量分析用プロトコールで行いました。

結果および考察

ラット糸球体タンパク質をアプライ量を変えて SDS-PAGE で分離し、転写した PVDF 膜を Deep Purple で染色し、Typhoon 9400 で飽和バンドが出ない条件でスキャンした結果を図 1A に示しました。同様な条件で分離し、銀染色したポリアクリルアミドゲルの染色像 (図 1B) よりもほぼ同様か、もしくはより高感度の染色結果が得られました。Deep Purple で染色しない転写 PVDF 膜を抗リン酸化チロシン抗体を用いてイムノブロットングを行なった結果を図 1C に示しました。Deep Purple 染色後に同じ抗体でイムノブロットングした結果 (図 1D) とほぼ同様な感度を



示す結果が得られ、Deep Purple による PVDF 膜の染色がイムノブロットングの結果に影響しないことが明らかになりました。同様な方法で数種の他の抗体によるイムノブロットングを行ないましたが、Deep Purple による染色はイムノブロットングに影響しませんでした。

2-DE で分離したラット系球体タンパク質を PVDF 膜に転写し、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロットングを行なった結果を図 2 に示します。Deep Purple で染色した PVDF 膜の染色画像 (図 2A) は銀染色した 2-DE の染色画像 (図 2D) とほぼ同様かより高感度の染色結果が得られました。Deep Purple で染色した PVDF 膜を用いた抗リン酸化チロシン抗体のイムノブロット画像 (図 2B) と Deep Purple で染色した PVDF 膜画像は完全に同じサイズで、正確な重ね合わせができました (図 2C)。抗体と反応するタンパク質スポットも特定できました。そのスポットとマッチした銀染色画像上のスポットを切り出し、トリプシンで in-gel

digestion し、MALDI-TOF 質量分析計による peptide mass fingerprinting と LC-ion trap-MS/MS 解析することにより、信頼性の高いタンパク質同定結果を得ることができました。

まとめ

ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、Deep Purple で染色することにより、ゲルそのものを銀染色した場合とほぼ同感度、あるいはそれ以上の感度でタンパク質を検出することができました。また、Deep Purple による PVDF 膜の染色は、その後のイムノブロットングに影響を与えることはなく、イムノブロット画像と PVDF 膜上の Deep Purple で染色した画像を正確に重ねあわせて、抗体反応性のタンパク質を簡便に特定できることがわかりました。

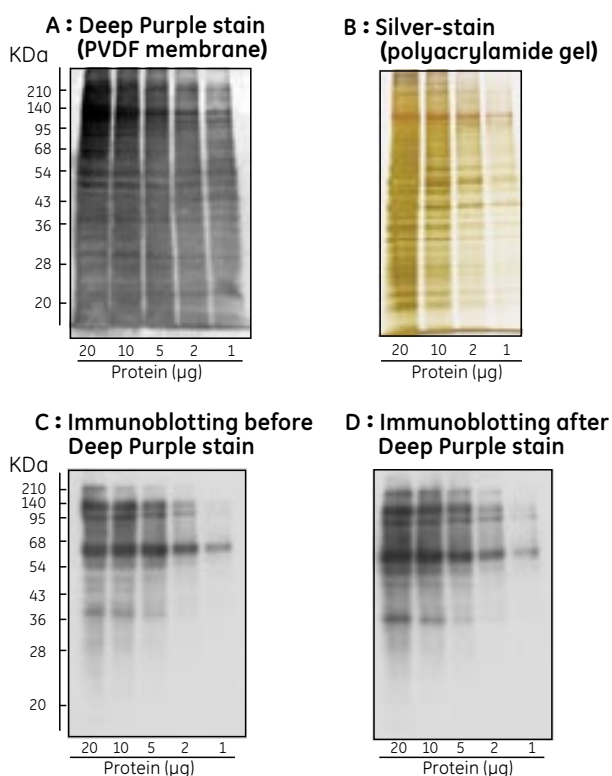


図 1 PVDF 膜を Deep Purple で染色した場合のイムノブロットングに対する影響

ラット腎系球体のタンパク質を 10 % の SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写後に Deep Purple で染色した画像 (A) と、同様な条件で分離したポリアクリルアミドを銀染色した結果 (B) を示しました。また、転写後の PVDF 膜をすぐに抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロットングし、ECL Plus で画像化した結果 (C) と同様な条件で PVDF 膜に転写し、Deep Purple で染色した後に (A) に抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロットングし、ECL Plus で画像化した結果を D に示しました。

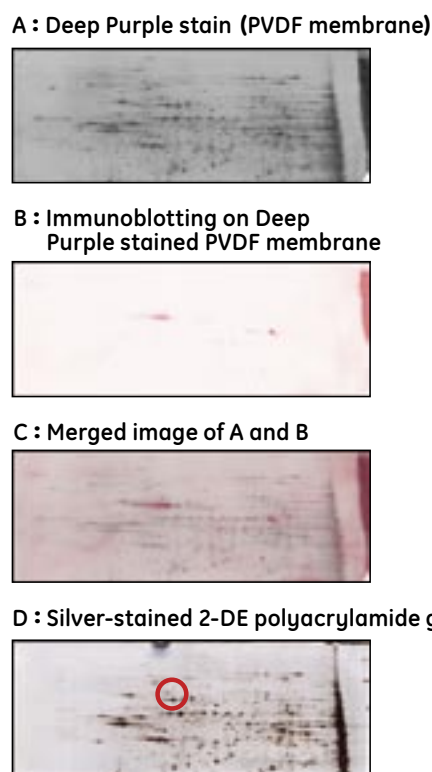


図 2 PVDF 膜の Deep Purple 染色を用いた二次元電気泳動で分離したラット腎系球体のチロシンリン酸化タンパク質の同定

ラット腎系球体タンパク質を、18 cm の Immobiline DryStrip を用いた 2-DE で分離し、PVDF 膜に転写後に Deep Purple で染色し (A)、また、同様な条件で分離したポリアクリルアミドゲルを銀染色した結果 (D) を示しました。Deep Purple で染色した PVDF 膜を抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロットングし、ECL Plus で画像化したものを、Photoshop version 7 (Adobe Systems) で疑似カラー化し (B)、A の Deep Purple 染色 PVDF 画像と重ね合わせるにより (C)、抗体と反応するスポットを特定しました。そのスポットと銀染色画像上のスポットをマッチングし、マッチしたスポット (D で赤丸で囲んだスポット) を切り出し、トリプシンで in-gel digestion し、質量分析計で同定しました。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL: 03-5331-9336 FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

製品のご注文は下記の代理店まで

Home Page www.gehealthcare.co.jp/lifesciences

この印刷物は、再生紙を使用し大豆インキにて印刷しています。

© 2006 GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社 本書の全部または一部を無断で複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。

掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。

掲載されている内容は、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。

掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。