

## タンパク質ポリアクリルアミド電気泳動ゲルの蛍光染色

Key words : 蛍光物質, SDS PAGE, SYPRO染色, プロテオミクス, イメージング, 二次元電気泳動, Typhoon

### はじめに

タンパク質の分離方法としては、アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEや二次元電気泳動などが広く用いられています。泳動パターンを検出方法としてはCBB染色や銀染色などが汎用されています。CBBは感度が低いですが操作がシンプルであるという特徴を持ちます。また、銀染色は感度が高いが手間がかかるという特徴を持ちます。感度が高くかつ手軽であるという両者の手法の利点を兼ね備えているのが蛍光染色法です。使用する蛍光物質に適した蛍光スキャナーを用いることで感度・定量性ともに高いデータを得ることができます。また、蛍光染色液は取り扱いが簡便で、サンプルの安定性や安全性にも優れています

#### (1)

タンパク質検出用の蛍光色素にはSYPRO Orange、Red、Ruby、Tangerineなどがあり、タンパク質のポリアクリルアミド電気泳動ゲルをワンステップで染色できるので、迅速かつ効率的な検出・解析が可能です。これらの染色液は銀染色法(2)と同等の感度を持ち、核酸やリポ多糖類の影響を受けずにタンパク質を検出することができます。

SYPRO Ruby染色は二次元電気泳動ゲル(2D PAGE)染色に適しています(2)。SYPRO Ruby染色後に回収したタンパク質スポットは質量分析やEdmanシークエンシングに使用できません。

Typhoonバリアブルイメージアナライザーではこれらの蛍光物質に適した検出が可能です。Typhoon8600/9200のシリーズは蛍光イメージングに適した2種類の励起光源を装備していません: Green(532 nm)とRed(633 nm)。Typhoon9400シリーズはこの他にBlueレーザーによる2種類の励起光源(457 nmと488 nm)を持っています。TyphoonとSYPRO染色を用いてより高感度なタンパク質検出が可能になります。

### 実験プロトコール

#### 1. ゲル染色と脱色

ゲルの染色と脱色は穏やかな速度で振盪しながら行います。染色は蛍光色素の付着が少ないポリプロピレン容器を 사용합니다。金属やガラス容器での染色は避けてください。また、蛍光の減衰を防ぐために容器をアルミホイル等で遮光します。

SYPRO Orange/Redは、7.5%(v/v)酢酸溶液で1:5,000に希釈します。希釈溶液はゲル容量の5~10倍量を用意します。次に30分間ゲルを染色します。その後7.5%(v/v)酢酸溶液に15分間浸しゲルを脱色します。

SYPRO Rubyの場合は、3時間以上かけてゲルを染色します。染色溶液はゲル容量の5~10倍量を用意します。2D PAGEゲルの場合は、染色前に40%(v/v)エタノール/10%(v/v)酢酸で30分間ゲルを固定します(固定操作によりゲルからのタンパク質の流出を抑制します)。染色後、脱イオン水で手早くゲルをすすいだ後に10%(v/v)メタノール/7%(v/v)酢酸溶液で30分間脱色します。

SYPRO Tangerineは、PBSバッファーで1:5,000に希釈次にし、40分間染色します。PBSバッファーに30分間ゲルを浸し脱色します。



## 2. 画像の取り込み

ゲルを3 mm厚の低蛍光ガラスプレートに載せ、焦点深度を“+3 mm”に設定してゲルイメージを取り込みます。ガラスプレートを使用するとゲルを傷つけずに取り扱うことができます。スキャン直後に、ガラスプレートをよく洗浄します(3. ガラスプレート・ガラスステージの洗浄を参照)。Typhoon本体ガラスステージ上に脱イオン水を少量載せてからガラスプレートを置くと、脱イオン水の薄層により干渉パターン(同心円状の縞模様)の出現が最小になります。ガラスプレートと本体ガラスステージの間に気泡が入らないようにします。ゲルをガラスステージに載せるときは少量の脱イオン水を注ぎ、その上にゲルを置きます。ゲルとガラスプレートの間にも気泡が入らないようにします。

または、焦点深度を“platen”に設定し、少量の脱イオン水を載せてから本体ガラスステージ上にゲルを直接置いて、取り込むこともできます。このときもゲルとガラスステージの間に気泡が入らないようにします。ゲルを置いた後、余分な水分を埃の出にくい紙(ケイドライなど)などで吸い取ります。スキャン直後に、ガラスステージをよく洗浄します(3. ガラスプレート・ガラスステージの洗浄を参照)。

次に表1よりTyphoonの推奨設定を選択します。適切なPMTボルテージ設定(400-950 voltage)、焦点深度設定を選択し、さらに次のパラメータを設定します: Pixel size-200 μm(2-D PAGEの場合は100 μm)、Sensitivity - Normal。

## 3. ガラスプレート・ガラスステージの洗浄

スキャンした後に、脱イオン水でぬらした柔らかい埃の出にくい紙(ケイドライなど)でガラスプレートあるいはガラスステージをきれいに拭きます。必要に応じて、サンプルリッドも拭きます。次に75%エタノールでガラスステージを拭き取ります。最後にエタノールによって溶出した蛍光性の残留物を脱イオン水にて取り除きます。通常の洗浄でガラスプレートあるいはガラスステージの汚れが落ちにくい場合、5~10%過酸化水素溶液で拭き取り、再び脱イオン水で残った過酸化水素を除去します。

表1. タンパク質電気泳動ゲルのSYPRO染色の励起(Ex.) 検出(Em.) 波長と推奨Typhoon設定

Gel stain ( Ex. / Em. )	Laser (励起波長)	Emission filter (蛍光フィルタ)
SYPRO Orange (470 nm / 570 nm)	Green (532 nm) / Blue (488 nm)	555BP20
SYPRO Red (550 nm / 630 nm)	Green (532 nm)	610BP30
SYPRO Ruby (450 nm / 610 nm)	Green (532 nm) / Blue (457 or 488 nm)	610BP30
SYPRO Tangerine (490 nm / 640 nm)	Green (532 nm) / Blue (488 nm)	610BP30

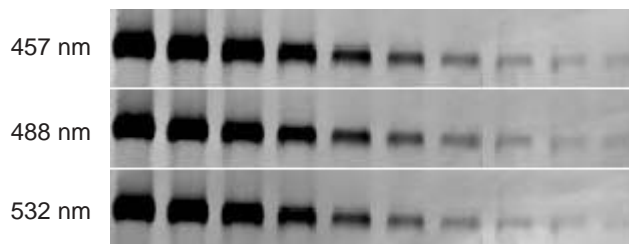


図1. 異なる励起波長による検出限界の違い

Typhoon 457 nm (上段) 488 nm (中段) 532 nm (下段)の励起波長と610BP30の蛍光フィルタでSYPRO Ruby染色したBSAサンプル 1D SDS PAGEゲルを検出しました。各レーンのBSA量は512 ng から1 ngまでを2倍ずつ段階希釈しました。左から: 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 ng。

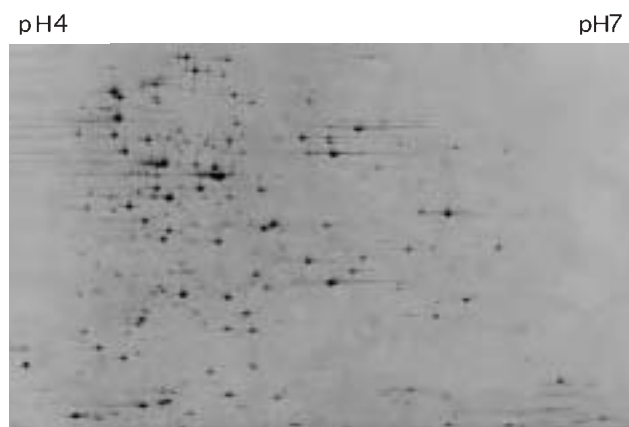


図2. 2-D PAGEゲルのSYPRO Ruby染色

*E. coli* 抽出タンパク質(100 μg)を18 cm Immobiline DryStrip, pH 4-7, Ettan DALTtwelve システムで12%T、1 mm厚 Laemmli 系バッファで泳動しました。ゲルは5倍容量のSYPRO Rubyで一晩染色し、Typhoonで検出しました(励起: 532 nm、フィルタ: 610BP30)。

## 結果

図1にSYPRO Ruby染色したSDS PAGEゲル(サンプル: BSA希釈系列)をTyphoonの457 nm、488 nm、532 nmのそれぞれの励起光源で検出した例を示します。注目すべき点はどの励起光源を用いても検出限界がTyphoonの性能によって制限されないということです。例えば、励起極大450 nmのSYPRO Rubyを励起するためには理論上532 nmよりも457 nmの光源を使用の方が適切です。しかし、この結果は457 nmと532 nmで検出したSYPRO Ruby染色BSAゲルの画像が同等であることを示しています(図1)。図2は2D-PAGEゲルをSYPRO Rubyで染色し、Typhoonの532 nmの励起光源で検出した例で

す。ImageMaster 2D Eliteソフトウェアで379スポットが検出されました。457 nm、488 nmの励起光源でも同様にテストしました。SYPRO Rubyを励起する3種類の励起光源のいずれでもスポット数あるいは検出感度の大きな相違は観察されませんでした。

SYPRO Ruby染色を行ったSDS-PAGEゲル（サンプル：BSA希釈系列）での検出限界（LOD：バックグラウンド値を修正したシグナル/ノイズ（S/N）が3以上である値）は1 ng / バンドであり、直線性の範囲は、3オーダーあることが分かりました（図3）。SYPRO Rubyを励起させる3つの波長（457 nm、488 nm、532 nm）で同様の感度、直線性の範囲が得られました。SYPRO Ruby染色による1D PAGEゲルの検出限界および直線性の範囲がそのまま2D PAGEゲルの絶対的な検出限界および直線性の範囲を表わしてはませんが、同様の感度を有していると予想できます。

感度が低い場合の原因としては主に染色ゲルのバックグラウンド、染色液の不足によるタンパク質との化学量論的な結合不足などが挙げられます。

表2に、表1に示されたTyphoonの検出設定を使用してスキャンした場合の、SYPRO Orange、Red、RubyおよびTangerine染色したBSAの検出限界および直線性の範囲をまとめました。Typhoonは5オーダー（1から100,000まで）の広いリニアダイナミックレンジを持っているので、将来的にSYPRO染色によるタンパク質検出の直線性の範囲（3オーダー）を上回る蛍光染色法が開発されたとして、より高い定量性を持った画像結果を得られる可能性があります。この他、TyphoonはCy2、Cy3、Cy5で直接タンパク質を標識して二次元電気泳動を行う2D DIGE（3）も感度よく検出することができます。

表2. Typhoon でのSYPRO Orange、Red、Ruby、Tangerine染色 BSAバンドの検出限界（LOD）のまとめ

Gel stain	Typhoon LOD (ng / band)	リニアダイナミックレンジ (fold)
SYPRO Orange	2	~1,000
SYPRO Red	2	~1,000
SYPRO Ruby	1	~2,000
SYPRO Tangerine	2	~1,000

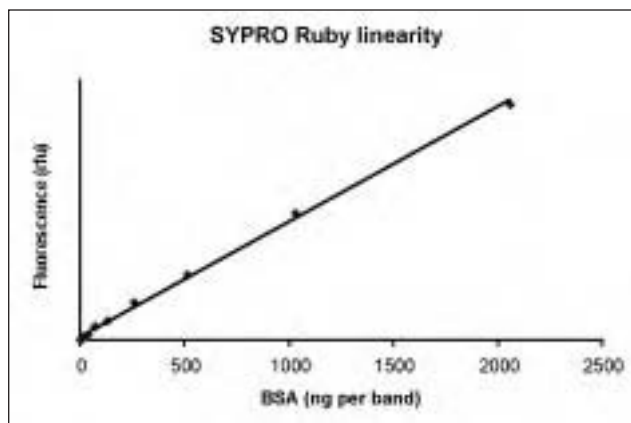


図3. SYPRO Rubyで染色したときのBSA泳動量と蛍光強度の関係  
蛍光強度は相対蛍光単位（relative fluorescence units : rfu）で示されています。横軸はバンド対BSA量（1~2,060 ng / バンド）を示しています。データの線形は、少なくともR<sup>2</sup>値0.99を持っています。直線性の範囲は3オーダーであるとわかりました。

#### 文献情報

1. *Fluorescence Imaging: principles and methods*, GE Healthcare, code number 63-0035-28 (2000)
2. Patton, W. F., *Electrophoresis* 21, 1,123-1,144 (2000)
3. Tonge, R. *et al*, *Proteomics* 1, 377-396 (2001)

SYPROはMolecular Probes Inc. のトレードマークです。その他本文中の全てのブランド名または製品名は各社の商標もしくは登録商標です。

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

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、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。