

# 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動の原理

Key Words : Ettan DIGE、二次元ディファレンス解析、Internal Standard (内部標準)、  
2D DIGE (2D Difference Gel Electrophoresis)

Now part of  
GE Healthcare

GE imagination at work

## はじめに

二次元電気泳動法は、タンパク質の二種類の特性 (通常は等電点と分子量) を利用して分離する手法で、高精度な分離法として汎用されています。二次元電気泳動をタンパク質の発現差異解析に応用する場合には、二種類 (あるいはそれ以上) のサンプルを別々のゲルで泳動して染色した後、検出した画像を比較していくことになります。この方法は煩雑なうえ、実験操作に起因する誤差と生物学的に意味のある発現差異を区別するのが非常に困難であるという問題があります。

蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動は、タンパク質の蛍光標識と二次元電気泳動技術を組み合わせた解析手法 (2D DIGE 技術) です (図1)。異なる蛍光波長をもつ色素でそれぞれのタンパク質サンプルを標識し、同一ゲル上で一括して二次元電気泳動後、発現差異を解析することにより、従来の問題点を克服することができます。本報では、弊社の提案する2D DIGE技術を使用したEttan DIGEシステムの基本原理をご紹介します。

## Ettan DIGEシステムの特徴

- 専用蛍光色素 CyDye DIGE Fluors で泳動前にサンプル標識を行うので、3種類までの異なるサンプルを同一ゲル上で泳動できます。
- Internal Standard (内部標準) の利用により、同一ゲル内のみならず異なるゲル間での比較も正確に行えます。
- 統計学的な裏付けのある、高精度かつ定量性のあるデータを得ることができます。Ettan DIGEでは、システムや実験条件の違いに起因する誤差を排除した、真の生物学的な発現差異のみが検出されます。

Ettan DIGEシステムの主な利点は、内部標準を利用することで得られます。ここでいう内部標準とは、各サンプルに含まれるすべてのタンパク質を含むもの (ほとんどの場合、各サンプルの混合液; 一例を図4に示します) で、タンパク質の泳動パターンのマッチングに用いられます。この内部標準を各ゲルに泳動することにより、従来の二次元電気泳動の主な問題点である泳動誤差やゲル間によるばらつきを回避することが可能です。各サンプル間にみられる統計学的に有意な生物学的タンパク質発現変動を検出することができるのは、こうした内部標準の利用が可能なEttan DIGEシステムだけです。

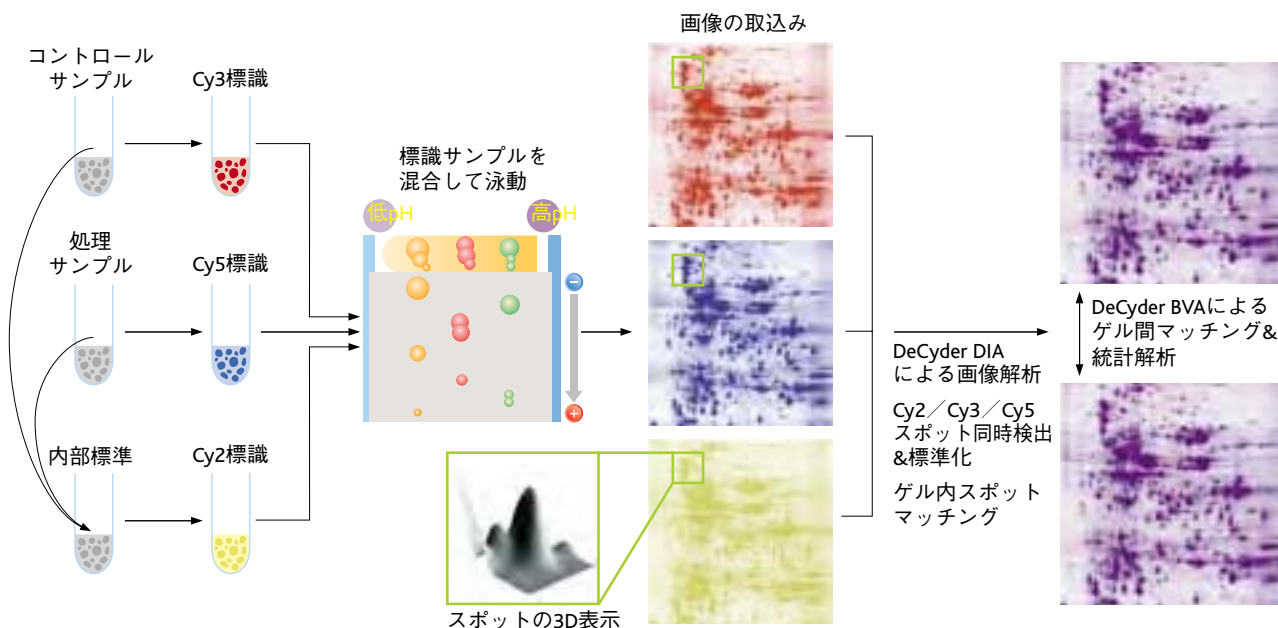


図1. Ettan DIGEシステムの概要 (3種のCyDyeを使用)

蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動 (2D DIGE) 法では、二次元電気泳動前に分子量および電荷が等しく、蛍光波長のみが異なる専用蛍光色素 CyDye DIGE Fluors でタンパク質を標識します。

## 蛍光標識色素：CyDye DIGE Fluors (minimal dyes)

専用蛍光標識試薬 CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) には、Cy2、Cy3 および Cy5 の 3 種類があり (図2)、電荷および分子量が等しくなるよう設計されています。したがって、同一のタンパク質を標識した場合、泳動後の 2D ゲル上での位置も一致します。

CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) は、反応性 NHS エステル基をもち、アミド架橋反応によりリジン残基の  $\epsilon$  (イプシロン) 位のアミノ基に共有結合するようにデザインされています (図2)。CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) とタンパク質の結合反応は、タンパク質への質量付加が最小となるように至適化されており、最終的にはリジン残基全体の約 1 ~ 2 % を標識することになります。標識されたタンパク質にはそれぞれ 1 分子の CyDye が添加されています。このように、サンプル全体のごく一部のみを選択的に標識する方法は minimal labelling (最少標識法) と呼ばれます。

タンパク質中のリジン残基は、中性~酸性下では内在的に +1 に荷電しています。CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) も +1 に荷電していますが、結合時にリジン残基の +1 電荷を自身の電荷と置き換えるため、タンパク質の pI を有意に変えることはありません。

## 専用画像解析ソフトウェア：DeCyder

DeCyder ソフトウェアは、特殊なアルゴリズムをもち、複数サンプルを同一のゲルで泳動するメリットを十分に引き出します。DeCyder は、検出、バックグラウンド補正、スポットボリュームの定量、標準化およびゲル内マッチングを自動で行い、わずか 10 % の発現差異を 95 % 以上の統計学的信頼度で検出する、すぐれた精度も達成しています。また、2,000 個以上のスポットを自動検出する機能も



図2. CyDye DIGE Fluors (minimal dyes)

備えているため、解析のスループットも飛躍的に向上しています。

## 2Dゲルからのスポットの切り出し

DeCyder による解析の結果、有意な発現差異の確認されたタンパク質スポットをゲルから切り出し、質量分析用サンプルを調製することができます。

スポット切り出しの際に考慮すべき点は、サンプル中に存在する標識/非標識タンパク質の 2 群についてです (minimal labelling 法による標識のため)。CyDye 標識タンパク質と非標識タンパク質の泳動後の 2D ゲル上の位置は CyDye 1 分子 (約 500 Da) 相当分だけ異なります。ゲルイメージとして検出されたスポットの中心を切り出すと仮定すると、目的タンパク質の含有率が最も高い部分が切り出されるとは限りません。この問題点を回避するには、CyDye DIGE Fluors で標識した解析用ゲルに加えて、泳動後に全タンパク質染色した切り出し用ゲルを別途用意します。切り出し用の染色ゲル画像と解析用の CyDye DIGE Fluors 画像をマッチングし、スポットの切り出し位置を特定します。

サンプルが貴重な場合など、解析用ゲルを染色して切り出し用ゲルとして使用することも可能です\*。

\*この場合、切り出されるスポットに十分量のタンパク質が含まれていないために、質量分析で思わしい結果が得られないこともあります。

## 一般的な二次元電気泳動と Ettan DIGE の違い

図4に示すように、一般的な二次元電気泳動解析を利用して発現差異の解析を行う場合、ゲル間のばらつきによって、差異のあるスポットを見落とししたり、本来差異のないスポットを差異のあるスポットとして検出してしまう場合があります。Ettan DIGE システムでは、まず、ゲル内で内部標準とサンプルの差異を比較します。ゲル間のサンプルを比較する場合は、内部標準をベースにした相対量比を比較

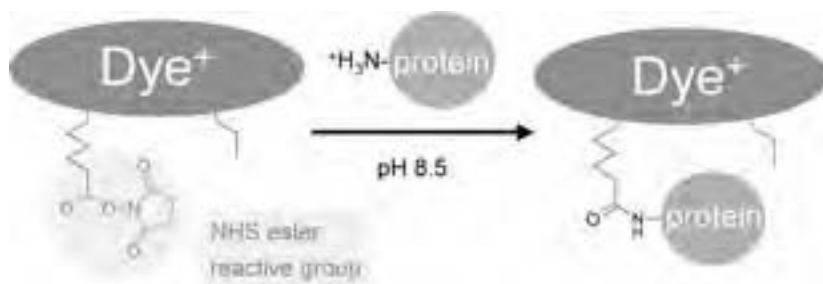
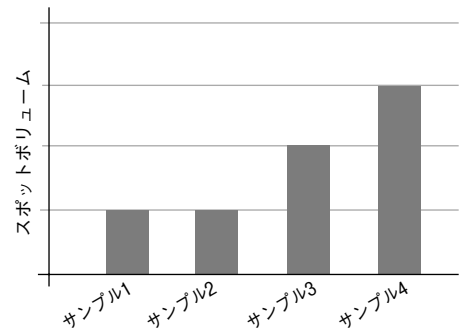
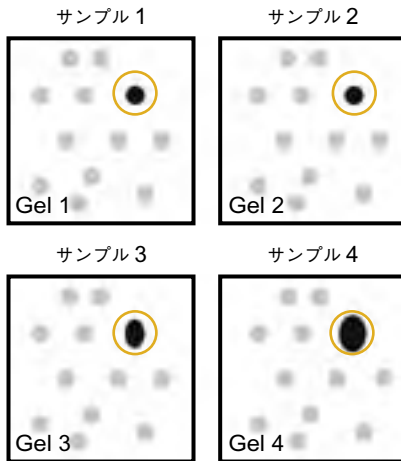
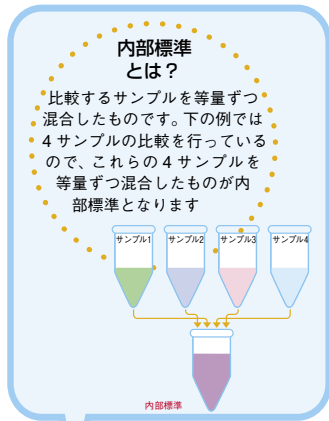


図3. CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) の標識反応

### a) 一般的な二次元電気泳動を用いた発現差異解析

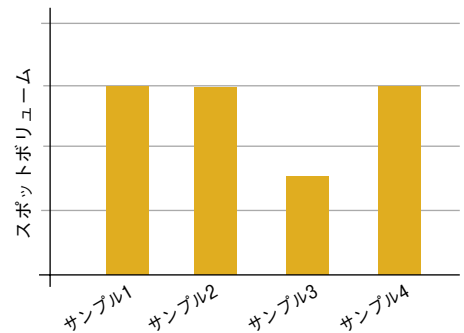
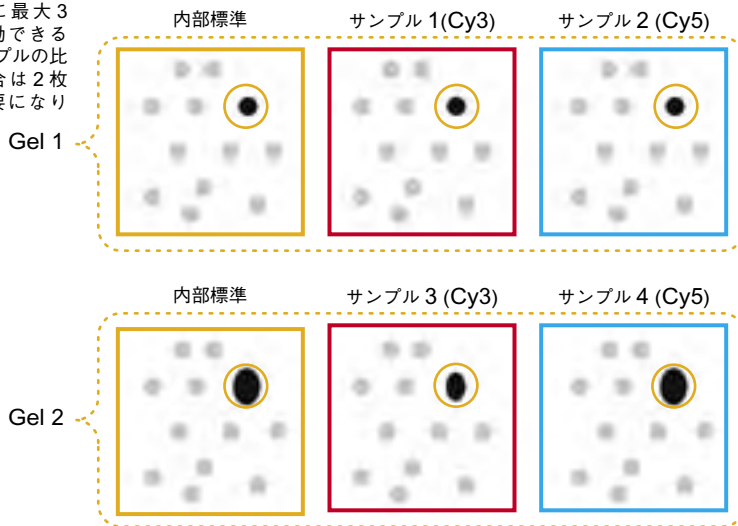
1枚のゲルに1サンプルしか泳動できないので、4サンプルの比較を行う場合は4枚のゲルが必要になります。



図の○で囲んだスポットを比較した場合、サンプル3、4ではタンパク質量が増加したように見えますが、これが生物学的なタンパク質発現量の差なのか、ゲル間の泳動のばらつきによる差なのか区別できません。

### b) 内部標準を使用する Ettan DIGE による正確な発現差異解析

1枚のゲルに最大3サンプル泳動できるので、4サンプルの比較を行う場合は2枚のゲルが必要になります。



同じ内部標準を2枚のゲルに泳動することによって、ゲル間のばらつきを標準化することができます。これにより生物学的な発現差異のみを検出することができます。補正の結果、○で囲んだ注目スポットはサンプル3でタンパク質量が減少していることがわかりました。

図4. 一般的な二次元電気泳動と Ettan DIGE の違い

するため、ゲルの違いによる影響を排除したタンパク質の発現量差異の比較が可能です。また、内部標準の使用によりゲル間のスポットマッチングが容易、正確になります。

うになります。今後は、網羅的な発現差異解析のみならず、さまざまな疾患の研究や翻訳後修飾・パスウェイ解析など、さまざまな分野への応用が期待されます。

#### まとめ

Ettan DIGE システムの使用により、生命現象の鍵を握るタンパク質の発現差違を、高精度かつ迅速に把握できるよ

ホームページ上で文献リストやQ&Aなどをご紹介します。  
[http://www.jp.amershambiosciences.com/technologies/ettan\\_dige/index.asp](http://www.jp.amershambiosciences.com/technologies/ettan_dige/index.asp)

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 サンケンビルヂング

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。