

蛍光検出基礎知識 検出の達人への道 核酸のプロットティングと標識・検出

Key Word : サザンプロットティング、ノーザンプロットティング、ケミフローレッセンス

前回(2004年11月配信分 milestone 「ウェスタンプロットの蛍光検出」)ご紹介したタンパク質のプロットティングと同様に、蛍光検出は核酸のプロットティング法にも広く用いられています。ここでは核酸のプロットティングの基本的な原理と蛍光を用いた標識・検出方法についてご紹介します。

サザンプロットティング・ノーザンプロットティング

電気泳動により分離したDNAを毛細管現象などを利用してメンブレン上に転写することをサザントランスファーあるいはサザンプロットティングと呼びます。この手法では、メンブレンに転写されたDNAサンプル中の検出したい配列に対して相補的な配列をもつDNAプローブを用いて特異的に検出します。同じように、mRNAあるいはトータルRNAのメンブレンへの転写をノーザンプロットティングと呼び、RNAあるいはcDNAプローブを用いて特異的に検出します。この手法により、検出の対象となる遺伝子のサイズと発現量を算出することが可能です。

実験手順としては、アガロース電気泳動でDNAフラグメントやRNAを分子量に従って分離後、核酸をゲルからメンブレンにプロットティング、固定化します。続いて、標識プローブとハイブリダイゼーションを行い、特定の配列を含むバンドを化学発光や化学蛍光、ラジオアイソトープのシグナルとして検出・解析します。標識にはラジオアイソトープを用いる手法が一般的でしたが、ケミルミネッセンス(化学発光)・ケミフローレッセンス(化学蛍光)法や検出機器の改良がすすみ、酵素やハプテンを標識したプローブによる非ラジオアイソトープ(non-RF)法も用いられるようになってきました(図1)。メンブレンへのプロットティング方法は毛細管現象を利用したキャピラリープロットティング(図2A)、ポンプにより吸引するパキューム式プロットティング(図2B)が主に用いられます。RNAは二次構造を取りやすいので、ホルムアルデヒドやグリオキサールなどを含む変性アガロースゲル電気泳動法で分離します。プローブとしては、PCR増幅やクローニングで得られる二本鎖DNAフラグメントのほか、RNAポリメラーゼを用いて合成した一本鎖RNAも用いることができます。ハイブリダイゼーションの条件を緩和するこ

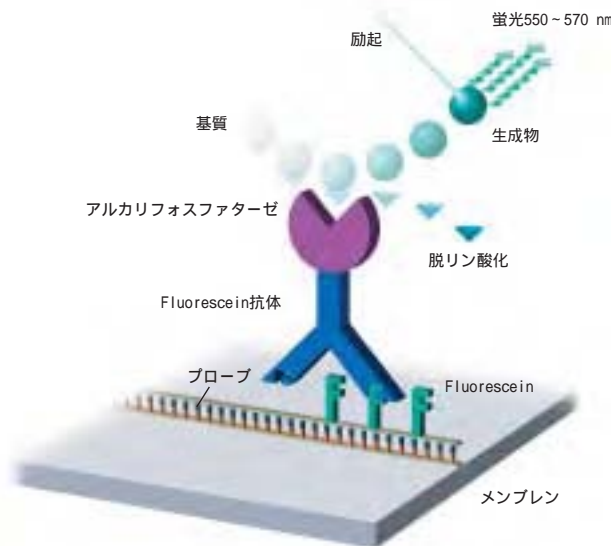


図1. 化学蛍光検出: Fluoresceinをハプテン標識として使用しサザンプロット検出した場合の一連の酵素反応模式図

ECF Signal Amplification ModuleではハプテンにFluoresceinを用い、アルカリフォスファターゼを結合させた抗Fluorescein抗体とECFを反応させ蛍光物質を生成します。この蛍光生成物は不溶性でメンブレン上に固定されます。この蛍光物質を蛍光検出器により励起検出します。

とにより、配列が一致していなくても相同性を持つフラグメントの検出を行うこともできます。

良好な結果を得るためのキーポイント

プロットティングメンブレンの選択

核酸のプロットティングでは、主にニトロセルロースとポジティブチャージナイロンメンブレンが用いられます。ニトロセルロースはナイロンメンブレンに比べて結合容量が低いので高感度検出には向きませんが、非特異的結合によるバックグラウンドを低く抑えることができます。一方、ナイロンメンブレンは高い結合容量に加えて物理・化学的強度が高いため、ハイブリダイゼーションを繰り返し行うリプロービング実験や化学発光・蛍光検出など、あらゆる目的に使用することができます。また、UVやアルカリ処理で核酸をメンブレン上に簡単に固定化できるので、操作が簡便です。特に、サイズが小さい場合は、結合量を高め

度を得ることができます。この場合、ハプテン標識抗体の反応ステップがなくなるため検出までの時間を短縮することが可能です。

蛍光検出の注意点

APを用いる蛍光基質(attophos)は酵素反応で蛍光物質を増やすだけでなく、ストークシフト(2004年4月配信分 milestone 「蛍光検出用語集(1)」参照)幅が広くメンブレンのバックグラウンドノイズの出る波長域からずらした波長域に最大蛍光波長があるという利点があります。解析装置ではメンブレンのバックグラウンドノイズを採らない特性を持つ光学フィルターを選択すれば高い感度での検出が可能になります。しかし、メンブレン自体の持つ蛍光シグナルは高く、2003年12月配信分 milestone 「蛍光検出基礎知識」でも記載しましたが、サザンブロットティング、ノーザンブロットティングの検出でもやはりメンブレンのバックグラウンドを抑えることが重要です。また、メンブレンが乾くとバックグラウンド上昇の原因となりますので、操作上注意が必要です。

さいごに

現在のところ、メンブレン上での核酸の蛍光検出は、さまざまな問題点をクリアして行うため操作が比較的煩雑になります。よりよい結果を得るためにはこういった蛍光検出の特性を理解したうえで実験目的にあわせた標識方法を選択することが重要です。

参考文献

1. Ausubel, F. M. et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York (1998).
2. 蛍光画像解析のすべて(コード番号 72-HB03-01)

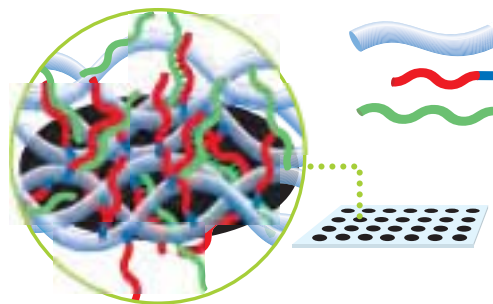
進化するブロットティング：マイクロアレイ法

核酸のブロットティング方法の発展型としてマイクロアレイ法があります。マイクロアレイ法はバックグラウンドがほとんどないガラスを支持体にする事で、蛍光バックグラウンドを大幅に削減し、微量な核酸でも検出できる手法です。最近では、スライド上で核酸を立体的に固定することで、より自然な形に近い状態でのハイブリダイゼーションを行うことができるアレイも出てきており、これらにより核酸のプロット法は新しい技術として広く使用されるようになりました。今後はこういった新しい技術と従来の技術の使い分けが重要になってきます。



CodeLink Expression Bioarray の表面構造

スライドガラス表面に三次元構造(3D)のポリアクリルアミド層を形成することにより、ポリアクリルアミドと強固に共有結合した5'末端修飾オリゴプローブが、水溶液中のターゲットと同様の高い自由度をもってハイブリダイゼーションできる環境が実現しました。このため、従来のガラス固相表面にプローブを結合した立体的自由度が低い平面スライドガラスよりも高いハイブリダイゼーション効率を得ることができ、高い再現性と高感度が特徴となっています。



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。