

蛍光検出基礎知識 検出の達人への道

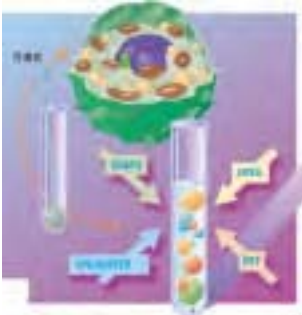
二次元電気泳動

Key Word : 二次元電気泳動、等電点電気泳動、両性担体、固定化pH勾配ゲル、SDS-PAGE

一般にタンパク質の二次元電気泳動とは、一次元目に等電点電気泳動、二次元目にSDS-PAGEを行って、タンパク質を等電点と分子量によって分離する手法を言います(図1)。二次元電気泳動はタンパク質の分離法としては最も高分離能で、プロテオミクス解析では中心的な技術と位置づけられています。二次元電気泳動のアプリケーションはさまざまですが、主としてサンプル間のタンパク質発現量の差の検出を目的として行われ、発生過程におけるタンパク質発現の変化や、新規薬剤の作製・効果の評価、毒性予測などさまざまな分野に応用されています。二次


元電気泳動によりサンプル間に発現量の変動が見られたタンパク質はゲルから切り出され、質量分析によって同定します。質量分析では、インターネット上などにあるデータベースに登録された情報を参照してタンパク質を同定します。このように、二次元電気泳動は時間・組織・生物種などのさまざまな要因によるタンパク質の発現変化を検出し、そのタンパク質の機能を予測することができます。また、タンパク質の発現量だけではなく、ゲノム情報からは推定が困難な翻訳後修飾の検出が可能なことも大きなメリットです。

1. サンプル調製



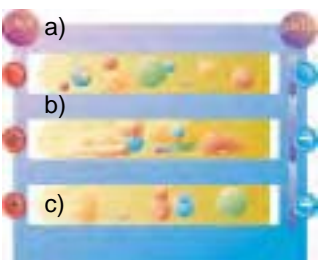
細胞抽出液などのサンプルを尿素や非イオン性界面活性剤、還元剤およびIPG Buffer (キャリアアンフォライト)存在下で可溶化させます。

3. 二次元目の泳動 : SDS-PAGE

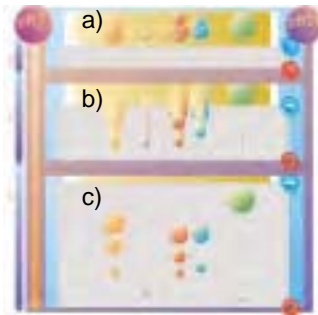


SDSとDTTを用いてImmobiline DryStripゲルのSDS平衡化を行います。

2. 一次元目の泳動 : 等電点電気泳動




- Immobiline DryStripゲルにはサンプルカップで泳動時にサンプルを添加するか、膨潤時にサンプルをゲル全体に含ませることによってサンプルを添加します。
- 電場をかけます。電荷をもつタンパク質は固定化pH勾配中を移動します。
- タンパク質はpH勾配中でタンパク質自身もつ等電点と等しいpHに到達すると電荷は0となり、その場にとどまりバンドを形成します。また、ゲルのpH勾配は固定化されているため、高電圧下でも勾配が崩れることはありません。



- 陰極側にSDS平衡化済みImmobiline DryStripゲルを置きます。
- 電場をかけます。負に荷電したタンパク質は陽極側へ移動します。
- タンパク質は、分子量に依存して移動します。最も小さいタンパク質は、最も速く陽極側へ移動し、最も大きいタンパク質は最も遅く移動します。

4. 泳動結果の検出と解析



CBB染色や銀染色、蛍光試薬による検出が用いられます。二次元電気泳動後にウェスタンブロットティングを行う場合もあります。これによってサンプル間の比較や特定のタンパク質の同定が可能です。結果の解析にはImageMaster 2D Platinumなどのソフトウェアが使用されます。

図1. Immobilineを使用する二次元電気泳動の流れ

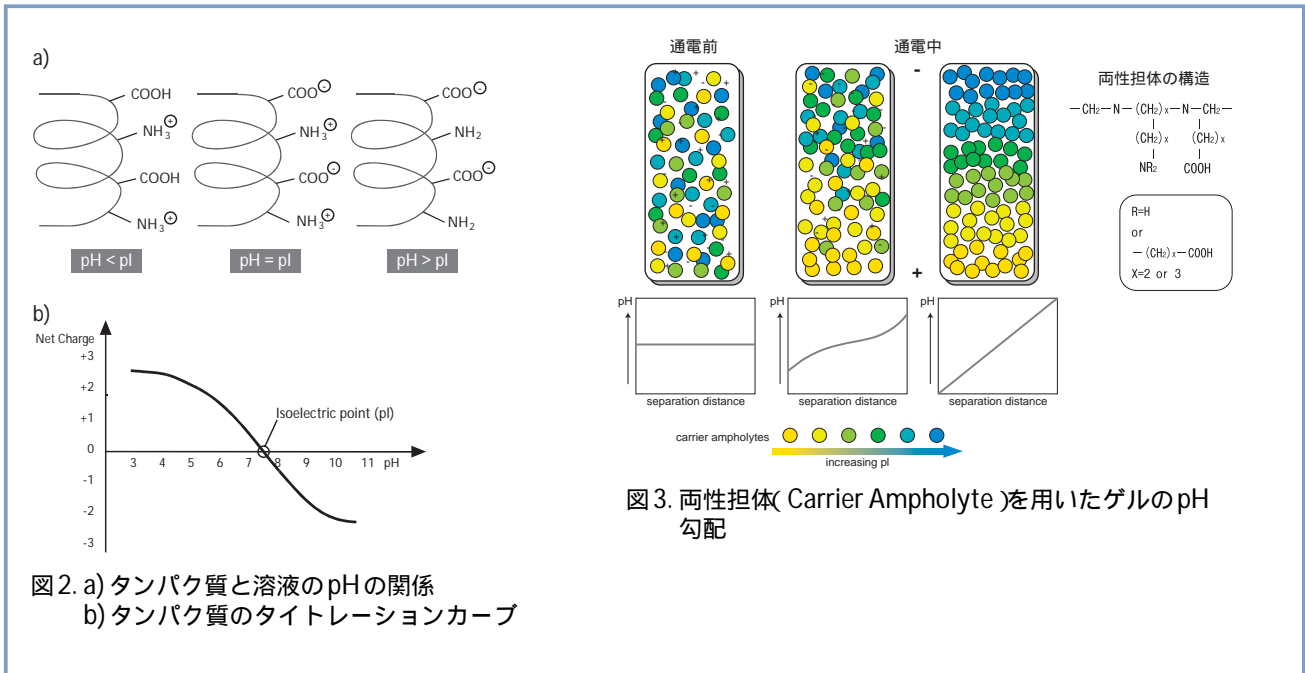


図2. a) タンパク質と溶液のpHの関係
b) タンパク質のタイトレーションカーブ

図3. 両性担体(Carrier Ampholyte)を用いたゲルのpH勾配

原理

一次元目の泳動：等電点電気泳動

二次元電気泳動の一次元目では、タンパク質を等電点の違いで分離します(等電点電気泳動)。タンパク質は両性分子で、溶媒のpHにより荷電状態が変化します(図2)。タンパク質の純荷電は、アミノ酸側鎖やアミノ末端、カルボキシル末端の負電荷と正電荷の合計であり、等電点とは、タンパク質の純電荷がゼロになるときのpHです。タンパク質は等電点以下のpHでは正に、等電点以上のpHでは負に荷電します。等電点電気泳動ではpH勾配のあるゲルを使用し、等電点の違いによってタンパク質を分離します。

技術の発達：両性担体から **Immobiline** へ

二次元電気泳動が開発された当時は、一次元目のゲルのpH勾配の作成に両性担体(Carrier Ampholyte)が使用されており、煩雑な操作と熟練を必要としました。両性担体を使用した等電点電気泳動は空気中の二酸化炭素や塩による影響を受け、pH勾配が崩れやすい(ドリフト)という技術的な問題がありました。泳動に伴うpH勾配のドリフトのため、負荷できる電圧値や泳動時間、添加できるタンパク質の量はかなり制限されていました(図4)。

その後、固定化pH勾配(Immobilized pH Gradient, IPG)ゲルの登場により、等電点電気泳動の実用性は飛躍的に向上しました(図3)。現在のスタンダードとされている二次元電気泳動法は、このIPG技術を使用しています。この方法では、アクリルアミドに弱酸あるいは弱塩基の解離基をもつアクリルアミド誘導体(Immobiline)を加えて、ゲルの重合時にpH勾配をマトリックスに固定化する技術です。そのため、高い電圧を長時間かけても両性担体を使用したときのように、pH勾配がドリフトすることがありません。IPGゲルである Immobiline DryStrip を使用する

ことによって、誰でも再現性よく結果を得ることができます(図5)。

等電点電気泳動のゲルの支持体には、一般的にアガロースとアクリルアミドが使用されますが、Immobiline DryStrip の場合はアクリルアミドのみが用いられます。Immobiline DryStrip は乾燥されたプレキャストゲルで、サンプルの性状に合わせた組成の溶液で膨潤してから使用します。膨潤溶液には urea、thiourea などの変性剤、DTT などの還元剤、CHAPS などの界面活性剤を含む溶液を使用します。

pH勾配に両性担体を用いる場合はアガロース、アクリルアミドの双方が用いられます。高分子タンパク質(分子量 100 kDa 以上)の分離には、一次元目アガロースゲルを使用することもあります。

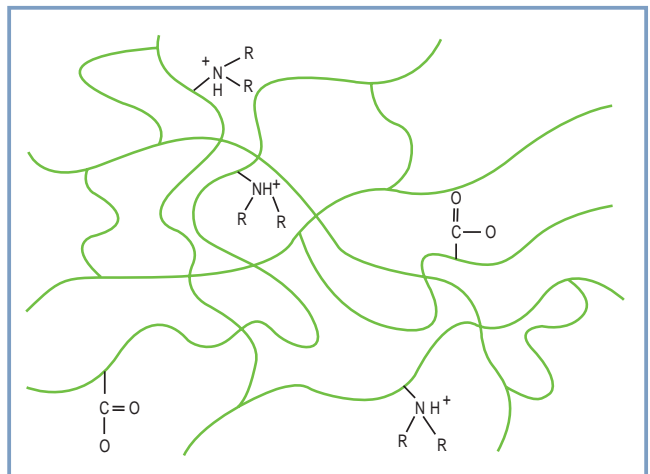


図4. Immobiline DryStrip の構造



図5. Immobiline DryStrip

二次元目の電気泳動：SDS-PAGE

二次元目の電気泳動にはSDS-PAGEを行い、分子量の違いによってタンパク質を分離します。一次元目の電気泳動が終了したImmobiline DryStripは、SDS平衡化処理を行った後に二次元目の泳動を行います。このSDS平衡化処理によってIPGゲル中のタンパク質は、還元・アルキル化され、シャープなスポットとして分離されます。二次元電気泳動では複数枚のゲルを同時に泳動し、サンプル間の比較を行うため、実験間の高い再現性が要求されます。したがって二次元目の電気泳動には、一度に多数枚のゲルの泳動が可能な泳動装置が使用されます。

良好な結果を得るためのキーポイント

詳細は弊社発行「二次元電気泳動テクニカルハンドブック」(コード番号：72-HB11-01)参照

1) サンプルに適した調製法の選択

二次元電気泳動において最良の結果を得るためには、サンプル調製のステップが最も重要です。調製法はサンプルの種類によって異なります。サンプル調製法を検討する場合、

タンパク質をいかに効率的に溶解するかということだけではなく、解析目的を明確にすることも重要です。従来、二次元電気泳動法の主目的は、組織や細胞中に含まれるタンパク質の網羅的な解析(プロファイリング)でした。近年では、より低発現のタンパク質を解析するという方向にその目的がシフトしつつあります。このように網羅的な解析が目的なのか、サンプル中の一群のタンパク質を解析したいのかでサンプル調製法は大きく異なります。一部のタンパク質のみにフォーカスする方法としては、免疫沈降、クロマトグラフィー法による精製、サンプルのプレフラクテーション(前分画)法(例：遠心条件の違いによるオルガネラ単位の分画)などが用いられます。一般的にはサンプル調製法はできる限り最少のステップでシンプルに行うことをおすすめします。ただし、サンプルには一次元目の等電点泳動を阻害する夾雑物(塩、核酸、脂質など)が含まれる場合があります。高濃度の場合結果の解析が困難になります。したがって、調製の段階でこれらの成分はできるだけ除去する必要がありますが、サンプル調製のステップが複雑になるほどタンパク質のロスや実験誤差が起こる点も考慮しなくてはなりません。

2) 目的に合った Immobiline DryStrip の選択

Immobiline DryStripには、実験を効率的に行えるよう、さまざまな種類のものがあります(図6)。Wideレンジ(7~8 pH幅)のストリップは一度に多種類のタンパク質を解析でき、スクリーニングや総タンパク質の概観を把握するのに適しています。これに対してMediumレンジ(2.6~5pH幅)、Narrowレンジ(1~1.3pH幅)ではより詳細な分離が可能です。従って、実験の流れとしては、まずはじめにWideレンジで全体のプロファイルを把握し、その後Mediumレンジ、Narrowレンジを使用して、詳細な解析を行います。Narrowレンジのストリップはスポット間の距離を広げることができるため、より高解像度の解析が可

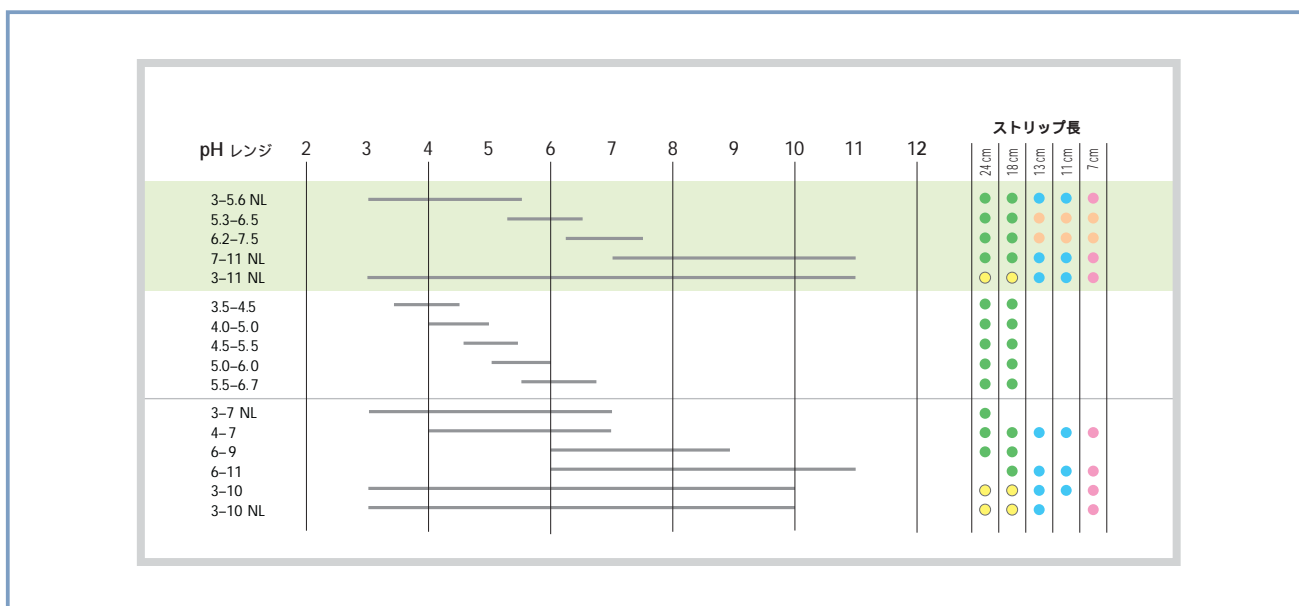


図6. Immobiline DryStripの種類

ストリップ長を示す各色は、図7の色分けに対応しています。

能で、サンプルも多くアプライすることができます。

3) 適したゲルサイズを選択

Immobiline DryStripのpHレンジとともに、ゲルサイズを使い分けることも重要です。ゲルのサイズが大きいほどスポット間の距離が広がるために、分解能が向上します。24 cmのImmobiline DryStripを使用した場合、ゲル1枚あたり3,000 ~ 3,500個のスポットが検出されますが、7 cmのImmobiline DryStripを使用する場合は数百個しか検出されません。したがってスクリーニングや、サンプル調製の条件の至適化には7 cmのImmobiline DryStripを使用し、サンプル間のより詳細な比較や質量分析には24 cmのImmobiline DryStripを使用する、という使い分けが有効です(図7)。

4) 適切なサンプル添加法の選択

サンプルは膨潤液に加えるか、泳動直前にサンプルカップを使用して添加する方法があります。塩基性側のpHレンジのImmobiline DryStrip (pH6-9、6-11、7-11)を使用する場合、酸性側から局部的にサンプルを添加します。塩基性のストリップに膨潤時添加した場合、横筋の多いパターンが得られ、塩基性タンパク質が分離されません。

5) 適切なサンプル添加量

適切なタンパク質量を添加することも、良い結果を得る非常に大切な要素です。一次元目のストリップに過剰のサンプルを添加した場合、フォーカス不足となり、全体的に横に長いスポットになります。

6) 最適な泳動条件での等電点電気泳動

Immobiline DryStripの推奨泳動条件はストリップの長さ、pHレンジによって異なります。マニュアルに記載されている泳動条件は目安であり、サンプルごとに至適化する必

要があります。また、同じサンプルでもアプライするサンプル量が多いほど泳動は長時間を要します。一次元目の等電点電気泳動では、泳動はボルトアワー (Vh、電圧×時間)で制御します。塩濃度が高いなどの理由から、電圧が上がりにくいサンプルほど泳動に長時間を要します。ゲル間の再現性を向上するためには、同じボルトアワー値で泳動します。一次元目の泳動装置としては、同時に複数本のImmobiline DryStripの泳動が可能で、高電圧出力、温度コントロールが可能なシステムを使用します。

7) 再現性の高い二次元目の泳動

二次元目にはSDS-PAGEを行い、分子量の違いでタンパク質を分離します。このときに使用するシステムとしては、複数枚を同時に泳動でき、温度コントロールが可能なものが望まれます。また、ゲル作製が容易であったり、ブレキャストゲルが使用できるものも用いられます。

二次元電気泳動ゲルの検出

二次元電気泳動のマップ上に検出されるタンパク質は、24 cmのImmobiline DryStripを使用する場合、約3,000個に及びます。マップ上の各タンパク質間には濃度差があり、サンプル間(ゲル間)で発現差異を解析するには定量性の高い検出法が望まれます。このような見地から、蛍光染色が二次元電気泳動後の検出法として広く浸透しつつあります。蛍光染色試薬の中には、Deep Purpleなどのように銀染色と同等の感度をもち、しかも定量性も非常に高いものがあり、二次元電気泳動後の検出に用いられています。Deep Purpleは検出限界が0.5 ngという高感度検出が可能であるのに加えて、質量分析の結果に影響しないことも非常に大きなメリットと言えます。

また、二次元電気泳動を発展させた技術である Ettan DIGEも、非常に高精度なディファレンス解析が可能で、



図7. Immobiline DryStripの使い分け

注目を集めている技術です。Ettan DIGEではあらかじめ異なる3種の蛍光色素(CyDye)でサンプルを標識し、最大3サンプルまで一枚のゲルで泳動できます。したがって、実験間の誤差を最小限に抑えることができる優れた手法です。(詳細は2004年6月配信のmilestone「蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動の原理」参照)

結果の解析

二次元電気泳動のマップ上には、数100～数1,000個ものスポットが検出されます。したがって、これら多数のタンパク質スポット間の発現量をゲル間で比較するには、専用の解析ソフトウェアが必要です。これによって染色ムラやゲルの歪み、ゲル間の染色の誤差などを補正し、サンプル間の比較を正確に行うことができます。

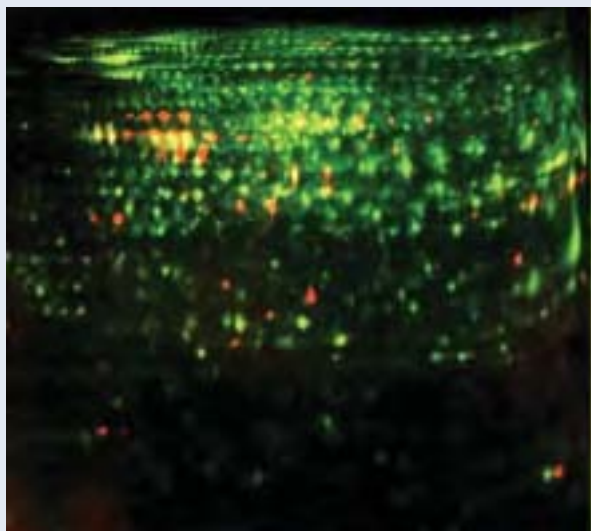
実験例

Deep Purpleの染色例



500 µgの大腸菌抽出タンパク質をImmobiline DryStrip pH3-10NL, 24 cmにアプライし、Ettan IPGphor IIを使用して泳動しました。二次元目の泳動には12.5%ゲルを使用し、EttanDALT twelveを用いて泳動しました。泳動後のゲルはDeep Purple Total Protein Stainで染色し、Typhoon 9410(励起532 nm、蛍光フィルター560LP、PMT電圧460 V)で検出しました。

ECL Plusを使用したウェスタンブロットティングのマルチカラー検出



二次元電気泳動後にタンパク質をHybond-P PVDFメンブレンにトランスファーし、NHS-ester Cy5 (PA25001)により全タンパク質染色を行いました。その後、ブロッキング、抗体との反応を行い、ECL Plusウェスタンブロットティング検出試薬で蛍光検出しました。サンプルは、*A. thaliana*の浮遊培養細胞から抽出した水溶性の全タンパク質で、一次元目にはImmobiline DryStrip pH4-7, 18 cm、Multiphor II、二次元目にはSE600を使用しました。ウェスタンブロットティングには、チロシンリン酸化を特異的に検出するモノクローナル抗体であるPY20を使用しました。イメージの検出にはTyphoon9400を使用しました(ECL Plus: 励起457 nm、520BP、Cy5: 633 nm、670BP30)。(詳細は弊社発行のアプリケーションノート: 71-2181-11参照)

赤いスポット: ECL Plus、緑色のスポット: Cy5

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。