

Improved spot resolution and detection of proteins in 2-D electrophoresis using 24 cm Immobiline DryStrip gels

24 cm Immobiline DryStripによる二次元電気泳動のタンパク質分離能の向上と検出スポット数の増加

複雑なタンパク質サンプルを二次元電気泳動により正確に比較検討する場合、微量なタンパク質の検出には分離能とサンプル添加許容量が特に重要な2つの要素となります。pHレンジが狭くかつ泳動距離の長いImmobiline DryStripを一次元目等電点電気泳動に使用することで、これらの要素は大幅に改善されます。本報では、一次元目に用いるImmobiline DryStripの長さ、pHレンジ、そしてサンプル添加許容量の違いが二次元電気泳動の分離能と検出スポット数に及ぼす影響を紹介します。

はじめに

プロテオミクス研究において、二次元電気泳動法は、生体由来の複雑なタンパク質混合物を分離・比較する上で中心的な役割を担っています。Immobiline DryStripは、一次元目等電点電気泳動用の固定化pH勾配 (Immobilized pH gradient; IPG) ゲルで、pH勾配が安定しておりサンプル添加許容量が大きいので、高い分離能と再現性を発揮します。pHレンジが広い (3.0-10.0、4.0-12.0) IPGストリップは、総タンパク質の分離パターンを概観するのに適しています (1)。pHレンジが中程度 (4.0-7.0、6.0-9.0) および狭い (1.0 pHユニット) ストリップになるにしたがって、分離能とサンプル添加許容量が向上します (2)。また、泳動距離を長くすることで、より多数のスポット検出が可能となります。Immobiline DryStripのpHレンジと長さには多彩なバリエーションがあり、目的に応じたストリップを選択することで、サンプル中の微量タンパク質をより確実に検出・分析できるようになります (図1)。

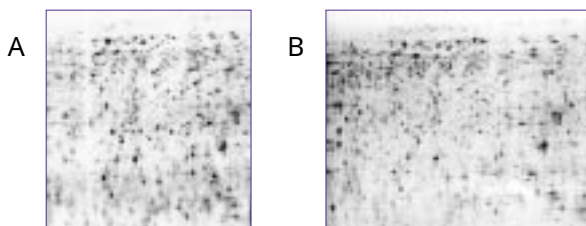


図1. 長さの異なるImmobiline DryStrip pH 5.0-6.0を用い、マウス肝臓タンパク質をEttan DALT II Gel 12.5 (26 × 20 cm)にて二次元電気泳動した結果 (A) 18 cm、サンプル添加量100 µg、(B) 24 cm、サンプル添加量200 µg 24 cmのストリップを用いた場合、18 cmの場合よりも検出スポット数が約83%増加しました。(この結果はミュンヘン工科大学Angelika Görg教授よりご提供いただきました。)

スポット分離能に対するImmobiline DryStripの長さ・pH勾配・サンプル添加量の影響

Bovine β -lactoglobulin (Sigma) を、3種類の長さ (13、18、24 cm) および2種類のpHレンジ (4.0-7.0、4.5-5.5) のImmobiline DryStripを用い、Multiphor II Electrophoresis Unitにて泳動しました。サンプルと試薬類の調製は文献3の手順に従いました。ストリップの長さやpHレンジにあわせてサンプル添加量を12.5 ~ 800 µgの範囲で調節し、

80 µg未満の場合はカップを用いて泳動時に、80 µg以上の場合にはストリップの膨潤時にサンプルの添加を行いました。二次元目の電気泳動は、SE 600 Ruby Vertical Unitを用いて14 × 14 cmのSDSゲルで行いました。室温で泳動することで、低温での二次元目泳動時に生じやすい縦の筋を軽減しました。最初の30分はゲルあたり25 mA、続いて50 mAで、プロモフェノールブルー色素がゲルの下端に達するまで泳動し、銀染色またはCBB染色によりスポット検出を行いました。

検出パターンの解析にはImageMaster TotalLabを用いました。このソフトウェアは1個のスポットに対して1個のピークを作製し対応させます。ピークの形状と高さはスポットの大きさと濃さにより決まり、ゲル上にある2個のスポットの分離能 (R値) は、次のように定義されます。

$$R=L \times [2/(A+B)]$$

L: 2個のピークの距離

A: タンパク質スポットAのピーク幅

B: タンパク質スポットBのピーク幅

2個のスポットが分離されていると判断できる場合、R値は1.0以上となります。

13 cmのImmobiline DryStrip pH 4.0-7.0を使用した場合、サンプル添加量100 µgまでは2つのスポットが良好に分離しました (図2 A、B)。サンプル添加量を200 µgまで増やすとスポットがオーバーラップし、分離能は低下しました。同じpHレンジの場合、18 cmのストリップでは添加量200 µgまで分離が可能で (図2 C、D) 24 cmでは、200 µgでも十分な分離能が得られました (図2 E)。pHレンジをより狭い4.5-5.5に変更すると、18 cmのストリップではサンプル添加量600 µgまで (図2 F、G) 24 cmでは800 µgまで高い解像度で分離しました (図2 H、I)。

以上から、図3、図4に示すように、pHレンジが狭い (pH 4.5-5.5) ストリップの方が、中程度 (pH 4.0-7.0) のストリップと比べて、サンプル添加量が多い場合でも高い分離能が得られることがわかります。また、サンプル添加量の増加にしたがって、いずれのストリップでもスポットの分離能は低下しますが、長いストリップほど分離能が改善されます。

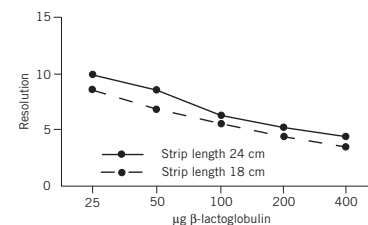


図3. Immobiline DryStrip pH 4.5-5.5の長さやサンプル添加量がSDSゲル上での β -lactoglobulinのスポット分離能に与える影響

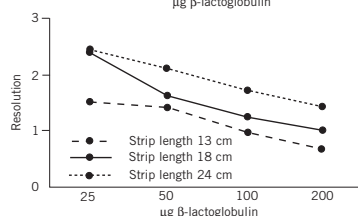


図4. Immobiline DryStrip pH 4.0-7.0の長さやサンプル添加量がSDSゲル上での β -lactoglobulinのスポット分離能に与える影響

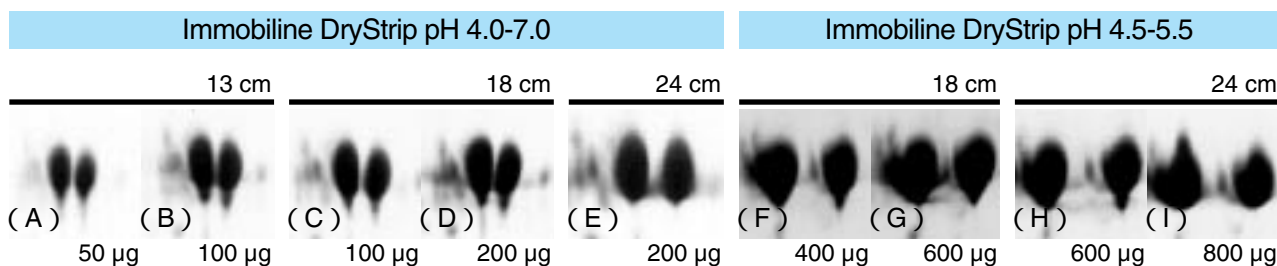


図2. Immobiline DryStripの長さやpHレンジの違いによるサンプル添加量と分離能の変化
一次元目Immobiline DryStrip pH 4.0-7.0 (A~E) およびpH 4.5-5.5 (F~I) を、サンプルとしてβ-lactoglobulinを用い、二次元電気泳動をおこないました。pHレンジとストリップ長を図の上部に、サンプル添加量を下部に示しています。

Immobiline DryStripの長さ・pH勾配・サンプル添加量が検出スポット数に与える影響

凍結乾燥 *E. coli* B株 (Sigma) を細胞溶解バッファーに懸濁後、超音波処理でタンパク質を抽出してサンプルとしました。一次元目の泳動にはImmobiline DryStrip pH 4.0-7.0 (7, 13, 18, 24 cm) pH 4.5-5.5 (18, 24 cm) およびpH 3-10 (24 cm) を用い、サンプル添加と泳動条件は前項と同様としました。二次元目用に改変Laemmli bufferで12.5%ポリアクリルアミドゲルを作製し、7 cmおよび13 cmのストリップは14×14 cmのゲルで、18 cmおよび24 cmのストリップはラージフォーマットSDSゲルにて泳動しました。泳動後、銀染色またはCBB染色によりスポットの検出を行いました。検出パターンの解析にはImageMaster 2D Eliteソフトウェアを用いました。

pHレンジが同一(4.0-7.0)の場合は、銀染色、CBB染色のいずれにおいても、サンプル添加量とストリップの長さの増加とともに検出スポット数は増加しました(図5、銀染色の場合)。24 cmのストリップでは18 cmのストリップと比べて、銀染色では22%、CBB染色では18%スポット数が増加することが確認されました。また、より狭いpHレンジのストリップを用い、かつサンプル添加量を増やすことで、銀染色、CBB染色のいずれの場合でも検出スポット数を増加させることができました。24 cmのストリップを用い、銀染色で検出した場合、pHレンジを3.0-10.0から4.0-7.0に変えることで検出スポット数が38%増加し(図6)、pH 4.0-7.0からpH 4.5-5.5に変えることで検出スポット数はさらに51%増加しました。同じくCBB染色の場合には、pHレンジを4.0-7.0から4.5-5.5に変えることで、検出スポット数が30%増加しました(データ未掲載)。

まとめ

二次元電気泳動の一次元目pHレンジが狭いImmobiline DryStripを使用することで、サンプル添加容

量を増大できるのみならず、分離能を向上し、検出スポット数を増加させることが可能になります。特に、24 cmのImmobiline DryStripは、通常では検出困難なレベルの微量タンパク質を検出して解析するのに適しており、プロテオミクス研究で欠くことのできない精密な分離結果を提供します。

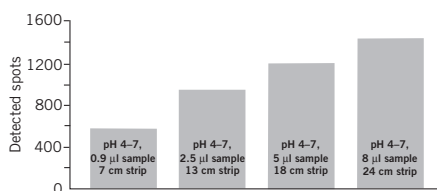


図5. 一次元目Immobiline DryStrip pH 4.0-7.0を用い、*E. coli* B株抽出サンプルを二次元電気泳動して銀染色で検出されたスポット数

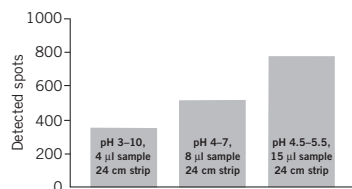


図6. pHレンジの幅が異なる(3.0-10.0, 4.0-7.0, 4.5-5.5) 24 cmのImmobiline DryStripを用いて二次元電気泳動を行い、銀染色で検出されたスポット数

参考文献

- Görg, A. *et al.*, *Electrophoresis* 20, 712-717 (1999)
- Langen, H. and Roder, D., *Life Science News* 4, 317-339 (2000)
- 2-D Electrophoresis using Immobilized pH Gradients*, Amersham Pharmacia Biotech, code number 17-1731-31 (2000)



IPGphor Isoelectric Focusing Unit



Ettan DALT II

ORDERING INFORMATION

製品名	包装	コード番号	価格
Immobiline DryStrip pH 3.0-10.0, 24 cm	12	17-6002-44	¥ 18,000
Immobiline DryStrip pH 4.0-7.0, 24 cm	12	17-6002-46	¥ 18,000
Immobiline DryStrip pH 5.0-6.0, 24 cm	12	17-6002-41	¥ 18,000
Immobiline DryStrip pH 4.5-5.5, 24 cm	12	17-6002-40	¥ 18,000
IPGphor Isoelectric Focusing Unit*	1	80-6414-02	¥ 1,350,000
Ettan DALT IIシステム	1式	問合せ	¥ 2,500,000
SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit, Basic	1	80-6479-38	¥ 185,000
ImageMaster 2D Elite Software	1	80-6350-56	¥ 1,500,000

*ストリップホルダーは含まれておりません。

Immobiline DryStripにつきましては、上記以外にも多彩なサイズ・pHレンジを取りそろえております。詳細はバイオダイレクトラインまでお問い合わせください。