

Optimizing sample preparation for 2-D electrophoresis

二次元電気泳動に最適なサンプル調製法の検討

T. Stasyk^{1,2}, U. Hellman¹, S. Souchelnytskyi¹

¹Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden, ²Institute of Cell Biology, Lviv, Ukraine

タンパク質サンプルをさまざまな手法で調製し、二次元電気泳動を行って、プロテオームマップの比較解析により調製法の良否を検討しました。サンプル調製には、等電点電気泳動用バッファーで細胞を直接溶解する手法やアセトン沈殿法などに加え、新規なサンプル調製キット PlusOne 2-D Clean-Up KitおよびMini Dialysis Kitを用いました。

2-D Clean-Up Kitで処理したサンプルでは、スポット数・解像度ともに常に良い結果が得られました。また、Mini Dialysis Kitで微量サンプル透析を行うと、解析上問題となるゲル上のすじ (streaking) や泳動パターンの歪みが軽減されることがわかりました。

はじめに

二次元電気泳動において高解像度で鮮明な泳動パターンを得るうえで、サンプル調製は非常に重要なステップです。タンパク質の泳動パターンに悪影響を与える問題は、多くの場合、細胞からの抽出時に混入するタンパク質以外の夾雑物に起因すると考えられています (1)。これらの問題を解決するために、さまざまな手法が開発されてきましたが、サンプルごとに新たに条件検討を行う必要があり、ある程度の熟練を要します。

現在は、細胞抽出物を何らかの方法で分画して解析に用いるのが一般的なサンプル調製法となっています。タンパク質を精製するには沈殿法のほか、特定のタンパク質の特性を利用して分離する方法などが用いられます (2)。これらの方法の多くはタンパク質や夾雑物の特性に依存しており、サンプルごとに条件検討が必要です。そのため、手間のかかる煩雑な条件検討が不要で、夾雑物の影響を受けにくく、そして汎用性の高い方法が求められています。本報では、以下の1.~4.の方法で調製したサンプルを二次元電気泳動して、調製法の良否を検討しました。

1. ureaを含むサンプルバッファーで細胞から直接抽出
2. 界面活性剤を含むバッファー中で抽出後、アセトン沈殿
3. 界面活性剤を含むバッファー中で抽出後、2-D Clean-Up Kitで処理
4. ureaを含むサンプルバッファーで細胞から直接抽出後、Mini Dialysis Kitで透析

細胞抽出液の調製

増殖型ヒト乳ガン細胞MCF7を材料として、さまざまなサンプル調製法を比較検討しました。細胞抽出液は以下の方法で調製しました。

1. 細胞に2-Dサンプルバッファー (SB02 ; 9.8 M urea, 2 % CHAPS, 0.5 % IPG Buffer pH 3.0-10.0, 65 mM DTT) を直接添加して、室温で30分間静置しました。続いて13,000 rpmで15分間遠心し、上清を一次元目の等電点電気泳動に用いました (すぐに使用しない分は、小分けにして-70 °Cにて保存)。
2. 細胞に溶解バッファー (40 mM Tris-HCl pH 8.0,

65 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 % Triton X-100または2 % SDS) を添加して抽出しました。続いて、13,000 rpmで15分間遠心し、上清に1~3倍量のアセトンを加えて-20 °Cで60分間静置しました。遠心にて沈殿物を回収後、SB02に溶解してサンプルとしました。

3. 2.と同様の方法で抽出した細胞抽出液を2-D Clean-Up Kitで処理し、サンプルとしました。
4. 1.で調製した細胞抽出液200 µlを、Mini Dialysis Kit (8 kDa / 250 µl) を用いて、IPG Bufferを除いたSB02バッファー15 mlに対して室温で2時間透析し、サンプルとしました。

タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度は2-D Quant KitおよびBradfordアッセイ法を用いて測定しました。Bradford法で定量する場合には、サンプル調製に用いるバッファーの種類ごとに異なるスタンダードカーブを作成する必要があります (図1A)。2-D Quant Kitの場合は、バッファーの種類によらず、1つのスタンダードカーブで定量することができます (図1B)。おのおのの定量法で前項1.~4.のサンプルについて精製前後に測定を行い、値を比較しました (データ未掲載)。この結果、溶解バッファーにSDSが含まれる場合は、Bradford法による定量値にばらつきがみられ再現性が低いことがわかりました。ただし、同じサンプルをアセトン沈殿または2-D Clean-Up Kit処理してSDSを除去した後SB02に溶解した場合は、再現性のある測定値が得られました。このことから、溶解バッファー中のSDSがBradford法によるタンパク質の定量性に影響し、サンプル間の測定値の再現性を低下させていると考えられます。2-D Quant Kitを使用することで、バッファー成分が異なる条件下でも一定して信頼性の高い結果を得られることがわかりました。

二次元電気泳動

Immobiline DryStrip pH3-10, 18cmの膨潤時にタンパク質サンプルを添加し、IPGphor IEF Systemで一次元目の等電点電気泳動を行いました。装置の設定は次の通りです: 膨潤12時間 (後半の4時間はサンプル浸透効率を上げるために30 V通電)、300 Vで1時間、8,000 Vで1時間 (gradient)、8,000 Vで10時間 (step)。実際には4~5時間で40,000 Vhに達したところで泳動を終了しました。

一次元目の泳動が終了したゲルを、1 % DTTを含む平衡化バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30 %グリセロール、2 % SDS、微量のプロモフェノールブルー) 中で15分、その後、2.5 %ヨードアセトアミドを含む同バッファー中で15分、穏やかに振盪しました。

平衡化した一次元目ゲルを10 %SDS-ポリアクリルアミドゲルの上部にセットして、二次元目の泳動を12~16時間行いました (3)。泳動後、ゲルを銀染色し、ImageScannerでスキャンした泳動パターンをImageMaster 2D Elite Softwareで解析しました。

サンプルとして細胞抽出液をそのまま使用した場合や、アセトン沈殿を行った場合と比較すると、2-D Clean-Up

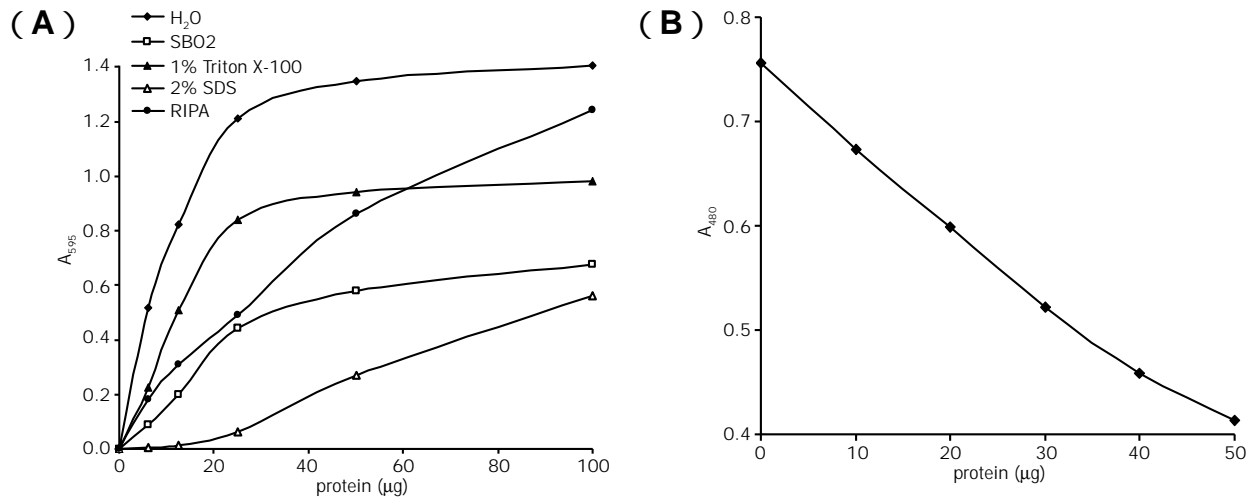


図1. タンパク質濃度測定のための標準カーブ

(A) Bradford法で作成した標準カーブ (原点はノーマライズしていません)。バッファーごとに標準カーブは異なっています。

(B) 2-D Quant Kitで作成した標準カーブ。

RIPA : 1% [w/w] Nonidet P-40, 0.5% [w/v] sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg / ml aprotinin, 50 mg / ml leupeptin, 1 mg / ml pepstatin

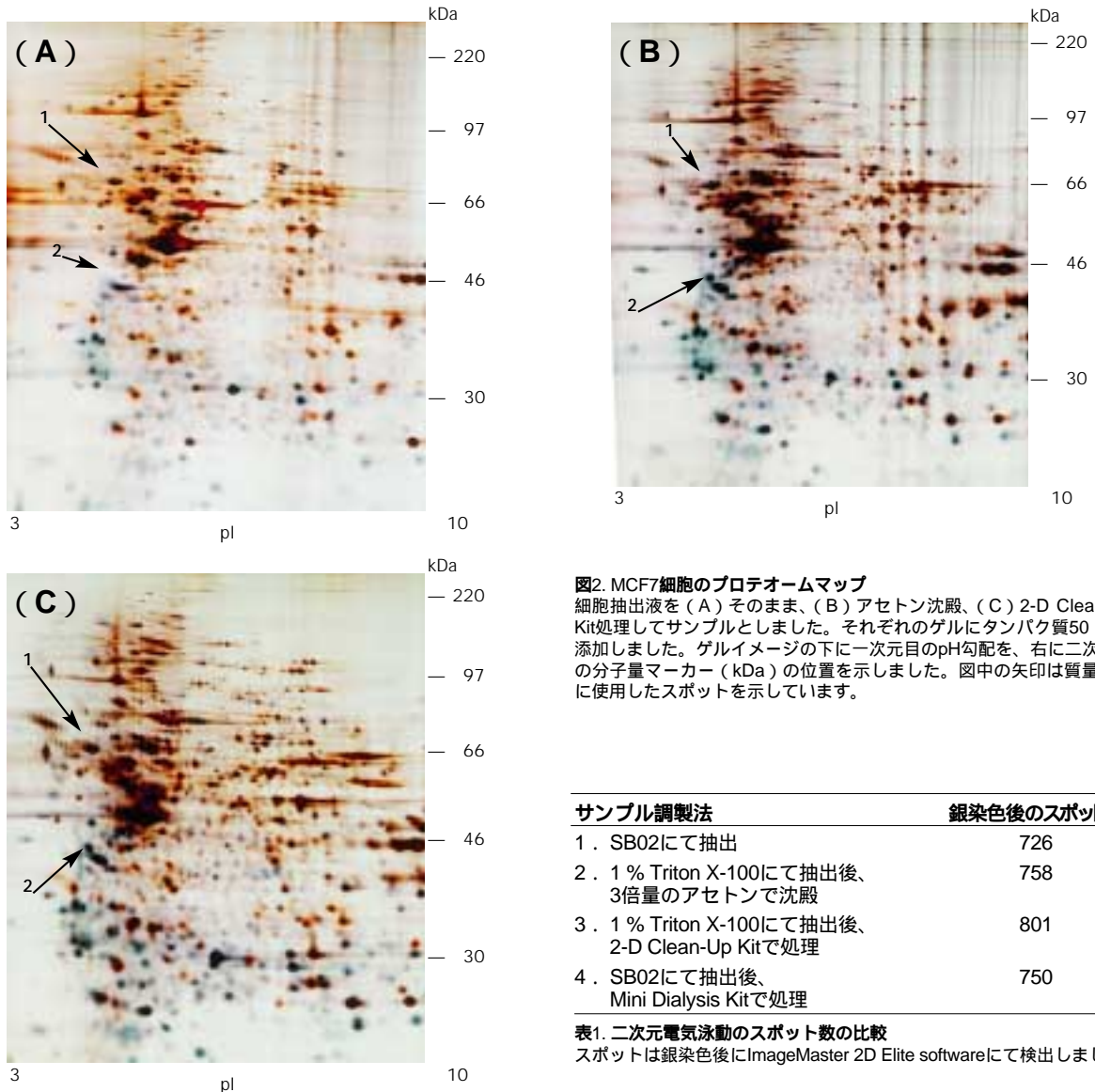


図2. MCF7細胞のプロテオームマップ

細胞抽出液を (A) そのまま、(B) アセトン沈殿、(C) 2-D Clean-Up Kit処理してサンプルとしました。それぞれのゲルにタンパク質50 μgを添加しました。ゲルイメージの下に一次元目のpH勾配を、右に二次元目の分子量マーカー (kDa) の位置を示しました。図中の矢印は質量分析に使用したスポットを示しています。

サンプル調製法	銀染色後のスポット数
1. SB02にて抽出	726
2. 1% Triton X-100にて抽出後、3倍量のアセトンで沈殿	758
3. 1% Triton X-100にて抽出後、2-D Clean-Up Kitで処理	801
4. SB02にて抽出後、Mini Dialysis Kitで処理	750

表1. 二次元電気泳動のスポット数の比較

スポットは銀染色後にImageMaster 2D Elite softwareにて検出しました。

Kit処理したサンプルでは全般的に良好な分離パターンが得られ、特に二次元目展開 (縦) 方向のすじが減少しました。これは、一次元目のゲルから二次元目のゲルへ効率よくタンパク質が移行していることを示しています

(図2)。また、同サンプルではスポットがより鮮明で、検出スポット数が増加していました (図2、表1)。スポット数で比較すると、細胞抽出液が726、アセトン沈殿サンプルが758であるのに対して、2-D Clean-Up Kit処理

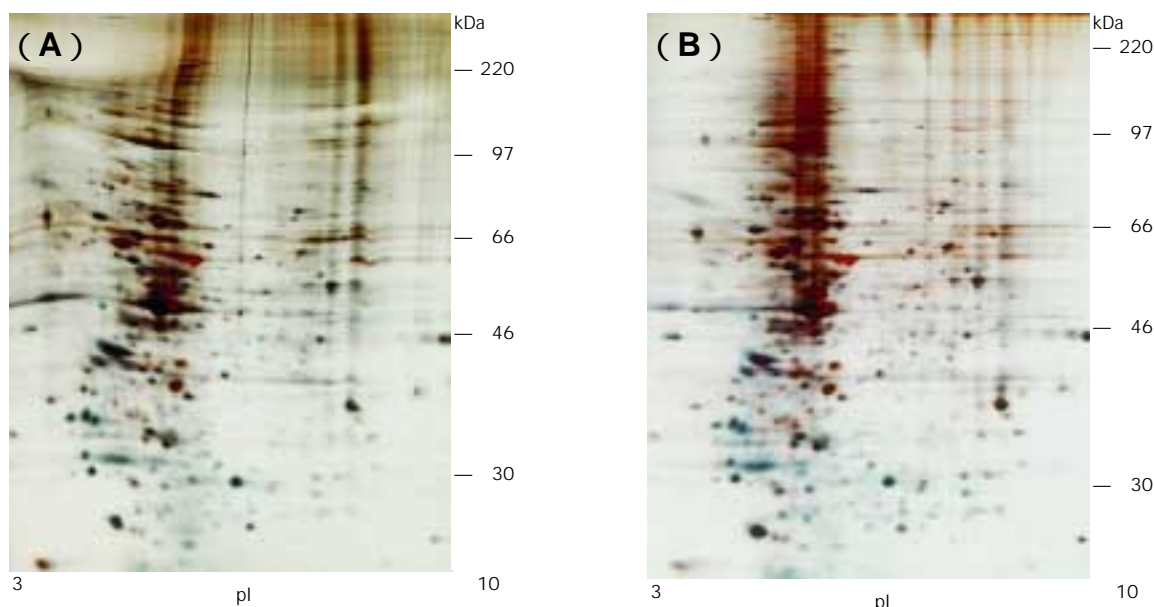


図3. 透析処理のプロテオームマップへの影響

細胞抽出液を(A)そのまま、(B)Mini Dialysis Kitにて透析してサンプルとしました。それぞれのゲルにタンパク質100 µgを添加しました。ゲルイメージの下に一次元目のpH勾配を、右に二次元目の分子量マーカー (kDa) の位置を示しました。

サンプルでは801スポットを分離することができました。したがって、二次元電気泳動のサンプル調製の際に2-D Clean-Up Kitを使用すると、高解像度で鮮明な泳動パターンが得られるといえます。

泳動パターンに影響を及ぼす低分子夾雑物は、サンプルバッファーに対して透析を行うことでも除去できます。従来、サンプルの透析には多量のサンプルが必要とされてきましたが、Mini Dialysis Kitでは最小10 µlのサンプルを透析できます。通常、100 µgものサンプルを泳動すると(図3A)、50 µgを泳動した場合(図2A)と比べ、陽極側で泳動パターンが歪み、縦方向のすじが目立つなどの影響が見られます。しかし、Mini Dialysis Kitで透析したサンプルでは、低分子量の夾雑物が効率よく除去されているため、100 µgを泳動しても歪みや縦すじはほとんど生じていません(図3B)。

質量分析法によるタンパク質同定

最後に、タンパク質サンプル調製法の違いが質量分析 (mass spectrometry) の結果におよぼす影響を調べました。細胞抽出液、アセトン沈殿サンプル、2-D Clean-Up Kit処理サンプルをそれぞれ二次元電気泳動し、おのののゲルからスポットを2個ずつ選んで切り出しました。文献4.の方法にしたがってゲル内トリプシン消化処理して得られたペプチドを、MALDI-ToF型質量分析計で解析しました。得られたスペクトルをProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>) のNCBI nr sequence databaseで検索したところ、スポットを構成するタンパク質はprotein disulfide isomerase precursor (P07237, probability 0.98) と、nucleophosmin (gi 10835063, probability 1.00) である

ことがわかりました。また、スペクトルのパターンは全てのサンプルについてほぼ同様だったため(データ未掲載)、サンプルの調製法が質量分析に与える影響は小さいと考えられます。

まとめ

異なる研究施設間で互換性のあるプロテオームデータベースを構築するには、データの標準化が不可欠です。この問題を解決するうえで、サンプル調製法の改善・標準化は重要です。2-D Clean-Up KitおよびMini Dialysis Kitは、サンプル調製ステップの標準化を実現できるだけでなく、より精密なプロテオームマップを得るため、さらには信頼性の高いデータベース構築のためにも有用なツールといえます。

参考文献

- Görg, A. *et al.*, *Electrophoresis* **21**, 1037-1053 (2000).
- Rabilloud, T. & Chevallet, M., in *Proteome Research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods* (Rabilloud, T., ed.), Springer, Heidelberg, Germany, pp. 9-31 (2000).
- Shevchenko, A. *et al.*, *Anal. Chem.* **68**, 850-858 (1996).
- Hellman, U., in *Proteomics in functional genomics: Protein structure analysis*. (Jølls, P. and Jörnvall, H., eds.), Birkhauser Verlag AG, Basel, Switzerland, pp. 43-54 (2000).

2-D Clean-Up Kit, Mini Dialysis Kitおよび2-D Quant Kitに関するお知らせは、本誌11ページにも掲載しております。あわせてご覧ください。

製品名	包装	コード番号	価格(円)
2-D Clean-Up Kit	50 回分	80-6484-51	42,000
2-D Quant Kit	500 回分	80-6483-56	40,000
Mini Dialysis Kit (1 kDa / 250 µl)	50 回分	80-6483-75	38,000
Mini Dialysis Kit (1 kDa / 2 ml)	50 回分	80-6483-94	38,000
Mini Dialysis Kit (8 kDa / 250 µl)	50 回分	80-6484-13	38,000
Mini Dialysis Kit (8 kDa / 2 ml)	50 回分	80-6484-32	38,000