

Simplified Spot Patterns and Improved Reproducibility in 2-D Electrophoresis with the Aid of DeStreak

DeStreak Reagentの使用による二次元電気泳動パターンの明瞭化と再現性の向上

Ingmar Olsson, Kjell Larsson, Jesper J Hedberg, Johan Öhman, Siham Cetinkaya & Bengt Bjellqvist

Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden

DeStreak Reagent は等電点電気泳動用の固定化pH勾配 (IPG) ゲルImmobiline DryStrip専用の膨潤用試薬で、二次元電気泳動の結果を解析するうえで問題となる横すじ (Streaking; ストリーキング) を減少させます。本報では、二次元電気泳動を行う際に最も一般的に使用されている還元剤DTTとDeStreak Reagentを Immobiline DryStrip の膨潤に用いて泳動結果の比較を行いました。DeStreak Reagentを使用した場合には、DTTを用いた場合と比較して、ストリーキングや偽スポット数が明らかに減少しており、しかも泳動時間による影響を受けない再現性のある泳動パターンが得られました。

はじめに

二次元電気泳動を行う際、タンパク質の溶解性を上げるために一次元目のゲルの膨潤時に通常DTTなどの還元剤を加えます。タンパク質は分子内でジスルフィド (S-S) 結合を形成し、固有の立体構造をとっていますが、DTTはS-S結合を切断して立体構造を壊すことで溶解性を向上させます (図2A)。ところが、pH8以上の塩基性領域においては、DTTは負に荷電しており (pKa (酸性度指数) 9.2前後)、電気泳動によってIPGストリップの塩基性側 (陰極) から酸性側領域 (陽極) へ移動してしまいます。このように塩基性領域には還元剤が存在しない状態になるために、システイン残基の非特異的な酸化が起こりタンパク質の等電点に変化して、結果的にスポットの位置をシフトさせます。これが、二次元泳動像の塩基性領域 (pI値が7を超える領域) で、ストリーキングのない、再現性のあるスポットパターンを得ることが困難とされてきた理由の一つです。タンパク質添加量が多い場合や長いストリップを用いる場合、pH勾配がなだらかな場合、一次元目の泳動時間が長い場合には、この問題が深刻化します。

この問題を解決するために、選択的なアルキル化 (iodoacetamide, acrylamideなどによる)、非荷電性の還元剤 (tributyl phosphine, trishydroxypropyl phosphineなど) の使用、陰極側からのDTT添加などいくつかの方法が試みられましたが、一般的なアプリケーションに適用可能な至適化プロトコルを確立するには至っていません。新たな解決策として弊社で開発したDeStreak Reagentは、システイン残基を特異的かつ完全に酸化することで、従来法でみられたストリーキングや目的外のスポット (偽スポット) を排除した再現性のある泳動像を実現します (図1)。

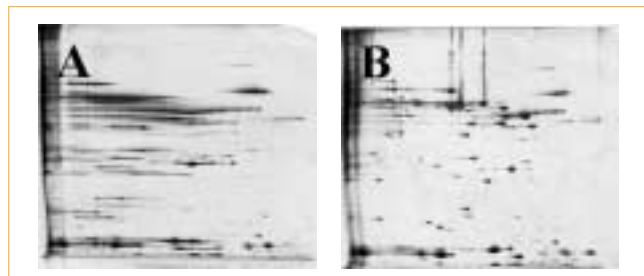


図1. DeStreak使用/従来法による二次元電気泳動パターンの比較
80 µgマウス肝臓タンパク質をImmobiline DryStrip pH 7.5-9.5, 18 cm*に添加し、等電点電気泳動 (80 kVh, 16時間) を行いました。膨潤バッファーに、それぞれDTT (A) またはDeStreak Reagent (B) を加えました。
*カスタムメイド製品です。一般販売は行っておりません。

システイン残基の酸化による混合ジスルフィドの生成

DeStreak Reagentでは、R-S-S-R (ジスルフィド結合している物質) がシステイン残基に特異的に結合し、非特異的な酸化を防ぐことで従来法で起きていた問題を解決しました。

DeStreak Reagentが誘導するシステイン残基の酸化反応により、システイン残基が混合ジスルフィドになります (図2B)。これは非常に特異性の高い平衡反応で、しかも副反応が起きにくく、pH 7以上では平衡が反応式の右側に偏るため、R-S-S-Rが反応系に高濃度存在していれば、システイン残基は完全に酸化されます。しかも、混合ジスルフィドは一次元目と二次元目の間の平衡化ステップで還元されるため、二次元目の泳動には影響を与えることはありません。したがって、切り出したスポットは従来通りタンパク質の同定を行うことができます。

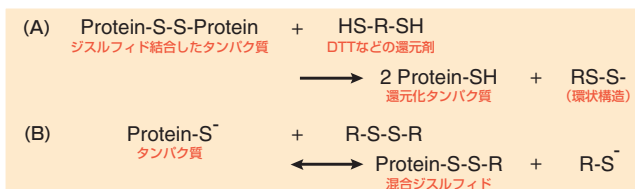


図2. DeStreak/従来法の反応原理 (A) 従来法 (B) DeStreak使用時

泳動時間や pHレンジによる影響

DTTなどの還元剤を用いた従来法では、一次元目の泳動時間によりタンパク質スポットがシフトします。図3Aと3Bは泳動時間を変えて同一サンプルを同一条件で泳動した結果です。塩基性pH領域でスポットパターンに明らかな変化がみられます。長時間泳動を行ったゲル (図3B) では、ストリーキングが目立ち、かつスポット数も増えています。これは、DTTが徐々にIPGストリップの塩基性側から酸性側へ移動してしまうためです。タンパク質はシステイン残基の酸化の度合いによりIPGストリップの異なる位置に分布するようになります。

DeStreak Reagentを使用した場合には、泳動中のタンパク質は完全な酸化型 (混合ジスルフィド) となるため、一次元目に長時間泳動した場合にも短時間で泳動を終えたときと同一の泳動結果が得られました (図3C, 3D)。

また、IPGストリップはおのこのpHレンジで最適な泳動時間が異なるため、DTTを還元剤として用いた場合には再現性のある結果を得ることが難しい場合があります。しかし、泳動時間による影響の少ない DeStreak Reagentであれば、pHレンジの異なるIPGストリップを用いた場合でも、再現性のあるスポット

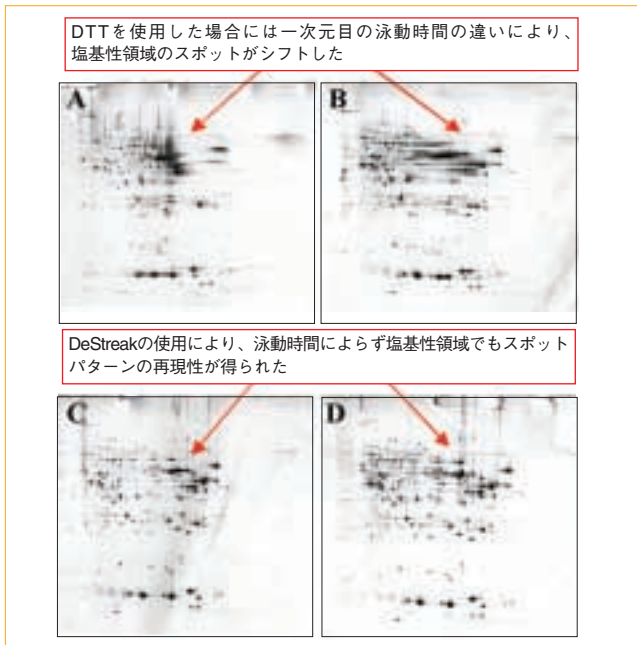


図3. DeStreak使用/従来法による一次元泳動時間の影響の比較
20 µgの還元済みマウス肝臓タンパク質を、Immobiline DryStrip pH 6-11, 11 cmに陽極側より添加しました。膨潤液にはDTT (A, B) またはDeStreak Reagent (C, D) を添加しました。泳動条件：10.6 kVh (A, C)、25.3 kVh (B, D)

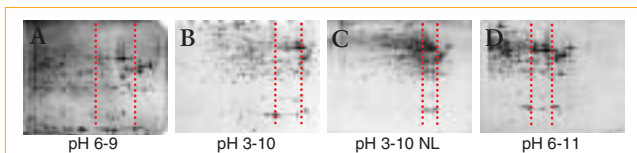


図4. DeStreakを使用しpHレンジの異なるIPGストリップを用いた場合の比較
pHレンジの異なる Immobiline DryStripについて、1% IPG Bufferを添加したDeStreak Rehydration Solutionを膨潤時に使用し、マウス肝臓タンパク質を泳動しました。泳動条件：82 kVh (A)、23 kVh (B)、42 kVh (C)、40 kVh (D)
※図4Cで使用したImmobiline DryStripは、pHレンジは図3Bと同一ですが、pH 5~7のレンジの分離能を上げるためにこの部分のみpH勾配をゆるやかにした (non-linear pH Gradient; NL) タイプのものです。

パターンを得ることができます。図4に、pHレンジの異なる4種のImmobiline DryStripを用いた場合の泳動像を示しました。図4Aと4Dでは比較的pHレンジの狭いもの、図4Bと4CではpHレンジの広いものを使用しているため、同じpH領域(塩基性領域)を図中に点線ではさんで示しました。このようにpHレンジが異なるIPGストリップを使用している場合でも、ゲル間でスポットパターンの比較を行うことが可能です。

偽スポットの減少

DeStreak Reagentを使用した場合、DTTを含む従来の組成の膨潤液を使用した場合のゲルと比較して、ストリーキングが消

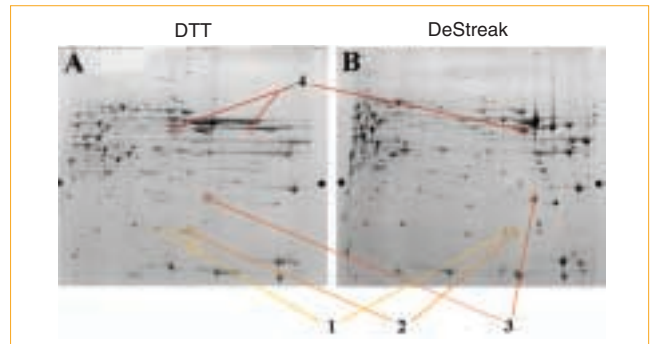


図5. DeStreak使用/従来法による二次元電気泳動像の比較と検証
マウス肝臓タンパク質1 mgをImmobiline DryStrip pH 6-9, 18 cmに陽極側より添加し、60 kVhで等電点電気泳動を行いました。膨潤液にはDTT (A) またはDeStreak Rehydration Solution (B) を添加しました。ゲルのスキャン後、画像解析を行ってスポットを選択し、Ettan MALDI-ToF Proで質量分析を行いました。ゲルA、Bからそれぞれ抽出したスポット1~4は2枚のゲル間に共通のタンパク質であることが確認されました(表1)。

スポット ID 番号	タンパク質名	MW (kDa)	pI (理論値)
1	gi 12846244 Peptidylprolyl isomerase A	18.1	8.7
2	gi 6746357 Peroxisomal membrane protein 20	17.2	7.8
3	gi 2624496 Glutathione S-transferase (π)	23.5	8.3
4	gi 6996911 Argininosuccinate synthetase 1	46.9	8.5

表1. タンパク質の同定結果

ているだけでなく、スポット数・位置ともに明らかに異なるのがわかります(図5)。多くのスポットが陰極側(塩基性側)にあるのも特徴的です。図5の2つのゲルからそれぞれ任意のスポットを選択してEttan MALDI-ToF Proで質量分析を行いました(表1)。同定結果から、スポット1や4のように、DTTを含む膨潤液を使用した場合には同一タンパク質でありながら複数個のスポットとして検出されていたタンパク質が、DeStreak Reagentを使用した場合には単一スポットとして分離されることが確認されました。

まとめ

DeStreak Reagentの使用により、DTTなどの還元剤を使用する従来法を用いた場合と比較して、非特異的な酸化による偽スポットの発生を防止し、ストリーキングのない二次元電気泳動パターンが得られます。特に、従来問題とされてきた塩基性領域での再現性が大幅に向上しました。また、pHレンジの異なるストリップを用いた場合でも再現性のあるスポットパターンが得られ、ゲル間の比較解析が容易になりました。さらに、この試薬を使用しても、質量分析結果に影響を与える危険性はありません。したがってDeStreak Reagentは、要求度のますます高まっている二次元電気泳動から構造解析に至る一連のプロトコルを最適化するうえで、非常に有効なツールであるといえます。

ご注文情報

製品名	包装	コード番号	価格(円)
DeStreak Rehydration Solution*1	5×3 ml	17-6003-19	14,000
DeStreak Reagent*2	1 ml	17-6003-18	7,000
Immobiline DryStrip pH 6-9, 18 cm	12 本	17-6001-88	16,700
Immobiline DryStrip pH 6-11, 18 cm	12 本	17-6001-97	16,700
Immobiline DryStrip pH 3-10, 18 cm	12 本	17-1234-01	13,300
Immobiline DryStrip pH 3-10 NL, 18 cm	12 本	17-1235-01	13,300
Immobiline DryStrip pH 6-11, 11 cm	12 本	17-6001-95	11,700
各種 IPG Buffer	1 ml	問合せ	4,500

*1 DeStreak Reagentを含んだプレミックスタイプのため、IPG Bufferを加えるのみで、Immobiline DryStripのスタンダードな膨潤液としてそのまま使用可能です。

*2 独自の組成の膨潤液を作製したい場合に用います。膨潤液 1 mlにつき12 µlを添加します。

各種pHレンジおよびストリップ長(7、11、13、18、24 cm)のImmobiline DryStrip、IPG Bufferを取りそろえております。詳細はお問合せください。