

Method for the specific removal of albumin and IgG from human serum samples

ヒト血清サンプルからのアルブミンおよびIgGの特異的な除去

Karen Tate and Lenore Kent
Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England

細胞や組織内のあらゆるタンパク質を網羅的に同定分類し、それぞれの相互作用などを予測・解析しようと試みるプロテオーム解析が注目されています。ヒト血清には数千種類のタンパク質が含まれていますが、大量に存在する特定のタンパク質の影響で、二次元電気泳動による低発現量のタンパク質解析が困難となっています。Albumin and IgG Removal Kitでは、ヒト血清中に含まれるタンパク質の大部分を占めるアルブミンおよびIgGを特異的に除去することができます。本キットで処理したサンプルを二次元電気泳動で解析することで、今まで困難であった低発現タンパク質の解析も可能になります。

はじめに

ヒト血清には数千種類のタンパク質が含まれており、これらのタンパク質には少なくとも10⁹以上の濃度差があります。ヒト血清の全タンパク質量の60%以上を占めているのがアルブミンとIgGです。二次元電気泳動解析においては、この2つのタンパク質が存在するため、近似した等電点または分子量を有する他の重要なタンパク質の存在を見逃してしまうことがあります。

Albumin and IgG Removal Kitはヒト血清サンプルからアルブミンとIgGを特異的に除去できるようにデザインされています。キットにはこの2つのタンパク質と特異的に結合するモノクローナル抗体を結合したレジンが含まれています。血清サンプルにこのレジンを添加し、室温で30分間振盪して、レジンにアルブミンとIgGを結合させます。その後、MicroSpinカラムでレジンに結合しないタンパク質を分離します。溶出された血清サンプルをアセトン沈殿法で精製した後、二次元電気泳動用のサンプルとして使用することができます(図1)。アルブミンとIgGのみを特異的に除去することで、困難であった低発現量のタンパク質の解析が可能になります。

再現性および除去効率

Albumin and IgG Removal Kitの再現性について検証しました。ヒト血清をキットの標準プロトコールに従って処理し、同量に希釈した血清を未処理血清サンプルとしました。精製されたアルブミンとIgGの隣に、未処理血清サンプルと処理済み血清サンプルを並べ12%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行ったところ、処理済み血清サンプルではいずれもアルブミンおよびIgGが除去されていました(データ未掲載)。

次に[¹²⁵I]標識したアルブミンまたはIgGを加えたヒト血清サンプル15 μlをAlbumin and IgG Removal Kitで処理し、2つ

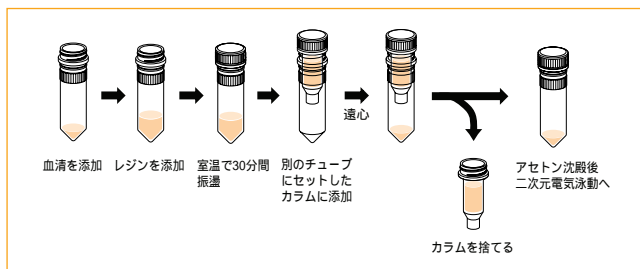


図1. Albumin and IgG Removal Kitの操作
15 μlヒト血清を添加した時、アルブミンとIgGが最も効率よくレジンに結合します。通常は低発現量のタンパク質を含む150~220 μgの血清タンパク質を回収できます。回収量は、使用した血清サンプルのタンパク質含有量に依存します。

のタンパク質の除去効率および再現性を調べました。コントロールサンプルではレジンの代わりにPBSを加え、同様の操作を行いました。各サンプルとも12%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行い、パリアプリーメーリアナライザーTyphoon 9400でスキャンしました(図2)。続いて、定量ソフトウェアImageQuantによりアルブミンとIgGの除去率を定量したところ、アルブミンは99.7%、IgGは90%以上除去されていました(データ未掲載)。

低発現タンパク質の解像度の向上

Ettan DIGE*1は二次元電気泳動を利用してタンパク質の発現差異解析を行うシステムです。比較したいサンプルを異なるCyDyeで蛍光標識し、同一ゲル上で泳動します。内部標準を使用してデータを標準化するため、ゲルの違いや実験上の誤差による問題が排除され、タンパク質発現量の差異のみが検出されます。このEttan DIGEを使用してAlbumin and IgG Removal Kitで処理したヒト血清サンプルの解析を試みました。50 μgの処理済みヒト血清サンプルと未処理ヒト血清サンプル、および内部標準をCyDyeで標識し、一次元目Immobiline DryStrip pH 3-10 NL, 24 cm、二次元目にポリアクリルアミドゲル

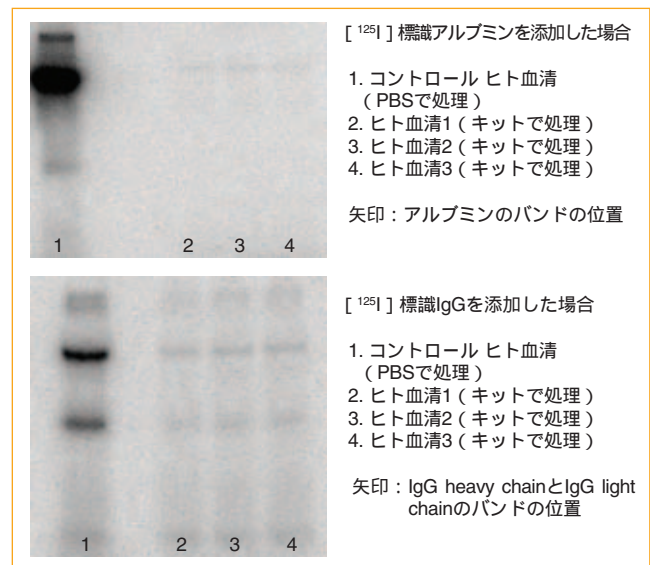


図2. [¹²⁵I]標識したアルブミンまたはIgGを含むヒト血清の解析
[¹²⁵I]標識したアルブミンまたはIgGを含むヒト血清サンプル15 μlをAlbumin and IgG Removal Kitで処理しました。コントロールにはレジンの代わりにPBSを加え同様の操作を行いました。各レーンとも等量のサンプルを添加し12%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行い、Typhoon 9400でスキャンしました。

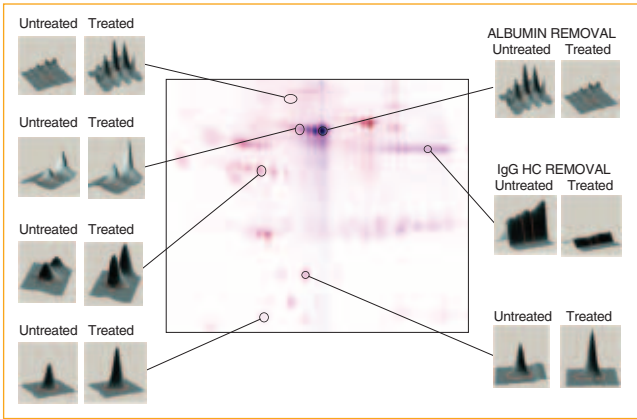


図3. ETTAN DIGEによる低発現タンパク質の解析

各50 µgの処理済みヒト血清サンプルと未処理ヒト血清サンプル、および内部標準を異なるCyDyeで標識し、Ettan DALTwelve Large Electrophoresis Systemで泳動しました。ゲルをTyphoon 9400でスキャンし、Ettan DIGE専用ソフトウェアDeCyderで解析しました。3DイメージはDeCyderによるものです。
 赤色スポット：Albumin and IgG Removal Kitを使用して処理したサンプルの方でタンパク質ボリュームの多いスポット
 青色スポット：未処理サンプルの方でタンパク質ボリュームの多いスポット

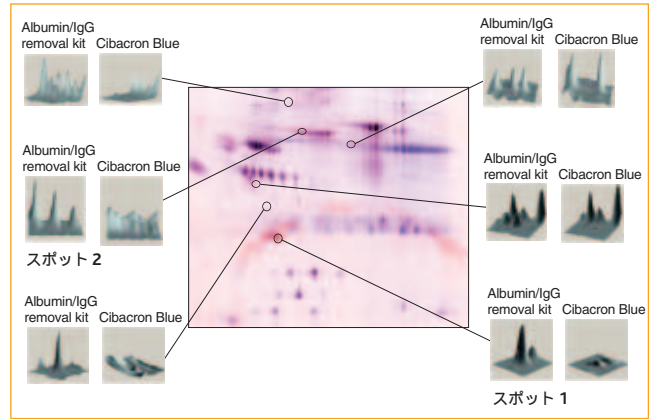


図4. Cibacron Blueと比較したアルブミンおよびIgG除去の特異性

スポット1および2についてはPMF解析を行いました。
 赤色スポット：Albumin and IgG Removal Kitを使用して処理したサンプルの方でタンパク質ボリュームの多いスポット
 青色スポット：Cibacron Blueを使用して処理したサンプルの方でタンパク質ボリュームの多いスポット（Cibacron BlueではIgGは除去されません）

(26 × 20 cm) をEttan DALTwelve Large Electrophoresis Systemで泳動しました。ゲルをTyphoon 9400でスキャンし、Ettan DIGE専用ソフトウェアDeCyderで解析しました（図3）。Albumin and IgG Removal Kit を使用してアルブミンおよびIgGを除去したサンプル（赤色スポット）で、より多くのタンパク質スポットが検出されていることが分かります。

Cibacron Blueとの特異性の比較

Albumin and IgG Removal Kitと従来からアルブミン除去目的で使用されているCibacron Blueレジンについて、特異性を比較しました。それぞれの方法で調製したサンプルを前項と同じ条件で泳動し、DeCyderでスポットの比較を行いました（図4）。同様のゲルをCoomassie Brilliant Blueで染色し、スポット1と2をマニュアルでピッキングしてトリプシン消化した後、質量分析を行いました。この2つのスポットは、Cibacron Blueを用いた場合には非特異的に除去されてしまいましたが、Albumin and IgG Removal Kit では除去されず検出されたタンパク質です。それぞれPMF解析（peptide mass fingerprinting）を行いNCBIのnon-redundantプロテインデータベースで検索したところ、スポット1および2のタンパク質はProapolipoprotein A1およびHemopexin前駆体であると判明しました。

高い種特異性

キットの種特異性を調べるため、正常ラット血清サンプルを用いて検討しました。図5は未処理ラット血清（A）と、キットで処理したラット血清（B）の二次元電気泳動パターンです。ゲルのスキャンイメージを解析したところ、処理済み血清中のアルブミンは約57%除去されていましたが、IgGはほとんど除去されませんでした。これはキットに使用されているヒト

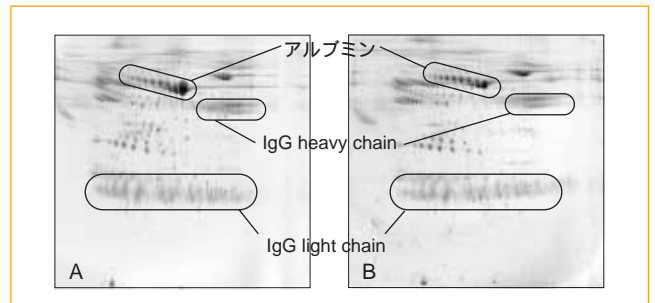


図5. Albumin and IgG Removal Kitをラット血清サンプルに使用した場合

Albumin and IgG Removal Kitのプロトコールに従ってラット血清15 µlを処理しました。未処理ラット血清（A）、処理済みラット血清（B）それぞれ50 µgをサンプルとしました。一次元目はImmobiline DryStrip pH3-10 NLを用いてEttan IPGphorで泳動し、二次元目は12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いてSE 600 RubyでSDS-PAGEを行いました。ゲルはSYPRO Rubyで染色し、Typhoon 9410でスキャンしました。

IgGのモノクローナル抗体が高い種特異性を有しているためと考えられます。

まとめ

Albumin and IgG Removal Kitは、ヒト血清に多量に含まれるアルブミン、IgGを特異的かつ効率よく除去できるキットです。ヒト血清15 µlを本キットで処理した場合、アルブミンは95%以上、IgGは90%以上除去されることが示されました。また、従来使用されていたCibacron Blueのようなアルブミン除去方法に比べ、非常に高い特異性を示すことから効果的な方法であると言えます。キットを使用して処理したサンプルを二次元電気泳動に用いることで、従来困難であった低発現タンパク質の解析が可能になります。

ご注文情報

製品名	包装	コード番号	価格(円)
Albumin and IgG Removal Kit	10 回分*2	RPN6300	54,000

*1 Ettan DIGE技術の詳細は <http://proteomics.amershambiosciences.com> をご覧ください。

*2 1回で15 µlのヒト血清サンプルの処理が可能です。

Cy, CyDye, DeCyder, Ettan, and Typhoon are trademarks of Amersham Biosciences Limited. Amersham and Amersham Biosciences are trademarks of Amersham plc. Amersham Biosciences UK Limited 2003 All rights reserved. CyDye: 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) technology is covered by US Patent Numbers 6,043,025, 6,127,134, and 6,426,190 and foreign equivalents and exclusively licensed from Carnegie Mellon University. CyDye: this product or portions thereof is manufactured under license from Carnegie Mellon University under US Patent Number 5,268,486 and US and foreign equivalents. The purchase of CyDye fluors includes a limited license to use the CyDye fluors for internal research and development, but not for any commercial purposes. A license to use the CyDye fluors for commercial purposes is subject to a separate license agreement with Amersham Biosciences. Amersham Biosciences has patent applications pending. All goods and services are sold subject to the terms and conditions of sale of the company within the Amersham Biosciences group which supplies them. A copy of these terms and conditions is available on request.

SYPROはMolecular probes inc.の登録商標です。