

蛍光ウェスタンブロットによる ERK/リン酸化 ERK の多重検出

篠原 久明博士

独立行政法人 理化学研究所 免疫・アレルギー科学 総合研究センター
細胞システムモデル化研究チーム

Key Word: ●リン酸化 ●ERK ●ECL Plex ●ImageQuant LAS 4000

はじめに

ゲノム、トランスクリプトーム、メタボローム、プロテオームの情報が揃うようになった現在、それらの情報を統合し、生命現象をシステムとして理解するシステム生物学が盛んになっています。本研究では、免疫応答反応において免疫細胞が抗原と接触した際におこるシグナル伝達およびその結果として発生する細胞の運命決定分子機構にフォーカスしています。シグナル伝達物質によって活性化されたタンパク質の経時的、定量的な実験結果をもとに細胞内の分子機構をモデル化することでこの機構を統合的に理解し、将来的に疾患を制御するような要因をシミュレーションによって見出すことを目指しています。

ターゲットとなる分子の変動を定量する手法として、直線性やダイナミックレンジに優れる多重蛍光ウェスタンブロットティングを選択しました。本アプリケーションノートでは、蛍光標識 2 次抗体 ECL Plex Western Blotting Detection System により、ERK およびリン酸化 ERK を冷却 CCD イメージャー ImageQuant LAS 4000 を用い、蛍光多重検出しました。



図 1 ImageQuant LAS 4000

ImageQuant LAS 4000(図 1)は、化学発光の検出を高感度に行えると共に、Epi-BGR 光源(図 2)との組合せで、光源をつけ替えることなく多重蛍光検出が行えます。

使用した製品

ECL Plex goat- α -rabbit IgG-Cy5 (#PA45011, GE ヘルスケア)

ECL Plex goat- α -mouse IgG-Cy3 (#PA43009, GE ヘルスケア)

ImageQuant LAS4000 (Epi-BGR 光源搭載)(GE ヘルスケア)



図 2 Epi-BGR 光源

その他試薬

試料: Jurkat Whole Cell Lysate

抗体:

ウサギ抗リン酸化 ERK 抗体(#4370, Cell Signaling Technology)

マウス抗 ERK 抗体(#9107, Cell Signaling Technology)

AP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(#sc-2057, santa cruz biotechnology, inc.)

AP 用化学発光検出試薬 Lumi-Phos WB(#34150, サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社)

ブロッキング剤 Blocking One(#03953-95, ナカライテスク)

実験方法

【サンプル調製】

Jurkat 細胞を、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体、それぞれ 10、2 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でクロスリンクし、経時的に回収しました。回収した細胞は 1% NP40 Lysis Buffer で溶解後、核を除去しました。細胞ライセートのタンパク量を定量後、すべてのサンプルのタンパク量を揃え、3XSDS Sample Buffer を加え、65-70°C で 15 分加温しました。

【電気泳動とブロッティング】

SDS-PAGE は Laemmli の方法で行い、5-15% のグラジエントゲルにサンプルを添加後、30 mA 定電流で電気泳動しました。ウェスタンブロッティングは、タンク法で 55 V、2 時間定電圧で PVDF 膜に転写し、続いてブロッキング反応に進みました。

【抗体反応】

抗体反応は下記の組合せで行いました。

メンブレン	1 次抗体	2 次抗体
A	ウサギ抗リン酸化 ERK 抗体	ECL Plex goat- α -rabbit IgG-Cy5
	マウス抗 ERK 抗体	ECL Plex goat- α -mouse IgG-Cy3
B	ウサギ抗リン酸化 ERK 抗体	AP 標識抗ウサギ IgG 抗体

1 次抗体は 4000 倍、2 次抗体は 5000 倍にブロッキング剤で希釈し、4°C で一晩振とうし、反応させました。

【検出】

蛍光および化学発光は ImageQuant LAS 4000 (Epi-BGR 光源搭載) で検出しました。蛍光検出に使用した光源およびフィルターは下記の通りです。

Cy5 検出: 落射赤色光源 (EPI-BGR) および 670LP フィルター

Cy3 検出: 落射緑色光源 (EPI-BGR) および 575DF20 フィルター

結果および考察

Jurkat 細胞に抗 CD3 抗体および抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体による刺激を与えたのち、経時的に回収したサンプル中の ERK、リン酸化 ERK を検出しました(図 3 A)。ERK のタンパク量が一定であるのに対し、リン酸化 ERK 量は刺激後 5 分で増加、その後減少することが確認できました。

なお、本実験ではウサギ抗リン酸化 ERK 抗体とマウス抗 ERK 抗体を同時に反応し、多重蛍光検出を行った場合と、それぞれを別のメンブレン上で反応・検出した場合ではその検出結果や感度に大きな差は見られませんでした。

比較対象として、リン酸化 ERK を AP-化学発光系で検出を行ったのが図 3B です。図 3A と比較すると、蛍光ウェスタンブロットティングも、一般的に高感度であるといわれている化学発光検出と遜色なく、低発現のタンパク質を検出できていることが分かります。

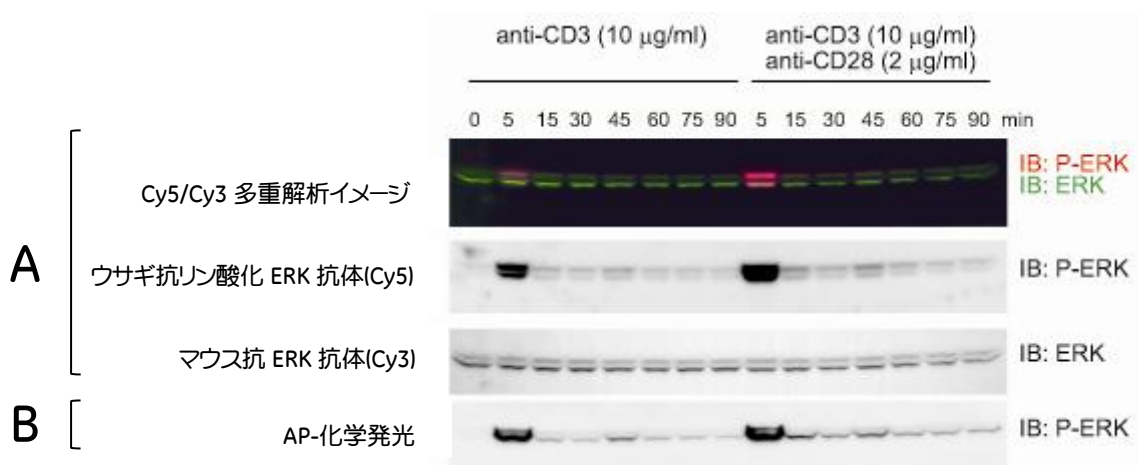


図 3 Jurkat 細胞における CD3 抗体および抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体による刺激後の ERK、リン酸化 ERK の経時的変化

追補

蛍光ウェスタンブロットリングの検出感度をさらに向上したい場合には、Biotin-Streptavidin の反応により増感することができます。通常通り、1次抗体およびビオチン標識2次抗体を反応させたのち、3次的反応として蛍光標識Streptavidinを反応させます(図4)。

この検出方法と、HRP 標識2次抗体と高感度化学発光試薬 ECL Prime Western Blotting Detection Reagentを組み合わせて検出した場合を比較したのが図5です。Biotin-Streptavidin 反応による増感により、高感度化学発光検出とほぼ同等の感度で検出できていることが分かります。

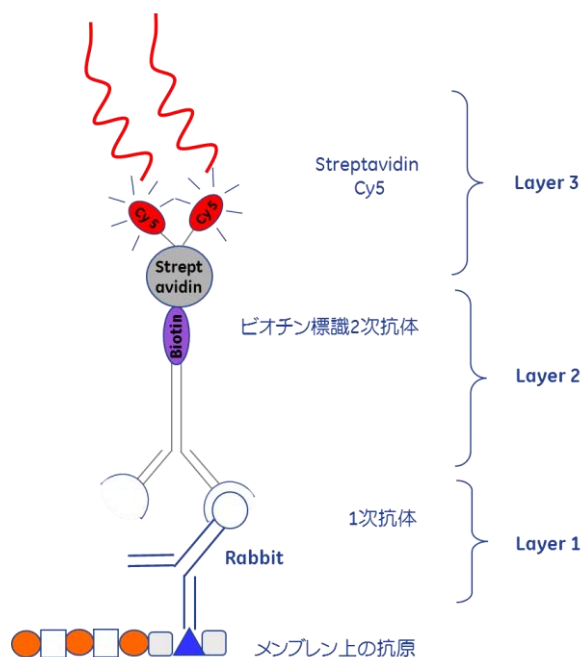


図4 Biotin-Streptavidin 反応による蛍光ウェスタンブロットリングの増感

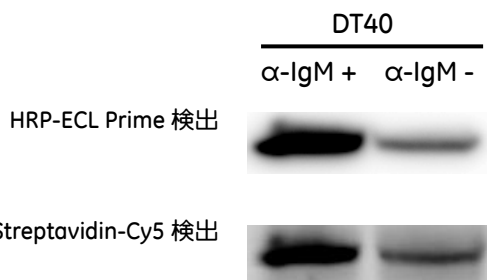


図5 DT40 細胞サンプルにおけるリン酸化 ERK 検出

HRP 標識2次抗体を用い、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent の化学発光検出を行った場合(上)と、Biotin 標識2次抗体と Streptavidin-Cy5 を反応させた場合(下)を比較しました。検出はともに ImageQuant LAS 4000 を使用しました。

まとめ

- ImageQuant LAS 4000 と Epi-BGR 光源による Cy3、Cy5 検出により、1枚のメンブレン上で ERK とリン酸化 ERK の多重検出することができました。
- 蛍光標識2次抗体 ECL Plex Western Blotting Detection System は、AP-化学発光検出系と同レベルの高感度な検出を行うことができました。

掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。
掲載されている内容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。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。
お問い合わせに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社

ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルディング
お問い合わせ：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

