

SCIENCE IMAGING SYSTEMS

Application Note No. 5

基礎編： サザンハイブリダイゼーションにおける
AttoPhos™、DDAO Phosphateを用いた酵素増幅蛍光法

FLA-2000

はじめに

サザンプロット後のDNAの特異的な検出方法は、従来ラジオアイソトープ法 (RI法) が主流でした。近年、非RI化のニーズの高まりとともに、蛍光基質を用いた酵素増幅蛍光法 (FLA-2000 Application Note No.1参照) が発展してきました。サザンハイブリダイゼーションでは、アルカリ性フォスファターゼ (ALP) が安定性の高さから標識酵素として頻繁に用いられています。

蛍光基質であるAttoPhos™は、ALPと酵素反応の結果、励起極大波長482nm、蛍光極大波長560nmの蛍光物質を生成します。また、DDAO PhosphateもALPと酵素反応の結果、励起極大波長647nm、蛍光極大波長656nmの蛍光物質を生成します。

今回はAttoPhos™、DDAO Phosphateの基本的な性質と、サザンハイブリダイゼーションの実験プロトコールをご紹介します。

Contents

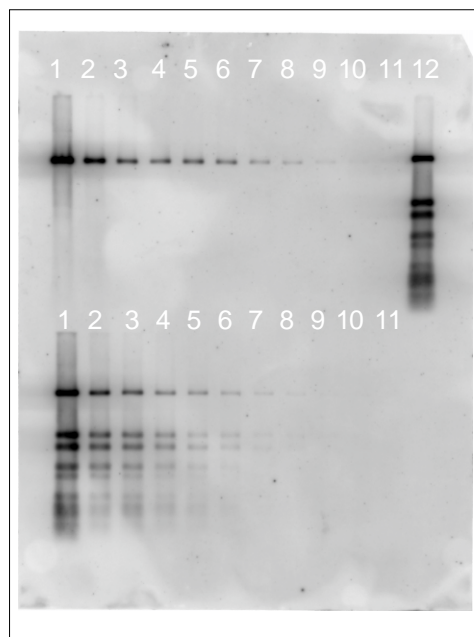
1. AttoPhos™、DDAO Phosphateの基礎データ
2. AttoPhos™、DDAO Phosphateの検出感度
3. MacBASでの解析ワンポイントアドバイス
4. 参考文献

Summary

- AttoPhos™、DDAO Phosphateは酵素増幅蛍光法の基質として、サザンハイブリダイゼーションを行うのに便利です。
- AttoPhos™、DDAO Phosphateの本文中の実験での検出感度は、各々 5 fg、10 fgです。

FLA

1 AttoPhos™ の基礎データ



画像説明

サンプル :

上段 : pBR328/*Bam* HI
 下段 : pBR328, pBR322 を
 それぞれ *Bam* HI,
Bgl I, *Hinf* I で切断し、
 その産物を 2:3:2 で
 混合したもの

FLA-2000 読み取り条件

Gradation : 65536(16bit)
 Resolution : 50 μ m
 Sensitivity : F1
 Latitude : 5
 Sample Mode : Fluor. 473nm

アプライ量 :

- 上段 -

Lane-1 : 1ng
 Lane-2 : 100pg
 Lane-3 : 50pg
 Lane-4 : 20pg
 Lane-5 : 10pg
 Lane-6 : 5pg
 Lane-7 : 2pg
 Lane-8 : 1pg
 Lane-9 : 500fg
 Lane-10 : 200fg
 Lane-11 : 100fg
 Lane-12 : 分子量マーカー

- 下段 -

Lane-1 : 1ng
 Lane-2 : 100pg
 Lane-3 : 50pg
 Lane-4 : 20pg
 Lane-5 : 10pg
 Lane-6 : 5pg
 Lane-7 : 2pg
 Lane-8 : 1pg
 Lane-9 : 500fg
 Lane-10 : 200fg
 Lane-11 : 100fg

:Y520Filter

■ 試薬の性質

名称	AttoPhos™ (アトフォス)
試薬分類	蛍光性酵素基質
特長	pH9.5の溶液中で弱い蛍光を発しますが、ALPによる酵素反応の結果強い蛍光を発するようになります。
対象サンプル	DNA、タンパク質
保存状態	遮光 / 密栓して冷蔵保存してください。
取扱注意事項	手袋を着用して取り扱ってください。廃棄は焼却処理してください。
製造元	Boehringer Mannheim 社 (AttoPhos™ Substrate Set *)

* AttoPhos™は試薬メーカーのキットに含有されています。

■ 励起・蛍光スペクトル

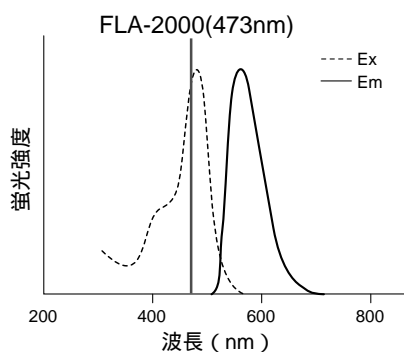
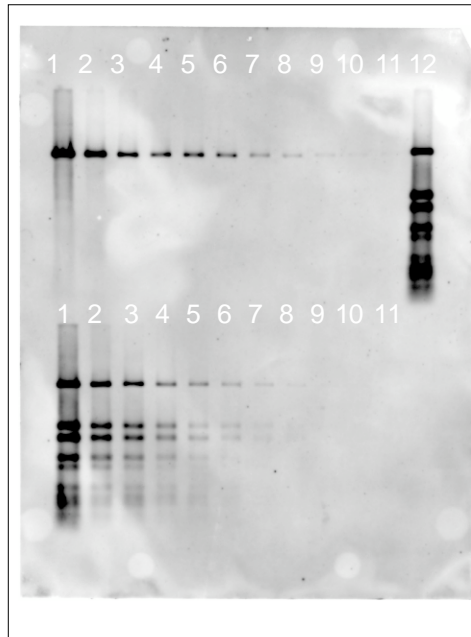


Fig.1-1 励起・蛍光スペクトル
 励起極大波長は482nm、蛍光極大波長は560nmです。
 (Ex:励起スペクトル, Em:蛍光スペクトル)

Fig.1-1

DDAO Phosphate の基礎データ



画像説明

サンプル :

上段 : pBR328/*Bam* HI
 下段 : pBR328, pBR322 を
 それぞれ *Bam* HI,
Bgl I, *Hinf* I で切断し、
 その産物を 2:3:2 で
 混合したもの

FLA-2000 読み取り条件

Gradation : 65536(16bit)
 Resolution : 50 μ m
 Sensitivity : F10
 Latitude : 5
 Sample Mode : Fluor.633nm
 :R675Filter

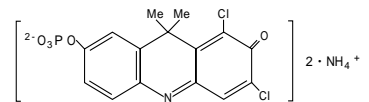
アプライ量 :

	- 上段 -	- 下段 -
Lane-1 :	1ng	Lane-1 : 1ng
Lane-2 :	100pg	Lane-2 : 100pg
Lane-3 :	50pg	Lane-3 : 50pg
Lane-4 :	20pg	Lane-4 : 20pg
Lane-5 :	10pg	Lane-5 : 10pg
Lane-6 :	5pg	Lane-6 : 5pg
Lane-7 :	2pg	Lane-7 : 2pg
Lane-8 :	1pg	Lane-8 : 1pg
Lane-9 :	500fg	Lane-9 : 500fg
Lane-10 :	200fg	Lane-10 : 200fg
Lane-11 :	100fg	Lane-11 : 100fg
Lane-12 :	分子量マーカー	

■ 試薬の性質

名称	1,3-dichloro-9,9-dimethyl-acridine-2-one-7-yl phosphate (DDAO フォスフェイト)
試薬分類	蛍光性酵素基質
特長	アルカリ性フォスファターゼにより、蛍光物質を生成します
対象サンプル	DNA、タンパク質
保存状態	乾燥剤とともに遮光・冷凍保存してください。とくに溶液状態では遮光が必要です。
取扱注意事項	手袋を着用してください
製造元	Molecular Probes 社

DDAO Phosphate



■ 励起・蛍光スペクトル

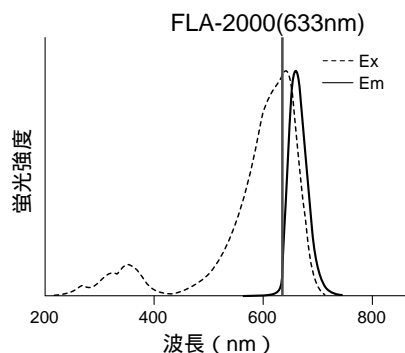


Fig.1-2 励起・蛍光スペクトル
 励起極大波長は647nm、蛍光極大波長は656nmです。
 (Ex: 励起スペクトル, Em: 蛍光スペクトル)

Fig.1-2

実験プロトコール

必要な試薬の準備

*プロットング前処理	変性液	0.5N NaOH, 1.5M NaCl
	中和液	1M Tris-HCl(pH8.0), 1.5M NaCl
*プロットング	トランスファーバッファー	20 × SSC (3M NaCl , 0.3M クエン酸ナトリウム pH7.0)
*プレハイブリダイゼーション	プレハイブリダイゼーションバッファー	6 × SSC (0.9M NaCl, 0.09M クエン酸ナトリウム pH7.0) 5 × Denhardt's solution (0.1%Ficoll Type 400, 0.1% Polyvinylpyrrolidone, 0.1%BSA), 0.5% SDS, 100 μ g/ml DNA
*ハイブリダイゼーション	ハイブリダイゼーションバッファー	6 × SSC (0.9M NaCl, 0.09M クエン酸ナトリウム pH7.0) 0.01M EDTA pH8.0 5 × Denhardt's solution (0.1%Ficoll Type 400, 0.1% Polyvinylpyrrolidone, 0.1%BSA), 0.5% SDS, 100 μ g/ml DNA
	洗浄バッファー 1	2 × SSC, 0.1% SDS
	洗浄バッファー 2	0.1 × SSC, 0.1% SDS
*ブロッキング	洗浄バッファー	0.1M マレイン酸, 0.15M NaCl pH7.5 0.3% Tween® 20
	ブロッキングバッファー	バッファー(0.1M マレイン酸, 0.15M NaCl pH7.5 (+20))に核酸ハイブリダイゼーション用のブロッキング試薬を1%の濃度に溶かしたもの
	検出バッファー	0.1M Tris-HCl, pH9.5, 0.1M NaCl, 50mM MgCl ₂
*基質との反応	AttoPhos™ バッファー	AttoPhos™ substrate を AttoPhos™ buffer(2.4M diethanolamine, 0.057mM MgCl ₂ , 0.005% NaN ₃ pH10.0)で希釈
	DDAO バッファー	検出バッファーで 1:1000 に希釈

ゲル・サンプルの準備

- ▶ *アガロースゲル^{*1}の作製
 - ▶ (1) アガロースの粉末を 1 × TAE に溶かし、1%の溶液を作る
 - ▶ (2) 攪拌しながら約 90 まで加熱する
 - ▶ (3) 液温 70 まで放置する
 - ▶ (4) ゲル作製トレイに1%アガロースゲル溶液を投入し、固まるまで放置する^{*2} 待ち時間 約 1 時間
- ▶ *サンプル調整
 - ▶ TE バッファーで DNA を希釈する

^{*1} 今回のアガロースゲルは、Boehringer Mannheim 社製 アガロースを使用しています。

^{*2} ゲルは30分程で固まりますが1時間程度待った方が安定します。

電気泳動

- ▶ (1) 1 × TAE 電気泳動用バッファーをいれる
- ▶ (2) DNA サンプルを各ウェルに投入する
- ▶ (3) 50 V 電圧をかけ、泳動する^{*3} 待ち時間 約 90 分

^{*3} プロットングの前にゲルを染色すると、泳動の確認ができます。SYBR® Green I を用いると短時間で確認をすることができます。

プロットング前処理

- ▶ (1) 変性液に振とうしながら浸す^{*4} 待ち時間 約 30 分
- ▶ (2) 変性液を捨てる
- ▶ (3) 中和液に振とうしながら浸す 待ち時間 約 30 分

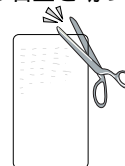
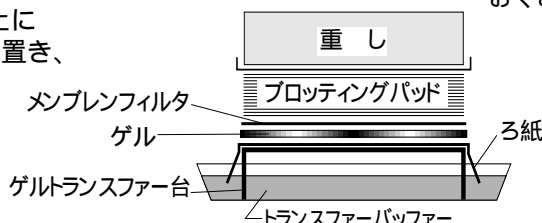
^{*4} 変性液に浸すことにより、2本鎖 DNA を 1本鎖にします。この処理はプロットング効率を上げるために行います。

プロットング

- ▶ (1) ゲルトランスファー台をセットし、トランスファーバッファー (20 × SSC) を満たす
- ▶ (2) ろ紙を空気が入らないようにゲルトランスファー台の上に置く
- ▶ (3) ろ紙の上に中和液から出したゲルを置く^{*5}
- ▶ (4) ゲルの上にメンブレンフィルタを置く^{*6}
- ▶ (5) メンブレンフィルタの上にプロットングパッドを置き、重しを乗せる 待ち時間 約 3 時間

^{*5} ゲル上部の表面は、平坦ではなくムラがあります。メンブレンフィルタへ効率よく転写するため、ゲルをひっくり返して平坦な面が上にくるように置きます。

^{*6} 左右・上下が分かるようにメンブレンフィルタの右上を切っておくと便利です。



DNAの固定

- (1) 80℃ 20分ベーキングをする
- (2) UVクロスリンク 33mJ / cm²を行う^{*8}

ハイブリダイゼーション

- * プレハイブリダイゼーション
 - (1) メンブレンフィルタをハイブリバッグに入れる^{*9}
 - (2) プレハイブリダイゼーションバッファーを入れる
68℃で待ち時間 約1時間
- * プローブ^{*10}の調整
 - (3) プローブを 95℃で5分間加熱する
 - (4) プローブを急冷し、そのまま5分間保持する
- * ハイブリダイゼーション
 - (5) プレハイブリダイゼーションバッファーを捨てる
 - (6) プローブをハイブリダイゼーションバッファーに投入する
 - (7) ハイブリダイゼーションバッファーをハイブリバッグに入れる
68℃で待ち時間 オーバーナイト
 - (8) 洗浄バッファー1で2回洗浄する(室温)
待ち時間 5分×2回
 - (9) 洗浄バッファー2で2回洗浄する(68℃)
待ち時間 15分×2回

DNAの検出^{*11}

- * ブロッキング
 - (1) 洗浄バッファーを入れ、平衡化する
待ち時間 約1分
 - (2) 洗浄バッファーを捨てる
 - (3) ブロッキングバッファーを入れ、振とうする
待ち時間 約30分
- * ALP 標識
 - (4) ALP標識抗ジゴキシゲニン抗体を、1:10000にブロッキングバッファーで希釈する。(ALP標識バッファー)
 - (5) ブロッキングバッファーを捨てる
 - (6) ALP標識バッファーを入れ、振とうする
待ち時間 約30分
- * 洗浄
 - (7) ALP標識バッファーを捨てる
 - (8) 洗浄バッファーで2回洗浄する
待ち時間 15分×2回
- * 平衡化
 - (9) 洗浄バッファーを捨てる
 - (10) 検出バッファーを入れ平衡化(pH9.5)する
待ち時間 約5分
- * 基質との反応
 - (11) 検出バッファーを捨てる
 - (12) AttoPhos™ バッファー又は DDAO バッファーを入れて、静かに振とうする
待ち時間 約5分
 - (13) AttoPhos™ バッファー又は DDAO バッファーを捨てる
 - (14) ハイブリバッグを密封する^{*12}
待ち時間 約5分~1時間

読み取り

- (1) メンブレンフィルタのはいったハイブリバッグを FLUORステージにセットする^{*13}
- (2) Image Reader を起動する
- (3) FLA-2000 読み取り条件(2,3ページ参照)を設定し、Read ボタンをクリックする

^{*8} DNAの固定は、80℃ 20分のベーキングとUVクロスリンク 33mJ/cm²の条件で固定を行うと高感度なデータを得ることができます。この条件以上でも以下でも感度は悪くなってしまいます。

紫外線照射量 33mJ/cm²にするための条件
 ・ UVクロスリンカー
 33mJ/cm²にセットし照射する
 ・ 254nmUVトランスイルミネーター
 最適照射時間(秒)=33 × 10³ / 照射強度(W/cm²)
 ・ 312nmUVトランスイルミネーター
 最適照射時間(秒)=40.5 × 10³ / 照射強度(W/cm²)

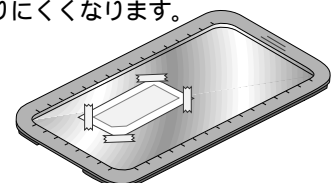
^{*9} ハイブリバッグに泡が入ると液が均等に行き渡らないので注意してください。

^{*10} プローブは、Boehringer Mannheim 社製 DIG DNA Labeling Kitに含まれているDNAを使用しています。

^{*11} DNAの検出で使用するバッファーは、(基質との反応以外)Boehringer Mannheim 社製 DIG Wash and Block Buffer Setを使用しています。

^{*12} 38℃で20分加温すると、反応を促進することができます

^{*13} ハイブリバッグは、しわの入らないようにテープで止めます。対角線上に貼るとしわが入りにくくなります。

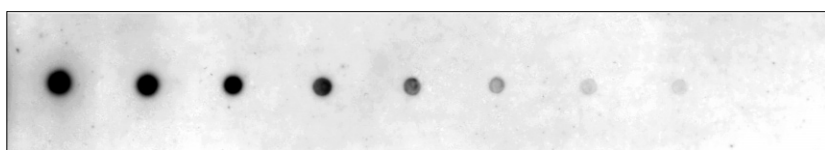


2 AttoPhos™、DDAO Phosphate の検出感度

FLA-2000によるDNAの検出感度を調べるために、プラスチャージナイロンメンブレンに種々の濃度のDIG標識されたpBR328をドットし、ALP標識された抗DIG抗体と反応後AttoPhos™およびDDAO Phosphateをそれぞれ基質として酵素反応を行いました。メンブレンフィルタをFLA-2000を用いて測定すると次の様な結果が得られました。AttoPhos™では5fg、DDAO Phosphateでは10fgまで検出することができました。

■ AttoPhos™

1pg 500fg 200fg 100fg 50fg 20fg 10fg 5fg



■ DDAO Phosphate

10pg 1pg 500fg 200fg 100fg 50fg 20fg 10fg 5fg

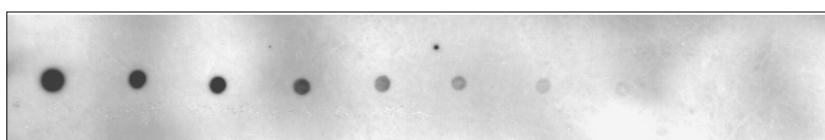


Fig.2-1 ドットプロットによる検出感度

図上: AttoPhos™検出
DNA量 1pg ~ 5fg
図下: DDAO Phosphate検出
DNA量 10pg ~ 5fg

サンプルはDIG標識されたpBR328 (Boehringer Mannheim 社製) を使用しています。

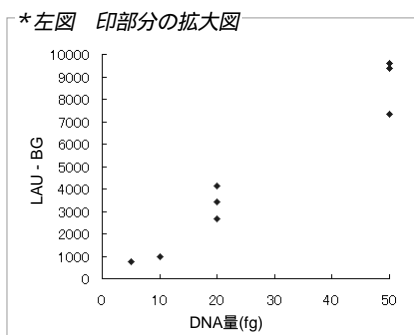
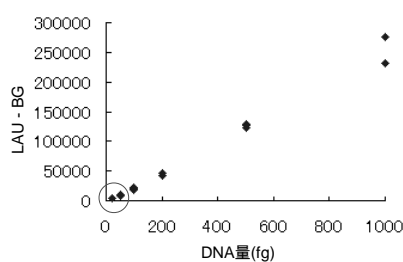
画像の読み取りは、以下の条件でFLA-2000を用いて行いました。

Gradation : 65536(16bit)
Resolution : 50 μ m
Sensitivity : F10
Latitude : 5
Sample Mode : Fluor. 473nm : Y520 Filter (AttoPhos™)
Fluor. 633nm : R675 Filter (DDAO Phosphate)

Fig.2-1

■ DNA 量と蛍光強度

AttoPhos™



DDAO Phosphate

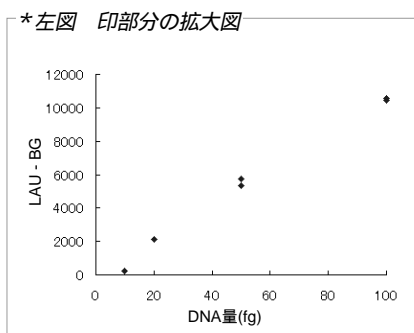
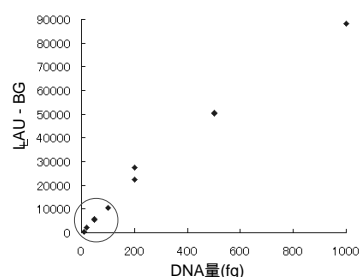


Fig.2-2 ドットプロットにおけるDNA量と蛍光強度の関係

図左上 : AttoPhos™ 全濃度域
図右上 : 左上図 印部分の拡大図
図左下 : DDAO Phosphate全濃度域
図右下 : 左下図 印部分の拡大図

FLA-2000用解析ソフトMacBASのプロファイル機能を用いて定量しました。

(LAUIはFLA-2000の蛍光強度表示単位で、Linear Arbitrary Unitの略です)

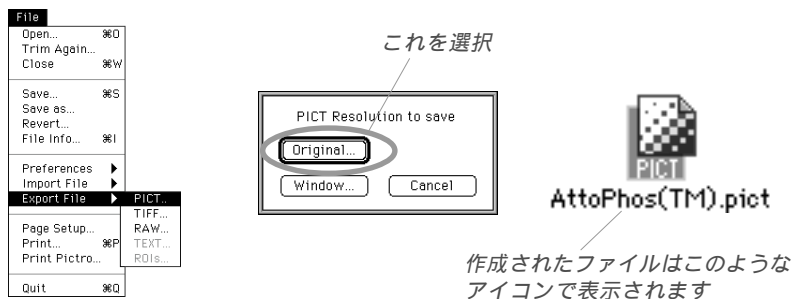
Fig.2-2

3 MacBAS での解析 ワンポイント・アドバイス

Q4. FLA-2000 で読み取った AttoPhos™ の画像を、MacBAS 以外の画像処理ソフトウェアでも扱えるようにしたいのですが、どうしたらよいのでしょうか？

A4. MacBASは独自のファイル形式を採用していますので、お手持ちのソフトウェアで画像を開くためには、ファイル形式を変更する必要があります。ここでは、Adobe Photoshop®で画像を開く一例をご紹介します。

まず、扱いたい画像を開き、画像のウィンドウ (Imageウィンドウ) がアクティブな状態でFile - Export File - PICT...を選択してください。下のようなPICT Resolution to saveダイアログが表示されますので、Original...ボタン^{*1}をクリックし、8bitのPICTファイルに変換されたファイルを作成します^{*2}。



解析の流れ

- ・ 画像を開く
- ・ 画像を見やすくする
- ・ 定量する
- ・ プリントする
- ・ 他のアプリケーションで活用する
- ・ データを保存する
- ・ 終了させる

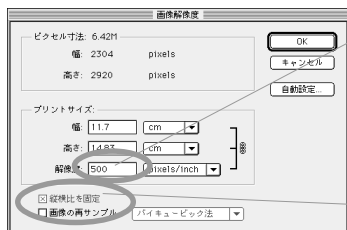
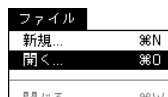
^{*1} Original...ボタンを選択することにより、読み取り時の画素サイズ(200 ~ 50 μm)の情報を保持したまま PICTファイルに変換することが出来ます。ここでWindow...ボタンを選択すると、CRT上の画素サイズ(72dpi)でファイルを作成します。

^{*2} この時、PICT形式のファイルを新たに作成することになりますので、MacBAS独自のファイルは一切変更されません。

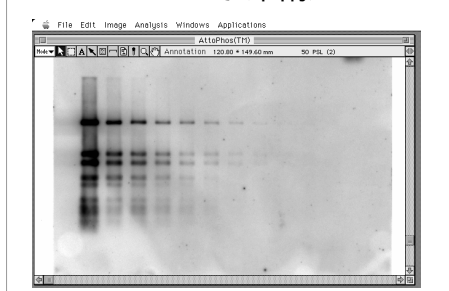
今作成したファイルは、Adobe Photoshop®^{*3}で、PICTファイルとして画像を開くことができます。

実寸サイズで表示するためには、画像を開いたあと、イメージ - 画像解像度を選択してファイルサイズを設定し直してください。

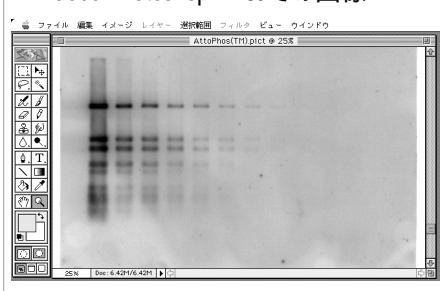
^{*3} ここでは、Adobe Photoshop®4.0Jを使用しました。



*MacBAS V2.51での画像



* Adobe Photoshop® 4.0Jでの画像



4 参考文献

AttoPhos™の文献

- 1) Cano, R. J., Torres, M. J., Klem, R. E., Palomares, J. C. DNA hybridization assay using Attophos™, a fluorescent substrate for alkaline phosphatase, *BioTechniques*; 12, 264-269, (1992)
- 2) Cano, R. J., Torres, M. J., Klem, R. E., Palomares, J. C., Casadesus, J., Detection of salmonellas by DNA hybridization with a fluorescent alkaline phosphatase substrate; *Journal of Applied Bacteriology*; 72, 393-399 (1992)
- 3) Kerkhof, L., A comparison of substrates for quantifying the signal from a nonradiolabeled DNA probe, *Analytical Biochemistry*, 205, 359-364 (1992)

DDAO Phosphate の文献

- 1) Hisabori, T., Inoue, K., Akabane, Y., Iwakami, S., Manabe, K. Two-dimensional gel electrophoresis of the membrane-bound protein complexes, including photosystem, of thylakoid membranes in the presence of sodium oligoxyethylene alkyl ether sulfate/dimethyl dodecylamine oxide and sodium dodecyl sulfate, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 22: 253-260 (1991).

AttoPhos は JBL Scientific 社の商標です。
Tween は ICI Americas 社の登録商標です。
Adobe 及び Adobe Photoshop は Adobe Systems 社の登録商標です。

著者・編集

三浦 研二

土谷 徹

長島 眞喜子

今井 千織

(富士写真フイルム)

1998年 3月発行



富士写真フイルム株式会社

●本書についてのお問い合わせは

東京本社 ■ 機器事業部 サイエンス・システム

〒106-8620 東京都港区西麻布2-26-30 TEL (03)3406-2201

FAX (03)3406-2158

E-mail : sginfo@tokyo.fujifilm.co.jp