

SCIENCE IMAGING SYSTEMS

Application Note No.10

基礎編：タンパク質二次元電気泳動とSYPRO® Orange染色法

FLA-2000

はじめに

フルオロ・イメージアナライザーFLA-2000は、SYPRO® Orange染色ゲルを高感度に画像化できます。SYPRO® Orangeは、タンパク質のゲル電気泳動をCBB染色法より簡単に、かつ銀染色法並の感度で検出できる蛍光染色試薬です。一次元ゲル電気泳動における検出感度については、本Application Note No.4に記載致しましたのでご参照下さい。タンパク質の一次元あるいは二次元SDS-PAGEに有用な試薬といえるでしょう。

今回は、酒造酵母の同定に、タンパク質二次元電気泳動法を利用されている京都市工業試験場・微生物応用研究室の山本佳宏先生にご執筆頂き、タンパク質二次元電気泳動の実験方法、染色方法の比較などをご紹介します。

タンパク質の二次元電気泳動は、非常に豊富な情報を得ることができます。しかし、CBB染色法では感度が足りず、銀染色法においては、染色方法が煩雑で染まらないスポットが存在するなどの問題があります。FLA-2000とSYPRO® Orangeとの組み合わせにより、タンパク質二次元電気泳動が、思ったよりずっと身近な実験手法となることが、ご理解いただくと考えております。

Contents

1. Introduction
2. タンパク質の二次元電気泳動法プロトコール
3. タンパク質検出法の比較
4. 参考文献

Summary

- ・ SYPRO® Orange + FLA-2000を用いることで銀染色法と同等以上の感度が得られます。
- ・ SYPRO® Orange 染色法は銀染色法と異なり高濃度によるスポットの消失が見られません。
- ・ SYPRO® Orange 染色法後に、CBB染色法、銀染色法を行うことが可能です。

1 Introduction

O Farrellの二次元電気泳動法(文献 1) 参照)は一度の操作により1000種類以上のタンパクの分画、そして少量であれば回収まで行える方法として注目されています。近年遺伝子解析技術の急激な進歩により、DNAサイドからのアプローチがタンパク解析より効果的な局面が多く見受けられますが、一部においては、タンパク解析技術が有効となる場合があります。

たとえば、発現遺伝子の同定を行う目的で、しかもサンプルが多く利用できる場合には、発現タンパク質を解析するアプローチが有効となります。

同様の目的のためにディファレンシャルディスプレイ法が主流となっております。しかし、極微量のサンプルで発現遺伝子を直接回収できる反面、高度な条件設定が必要になるとともにコストも大きくなります。

今回は酵母を例に、二次元電気泳動法の実験プロトコールとSYPRO® Orangeを用いた染色法について紹介させていただきます。

ディファレンシャルディスプレイ法
発現しているmRNAの差異を見つける方法。逆転写(RT)とPCRを利用します。

2 タンパク質の二次元電気泳動法プロトコール

等電点電気泳動(一次元目)

* 試薬の調整

Lysis Buffer

尿素	4.8 g
Nonidet P-40	0.2 ml
両性担体(pH3.5-10) ^{*1}	0.2 ml
2-Mercaptoethanol	0.5 ml

蒸留水で 10ml とする。

^{*1} この実験では、Ampholineを使用。

等電点用アクリルアミド溶液

Acrylamide(monomer) ^{*2}	28.4 g
N,N'-Methylenebisacrylamide	1.6 g

蒸留水で 100ml とする。

^{*2} 高純度品が必要。
(Bio Rad社、ナカライ等電点用SP等)

* 等電点ディスクゲルの調製

Urea	4.8 g
等電点用アクリルアミド (Acrylamide 28.4%:Bis 1.6%)	1.10 ml
蒸留水	2.90 ml
両性担体 (pH 3.5-10)	0.25 ml
両性担体 (pH 5-7)	0.25 ml
10% Nonidet P-40	2.0 ml
10% APS 溶液	30 µl

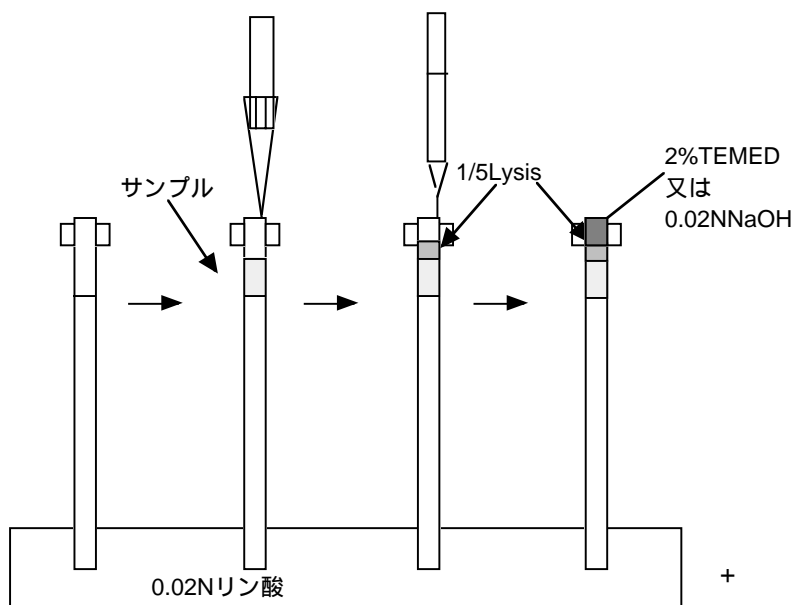
以上をスターラーでよく混ぜる。Urea が溶けたら
TEMED 30 µl

APS
過硫酸アンモニウム

を加えて、下部をパラフィルムでふたをしたガラス管に注入する。
アクリルアミドの上に蒸留水を重層する。

* 等電点電気泳動

- (1) ゲルの上の水を取り除く。
- (2) 下の電極槽 (+側) に陽極側の電極液 (0.02N リン酸) を入れる。
- (3) ガラス管のパラフィルムを取り去り下部を電極槽につける。
- (4) 上の電極槽 (-側) を付け、サンプルを注入する。
- (5) 5 倍に希釈した Lysis Buffer を 20 μ l 重層する。
- (6) ガラス管の先端まで陰極側の電極液 (0.02N NaOH 又は 2% TEMED) を重層する。
- (7) 上の電極槽 (-側) に陰極側の電極液を入れる。
- (8) 15cm 程度のゲルの場合 200V-1hr、400V-16 ~ 18hr 及び 600V-3hr の順番で電圧をかける。



* 一次元目の等電点電気泳動の確認 (等電点標準等^{*3}の確認)

- (1) 取り出した等電点ゲルのうち1本を15%トリクロロ酢酸溶液中に1時間浸す。(白く濁る)
- (2) 表面を軽く蒸留水で洗浄した後、CBB 染色法を行う。^{*4}

^{*3} 現在SERVA社 Protein Test Mixture for pI determination pH3-10 を使用している。

トリクロロ酢酸(CCl₃COOH)
タンパク質の変性剤

^{*4} 確認に使用したゲルは二次元目の泳動には使えない。

SDS 電気泳動 (二次元目)

* 等電点ゲル処理バッファの調整

- | | |
|-----------------------|-------|
| 0.5M Tris-HCl (pH6.8) | 25 ml |
| SDS ^{*5} | 5 g |
- 蒸留水を加えて 200ml とする。

^{*5} ナカライSPを使用。

* 等電点ゲルの処理^{*6}

- (1) 等電点ゲルをガラス管から出して、100ml ビーカーに入れ、上記の等電点ゲル処理バッファ 10ml、500 μ l の 2-メルカプトエタノールを加え 20 分間振とうする。
- (2) (1)の溶液を除去して新しい等電点ゲル処理バッファ 10ml を加え、20 分間振とうする。等電点ゲル処理バッファを除去して新しい等電点ゲル処理バッファ 10ml を加え 20 分間振とうする。^{*7}

^{*6} 等電点ゲルの処理は、両性担体を含む一次元ゲルのバッファ置換のために行う。

2-メルカプトエタノール
(CH₂(SH)CH₂OH)
還元剤であり酸化防止やタンパク中のS-S結合切断に用いられる。

^{*7} 残留する両性担体はSYPRO® Orange 染色法によるバックグラウンドを高めるためバッファの交換をよく行う。

* SDS 電気泳動用試薬の調製

ゲル調製用試薬

30% アクリルアミド、0.135% ビスアクリルアミド溶液
 30% アクリルアミド、0.8% ビスアクリルアミド溶液
 分離ゲルバッファー(1M Tris, 0.27% SDS pH 8.8)
 濃縮ゲルバッファー(0.5M Tris, 0.4% SDS pH 6.8)

この場合のアクリルアミドは一般用で十分。(ナカライSP)

電極液

Tris-HCl 3.0 g
 glycine 14.4 g
 SDS 1.0 g

蒸留水に溶かして1000mlとする。

等電点ゲル貼付用 1% アガロース

電気泳動用アガロース*⁸ 1 g
 0.5M Tris-HCl (pH6.8) 12.5 ml
 SDS 2.5 g

*⁸ ナカライ、アガロースME使用

Bromphenol Blue (BPB)をメタノールに溶解して加える。*⁹

蒸留水で100mlとする。電子レンジで溶解後、1回分ずつ分注する。使用するとき電子レンジで溶解し使用する。

*⁹ SYPRO® Orangeを用いる場合には極力少なくする。この実験では、ミクロスパーテルの1/8量を使用。大量のBPBは、バックグラウンドを上昇させる。また、ゲル中に残るとFLA-2000で検出されてしまう。

* ゲルの調製

SDS 分離ゲル (20 × 20cm ゲル 1 枚あたり) *¹⁰

組 成	10%	12%	15%	17%	18%
アクリルアミド溶液 (ml)	6.6	8.0	10.0	11.3	12
1M Tris-HCl(0.27% SDS pH8.8)(ml)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
蒸留水 (ml)	5.9	4.5	2.5	1.1	0.5
10% APS 溶液(μl)	60	60	60	60	60
TEMED (μl)	30	30	30	30	30

*¹⁰ ゲルの濃度は分離を行うサンプルによって選択する。アクリルアミド:bisの比が、30:0.135のゲルはプロテインの効率が良くなると言われている。

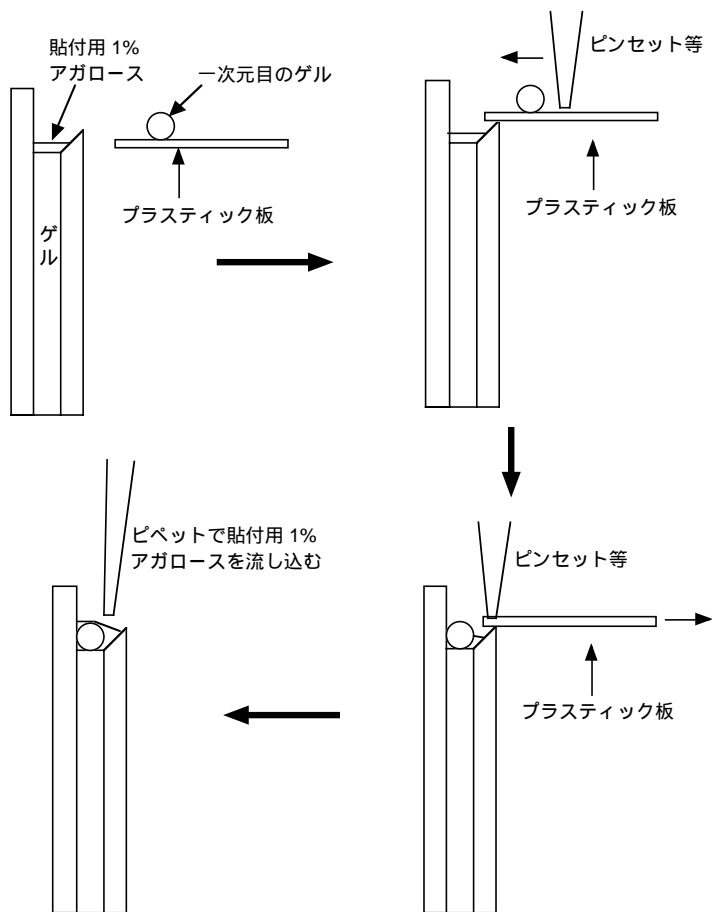
SDS 濃縮ゲル

アクリルアミド溶液 2 ml
 0.5M Tris-HCl (0.4% SDS pH6.8) 3 ml
 蒸留水 7 ml
 10% APS 溶液 30 μl
 TEMED 20 μl

* SDS 電気泳動

- (1) ガラス板を組み立てる。
- (2) 分離ゲルを適当な組成で調製し、ゲル板に流し込む。(上記のSDS分離ゲル表を参照)
- (3) 蒸留水をゆっくり重層する。
- (4) ゲルが固まったら上層の水を捨てて、ゲルの上面を新しい蒸留水で1度洗浄する。
- (5) 濃縮ゲルを上記SDS濃縮ゲル組成で調製し、ゲル板に流し込む。
- (6) ゲル上面の泡を極力取り除く。(ピペットで)
- (7) ゲル上面に電子レンジで溶かした少量の等電点ゲル貼付用 1%アガロースをのせる。
- (8) 等電点ゲル貼付用 1%アガロースと密着するように一次元目のゲルをのせる。

(9) 二次元目ゲルと一次元目ゲルの間に泡が入らないように等電点ゲル貼付用 1% アガロースで固定する。



(10) 電気泳動を行う。^{*11}

^{*11} SYPRO® Orangeを用いる場合、泳動先端を流しきってしまう方がよい結果が得られる。

SYPRO® Orange を用いたスポット検出

- 泳動終了後のゲルをバットに移す。^{*12}
- 7.5%酢酸とSYPRO® Orangeを5000:1でよく混合した後30分間染色する。
- 蒸留水で15分間洗浄する。この操作を2回繰り返す。蒸留水はできるだけ大量に使用する。銀染色法、CBB染色法を行う場合にはこのまま(5)の操作に進む。
- FLA-2000で画像を読み込む。^{*13}
- 銀染色法を行う場合^{*14}:
 エタノール:酢酸:水を50:20:30の割合で混合し、脱色液を調整する。
 脱色液に浸して20分間振とうする。
 そのまま銀染色法の操作に移る。
 CBB染色法を行う場合:
 エタノール:酢酸:水を50:20:30の割合で混合し、脱色液1を調整する。
 脱色液1に浸して20分間振とうする。
 エタノール:酢酸:水を20:5:75の割合で混合し、脱色液2を調整する。
 脱色液2に浸して20分間振とうする。
 CBB染色液に浸して通常のCBB染色法を行う。

^{*12} ゲルが重なるとタンパク質の濃い部分が写り込むため、ゲルが重ならないように注意すること。

^{*13} FLA-2000を使用する場合は、励起波長473nm、受光フィルタY520の条件で読み込むと感度良く取り込める。読み取り感度はF1000を選ぶことで銀染色法以上の感度が得られる場合がある。

^{*14} ナカライ電気泳動用高感度銀染色法キットタンパク質用を使用。

3 タンパク質検出法の比較

■ タンパク質検出の染色法による比較

CBB 染色法

CBB染色法は広く普及している方法で、サンプル量の増加に伴う検出値の不連続性も小さく、染色後のN末端シークエンスも可能であるなど優れた方法です。また、あらゆるタンパクを検出でき、ペプチドの種類による検出感度のばらつきも少ないようです。欠点としてはFig.3-1とFig.3-3の例からも見られるように感度が銀染色法等に比べて低くなります。また、染色や脱色に時間がかかるということも問題点の一つです。

銀染色法

銀染色法は非RIの検出法の中で非常に高い感度を持っています。しかし、スポットのタンパク量が多い場合、スポットが白く抜ける (Fig.3-1左上、スポットが消失する寸前) という問題があります。このため、同一ゲル上でスポットの濃度差が大きくなる二次元電気泳動においては、薄いスポットに焦点を当てて検出を行なうと、タンパク量の非常に多いスポットが消失し、定量性が失われることもあります。また、タンパクによっては検出感度が悪くなったり、場合によっては全く検出されないスポットも見受けられます。また、CBB染色法などに比べて、サンプル量、染色工程等を厳密にコントロールする必要があります。

RI 標識法

RI標識法は、微生物や培養細胞で、培地中に¹⁴Cや³⁵Sで標識したアミノ酸を加え産生するタンパクを直接標識する方法です。

この方法はタンパクの種類を問わず高感度に検出することができますが、RIを使用するために用途が限定されます。

SYPRO® Orange を用いたタンパクの蛍光染色法

SYPRO® Orangeを用いた蛍光染色法はほぼ銀染色法に匹敵する感度を持っています (Fig.3-4, Fig.3-5)。さらに、スポットが白く抜けるという問題は見られません (Fig.3-1, Fig.3-2)。また、蛍光スキャナーを用いることで、広いダイナミックレンジで検出することができます。広いダイナミックレンジを持っているため、スポットの検出下限、検出上限の範囲も広いようです。

銀染色法では、サンプルの添加量や染色条件の違いにより、スポットの検出結果に差が見られます。毎回、同等の結果を安定して得るためには厳密な条件設定が必要であり、サンプルによっては非常に困難になります。

FLA-2000を用いる場合には、16bit (65536階調) のデジタル画像を生成するため、コントラスト調整機能を利用することにより最適な画像を得ることができ、銀染色法と比べて再現性よく結果が得られます。また、染色にかかる手間も時間もCBB染色法並みかそれ以下となります。

ただし、SYPRO® Orangeは現在のところ試薬のロット間差のためか、購入した試薬によっては期待した感度が出ない場合もあります。実験の前には確認が必要です。

■ サンプル解析例

以下の二次元電気泳動ゲルは日本酒醸造用酵母を同じ量だけ用いてCBB染色法、銀染色法及びSYPRO® Orange染色法でスポットを検出したものです。

< CBB 染色法の条件に合わせたサンプル量を添加した場合 >

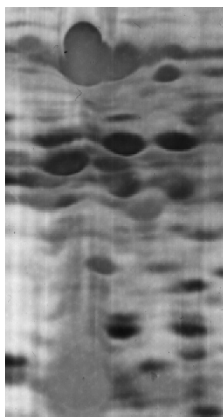


Fig.3-1

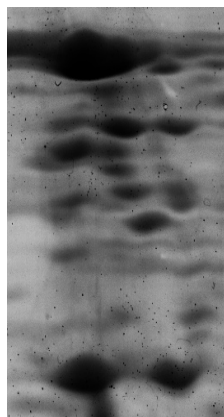


Fig.3-2



Fig.3-3

Fig. 3-1 二次元電気泳動画像
(銀染色法)

Fig. 3-2 二次元電気泳動画像
(SYPRO® Orange 染色法)

FLA-2000 読み取り条件
Gradation: 65536 (16bit)
Resolution: 100µm
Sensitivity: F1000
Latitude: 5
Sample Mode: Fluor. 473nm
Y520 Filter

Fig. 3-3 二次元電気泳動画像
(CBB 染色法)

< 銀染色法の条件に合わせたサンプル量を添加した場合 >

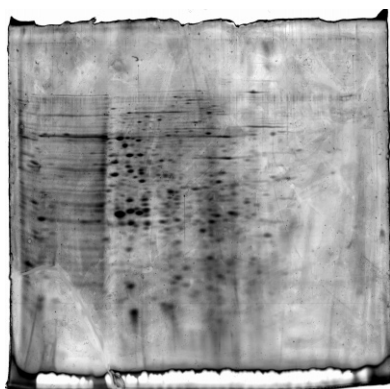


Fig.3-4

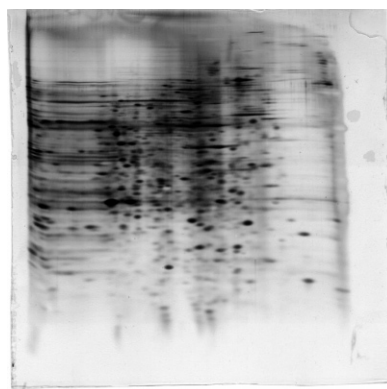


Fig.3-5

Fig. 3-4 二次元電気泳動画像
(SYPRO® Orange 染色法)

FLA-2000 読み取り条件
Gradation: 65536 (16bit)
Resolution: 100µm
Sensitivity: F1000
Latitude: 5
Sample Mode: Fluor. 473nm
Y520 Filter

Fig. 3-5 二次元電気泳動画像
(銀染色法)

■ 結 論

特に銀染色法とCBB染色法の感度差がはっきり出ていますが、CBB染色法で検出されている大きなスポットは銀染色法では白く抜けてスポットが飛んでいたり、退色が生じています。この結果と併せてSYPRO® Orange染色法を見てみると、明らかにCBB染色法より感度が高いこと、高濃度のスポットが正常に検出できることがわかります。SYPRO® Orange染色法+FLA-2000の組み合わせでは、銀染色法の検出域からCBB染色法までの広いダイナミックレンジを包含しています。

またSYPRO® Orange染色法後にCBB染色法、銀染色法を行うことが容易です。SYPRO® Orange染色法+従来の検出法を用いることにより、同一サンプルでの従来法のデータを得ることもできます。

これらより、SYPRO® Orange染色法は、銀染色法に匹敵する感度とCBB染色法に近い特性を持った検出方法として有効に利用することができます。

4 参考文献

- 1) Patrick H. O'Farrell, High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins, *The Journal of Biological Chemistry*; Vol. 250, No. 10, 4007-4021 (1975)
- 2) 平野 久, 遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析
プロテインゲルとシーケンシング; 東京化学同人

著者紹介

山本 佳宏

- ・ 1965年 福井に生まれる。
- ・ 1991年 京都府立大学大学院農学研究科修了。
- ・ 1994年 京都市工業試験場・応用化学部・微生物応用研究室勤務。

趣味: 大阪日本橋でのジャンク屋めぐり。ノートパソコンの再生。

特技: Z80マシン言語からSun SPARCアセンブラまで、全ての言語を操る
マルチリンガー(しゃべるのは日本語のみ)

著者

山本 佳宏
廣岡 青央
筒井 延男

(京都市工業試験場)

編集

三浦 研二
洞 尚文
長島 真喜子

(富士写真フイルム)

1998年 6月発行

中小企業庁地域技術活性化事業補助金・地域産学官交流促進事業
SYPRO は、Molecular Probes社の登録商標です。

 FUJIFILM

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)3406-215

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