FUJIFILM

Application Note

SCIENCE IMAGING SYSTEMS

Application Note No.21

応用編：蛍光プローブを用いたゲルシフト法

はじめに

現在、遺伝子の発現解析の研究にはますます注目が集まっています。
発現解析の手法のひとつにゲルシフト法があります。この手法は、特定の塩基配列に結合するタンパク質とDNAの複合体を検出します。検出方法としては、今までRIを用いて行われているのがほとんどでした。RI法から蛍光法への切り替えの試みはされてきましたが、蛍光法は、感度が低い、バンドがぼけてしまうなどの理由によりなかなか実用化には壁がありました。

今回、蛍光を用いたゲルシフト法を検出することができたというご報告を千葉大学 園芸学部 生物資源利用学研究室より頂き、ご執筆をお願い致しました。

Contents

1.Introduction
2.実験手順
3.結果
4.参考文献

Summary

- RIを用いないため通常の研究室でゲルシフト解析が行える。
- 操作がRI使用時に比べ簡便であり、安全性に優れている。

1 Introduction

遺伝子の発現調節は遺伝子の制御領域に存在する特徴的な遺伝子配列（シス配列）に、ある種のタンパク質（トランス因子）が相互作用することで行なわれる。転写調節因子の研究ではどのようなトランス因子がどのようなシス配列に結合するかが時々問題となり、ゲルシフト法は転写調節のシス配列とトランス因子の結合能を*in vitro*で解析する簡便な手法としてこの分野で頻繁に用いられる。ゲルシフト法の原理は、対象とする遺伝子配列を含むオリゴヌクレオチドを標識し、予め調製した核タンパク質と一定時間反応後、非変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行うと、対象とした配列に結合するタンパク質が存在する場合その泳動移動距離がタンパク質の結合していない配列より短くなるものである（Fig.1-1）。従来この方法にはオリゴヌクレオチドの標識に放射性化合物（[γ-^{32}P]ATPや[α-^{32}P]dNTP等）が用いられていたが、放射性物質の人体に与える危険性や取り扱い場所の制約、廃棄物処理の問題などの点から避けられる傾向にある。我々もまた、植物の硝酸還元酵素遺伝子の転写調節に関する研究のなかでゲルシフト法を多用しているが、核酸の蛍光標識試薬と富士写真フイルム株式会社製の蛍光検出機との組み合わせにより放射性物質を使用しないゲルシフト解析を行っている。この方法は上記理由のほか、放射性物質を扱う時の煩雑な手間も解消されるうえ、蛍光標識オリゴヌクレオチドの長期保存（数ヶ月）が可能であるという利点も兼ね備えるためここに紹介させていただく。

シス配列
遺伝子のプロモーター活性を規定するDNAの塩基配列

トランス因子
シス配列に作用し、転写を調節するDNA結合タンパク質

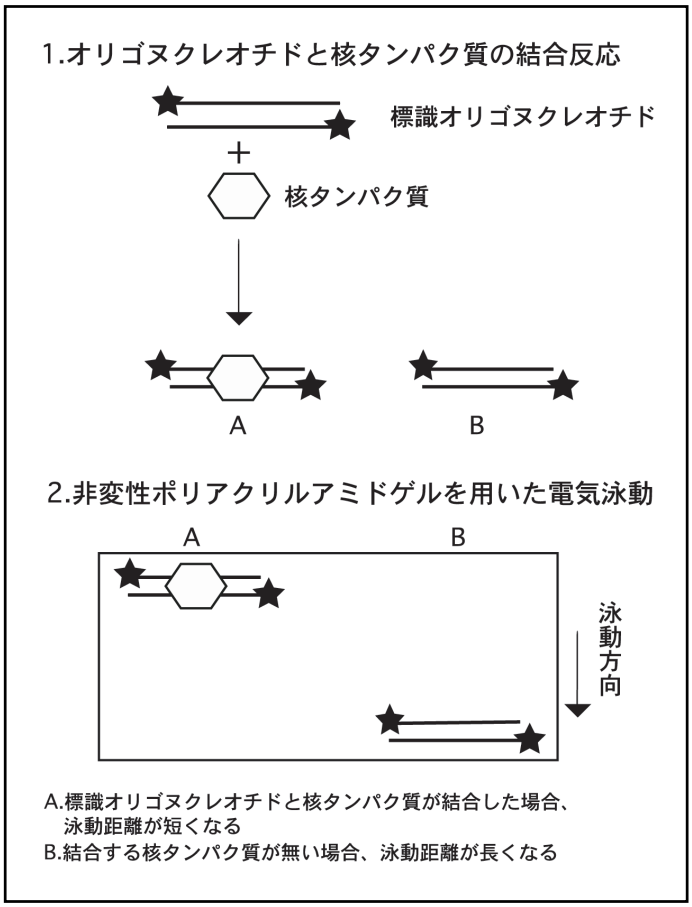

Fig.1-1

Fig.1-1 ゲルシフト法の概念図

2 実験手順

■ 核タンパク質の調製

ホウレンソウ培養細胞より核タンパク質を調製した。[1)]

■ 蛍光標識プローブの作製

相補する合成オリゴヌクレオチド(20μM)は、50mM NaClの存在下、70℃で5分間加熱後30分かけて25℃にすることでアニーリングさせた。次に5′-Oligolabelling Kit for Fluorescence[*1] (Amersham Pharmacia Biotech社)を用いて、説明書どおり5′末端の蛍光標識を行い、未反応蛍光物質の除去にはMicroSpin™G-25 Column (Amersham Pharmacia Biotech社)を用いた。得られた蛍光標識オリゴヌクレオチドはゲルシフト法で蛍光プローブとして用いた。

[*1]本キットに含まれている蛍光ラベル試薬は5-ヨードアセトアミドフルオレセインである。

■ ゲルシフト法

核タンパク質とオリゴヌクレオチドの結合反応

核タンパク質と、プローブを以下の条件にて反応させる。

	保存液の濃度	保存液の組成[2)]	
1 x Binding Buffer	4×	80mM HEPES-KOH (pH7.9), 200mM KCl,20mM DTT, 0.8mM EDTA (pH8.0),2mM PMSF, 40%(v/v)glycerol	5.5μl
Poly(dI-dC)	1mg/ml		2 μl
蛍光プローブ			1~2 μl
核タンパク質			5 μl
DW			7.5~8.5 μl
			22 μl

室温で30分間反応後、色素液(BPB, XC)を含まない[*2]20×GS Dye(5%(v/v) glycerol, 0.05M EDTA,BPB, XC)を3μl加える。

電気泳動

(1) 以下の組成で4.5%非変性ポリアクリルアミドゲルを作製する。

	保存液の濃度	保存液の組成[2)]	
4.5% (w/v)Acrylamide	30%(w/v)		1.5 ml
1×TGE Buffer	5×(pH8.5)	500mM Tris-HCl,2M Glycine, 10mM EDTA	2 ml
3%(v/v) Glycerol	50%(v/v)		0.6 ml
0.1%(w/v)APS	10%(w/v)		100 μl
TEMED			5 μl
DW			5.8 ml
			ca. 10 ml

HEPES
N-2-hydroxyethylpiperazine-N′-2-ethanesulfonic acid
DTT
Dithiothreitol
EDTA
Ethylenediaminetetraacetic acid
PMSF
Phenylmethylsulfonyl fluoride
DW
Distilled water
BPB
Bromophenol blue
XC
Xylene cyanole FF

[*2]検出時に色素のシグナルが検出させてしまうため、目的試料の展開には色素を加えない。

APS
Ammonium persulfate
TEMED
N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine

(2) 電気泳動装置を設置後、電気泳動用緩衝液には1×TGE Buffer(pH8.5)を用い、100Vで10分間プレランを行う。電源停止後ウェルを電気泳動緩衝液で洗浄し、ここに(1)で得た試料をアプライする。この際、端の空きレーンに色素（BPBあるいはXC）入り試料を同時に展開すると泳動時間の目安となる。低温条件下（4℃）で、15mA、45分間電気泳動する。
(100mm×105mmの大きさのゲル板使用時。目安としてはBPB色素がゲル板の真中あたりまで泳動されたら反応をとめる。)

シグナルの検出

電気泳動装置からゲル板をはずし、ゲル板のガラス面の汚れを取り除く。次に、ゲルはゲル板に挟んだまま蛍光を検出する。

3 結果

1μl (20ng相当)の蛍光プローブで充分検出が可能であった。蛍光プローブの量(1μlおよび2μl)に関係なく同様の泳動パターンが得られた。シフトしたバンドのシグナル強度は用いたプローブの量に依存した。

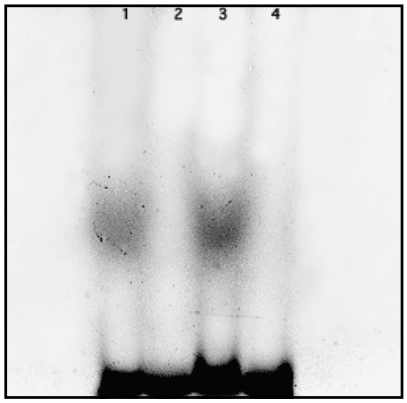

Fig.3-1

Fig.3-1 NR遺伝子5 上流域配列のゲルシフト解析。ホウレンソウ培養細胞より抽出した核タンパク質を使用した。

レーン1. 核タンパク質を含む。
:プローブ1μl
レーン2. 核タンパク質を含まない。
:プローブ1μl
レーン3.核タンパク質を含む。
:プローブ2μl
レーン4.核タンパク質を含まない
:プローブ2μl
使用したNR遺伝子5 '上流域の配列
5 '-TTAAACAAGTCATTCACC-A-3 '

4 参考文献

1) Hattori M., Tugores A., Veloz L., Karin M. and Brenner DA., A simplified method for the preparation of transcriptionally active liver nuclear extracts, *DNA Cell Biol.*,**9**,777-781 (1990).
2) Liu Z., Thompson K.S., and Towle H.C., Carbohydrate regulation of the Rat L-type pyruvate kinase gene requires two nuclear factors, LF-A1 and a member of the c-myc family, *J. Biol. Chem.*, 268,12787-12795(1993).

著者
園田　雅俊
山本　浩之
(千葉大学園芸学部)
白石　斉聖
(神戸大学農学部)
編集
三浦　研二
長島　眞喜子
石井　幸
(富士写真フイルム)

2001年12月発行
2004年8月改訂2版第1刷発行

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■イメージング＆インフォメーション事業本部　ライフサイエンスグループ
〒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
ホームページ : http://fujifilm.co.jp/bio

© 2004 Fuji Photo Film Co., Ltd.

イン営LS-04・8(F1079)・1-2(F1079)