

Saturation Labelling Dyesによるマウス海馬のLaser Capture Micro-Dissection (LCM / LMD) 微量サンプル (5 µg) の検出

Ettn DIGE システムを用いてレーザーマイクロダイセクション (LCM : Laser Capture Microdissection) により得られた組織切片のように微量なサンプルのタンパク質発現差異解析を行いました。このような多量に入手することが困難なサンプルには 5 µg のサンプルから標識可能な Saturation Labelling Dyes が最適です。

サンプルとしてマウス海馬【野生型 : W および APP (Amyloid Precursor Protein) 遺伝子のトランスジェニック : T】を LCM により単離し抽出したタンパク質を使用しました。本技法の特徴を最大限に生かすため、内部標準サンプル (W および T の等量混合サンプル) を各グルで電気泳動しました (右表の実験デザインを参照)。

● W と T との差異を検証するための実験デザイン

Gel 番号	Cy3	Cy5
1~9	内部標準 (W + T)	W
10~18	内部標準 (W + T)	T



AS LMD
(ライカ マイクロシステムズ株式会社)



(A)

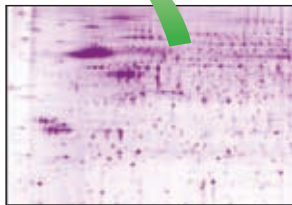


(B)

マウス海馬領域の LCM 前 (A) および後 (B)

Ettn DIGE システム専用ソフトウェア DeCyder 2D での解析の結果

p < 0.0005 において、APP トランスジェニックマウスにて 61 スポットが 10% 以上の増加、67 スポットが 10% 以下の減少を示す有意差を示しました。これらのスポットを Ettn Spot Picker にて切り出し、トリプシンによる酵素消化後、Ettn MALDI-ToF MS にて PMF (Peptide massfingerprinting) 解析によりタンパク質の同定を行いました。



4,500~5,000 スポット検出

● 質量分析により同定されたスポット

タンパク質 ID	機能	変動	t-test
3356	Metabolism	1.31	2.7×10^{-5}
2947	Apoptosis-related	1.37	4.5×10^{-8}
3504	Oxidative stress	1.26	2.9×10^{-5}
3526	Oxidative stress	1.27	1.9×10^{-5}
999	Protein metabolism	-1.15	5.0×10^{-5}
3370	Synaptic activity	1.25	3.9×10^{-4}
3804	Synaptic activity	1.16	2.5×10^{-4}
1476	Cytoskeletal	-1.39	1.6×10^{-5}
1492	Cytoskeletal	-1.49	4.5×10^{-7}
1347	Synaptic activity	-1.44	2.7×10^{-4}