

Sample preparation of human lymphoma cell line U937 using 2-D Fractionation Kit prior to Ettan DIGE system analysis

Ettan DIGEシステムにおける2-D Fractionation Kitの有効性

2-D Fractionation Kitは二次元電気泳動のためのサンプル調製用の試薬で、クルードなタンパク質サンプルを7つのフラクションに分画することができます。泳動前のタンパク質を分画することで、低発現タンパク質がより鮮明に検出できるようになります。本報ではヒトリンパ腫細胞株U937を材料とし、2-D Fractionation Kitの効果をSDS-PAGEおよび二次元電気泳動で検証しました。キットにより分画したサンプルをSDS-PAGEで泳動したところ、各フラクションのタンパク質のプロファイル(組成)が異なることが分かりました。また、同キットで分画したサンプルをCyDye DIGE Fluorsで蛍光標識しEttan DIGEシステムを用いて解析した結果から、2-D Fractionation Kitは2D DIGE解析においても有効なツールであることが分かりました。

はじめに

従来の二次元電気泳動では細胞中の全タンパク質を一枚のゲルで泳動します。しかし、細胞中のタンパク質には濃度差があるため、発現量の少ないタンパク質は発現量の多いタンパク質の影響を受け検出が難しいとされています。この問題を解決するため、電気泳動前にタンパク質サンプルを分画し、各フラクションを別々のゲルで泳動することで発現量の少ないタンパク質を検出する手法が考え出されました。分画することにより、各フラクション中のタンパク質の種類を減らすことができます。ゲルに添加するタンパク質の総量は同じで、タンパク質の数が減るため、1スポットあたりのタンパク質量が増加します。その結果、発現量の少ないタンパク質を検出できる確率が高くなります。また、スポットの重複が少ないタンパク質マップが作成できるため、ゲルイメージが単純化され、解析しやすくなります。

2-D Fractionation Kit

2-D Fractionation Kitは、タンパク質溶液のイオン強度、pHおよび温度などの条件の違いによって、沈殿するタンパク質群が変化するという性質を利用しています。このキットでは細胞や組織中のタンパク質を7つのフラクションに分けることができます。それぞれのフラクションには異なるタンパク質が含まれます(図1)。また、Fraction Precipitantの量を変更(カスタマイズ)したり、フラクションの数を少なくしたりすることで、含まれるタンパク質のプロファイルを変えることも可能です。

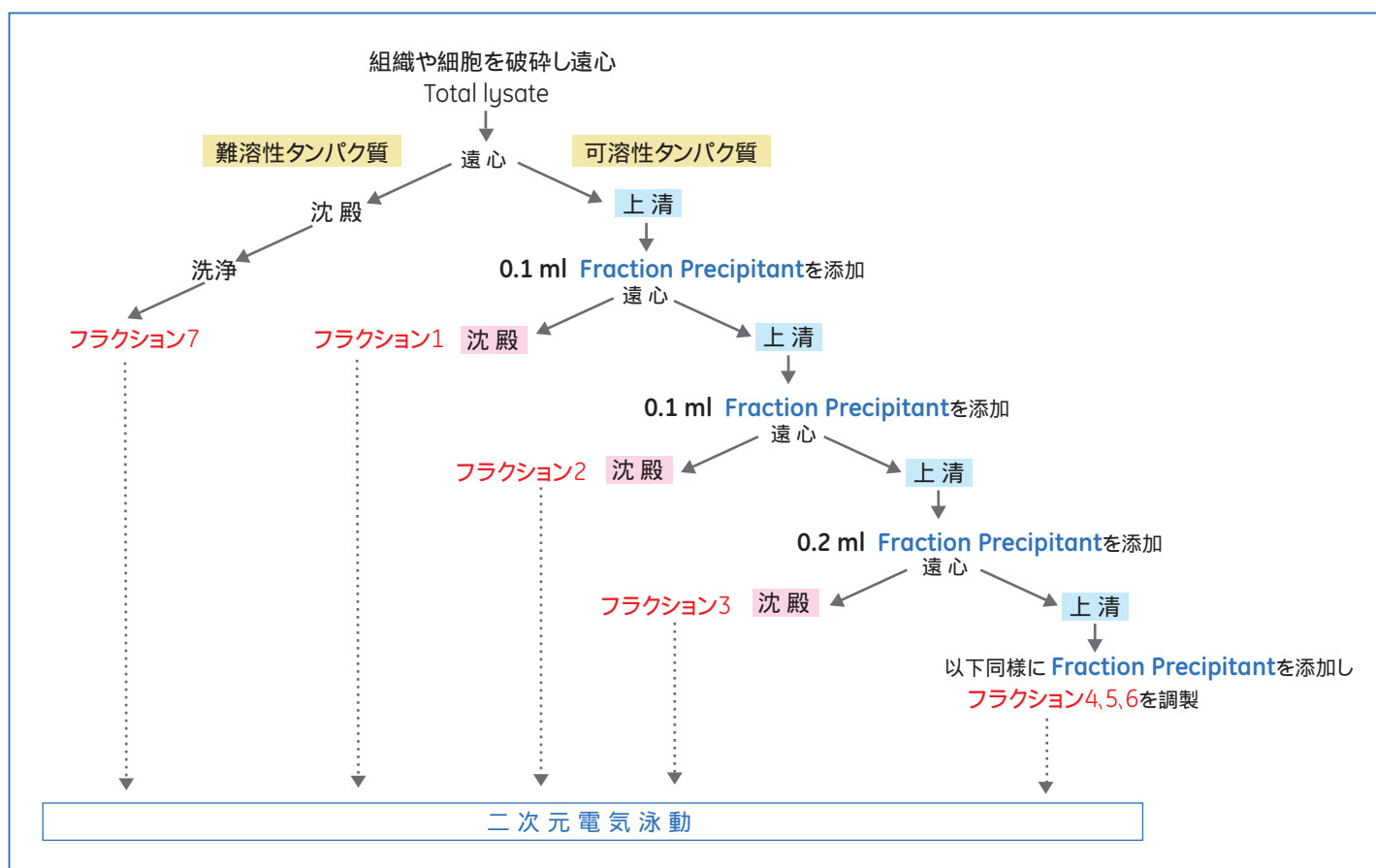


図1. 2-D Fractionation Kitを用いた分画操作の流れ

各フラクション中のタンパク質プロファイルの検証

キットを用いて、50 mgの細胞から抽出したタンパク質サンプルを分画しました。各フラクションのタンパク質 15 µgをSE 600 Ruby電気泳動システムで12 %ゲルを用いてSDS-PAGEにより分離しました。泳動後のゲルはSYPRO Ruby(Invitrogen)で染色しました。その結果、タンパク質のプロファイルはそれぞれのフラクションごとに大きく異なることが判明しました(図2)。

2D DIGE 解析を用いたキットの有効性の確認

U937細胞のタンパク質を2-D Fractionation Kitで処理して得られた各フラクションのうち50 µgをCyDye DIGE Fluor minimal dyesで標識しました。標識サンプルをImmobiline DryStrip pH 3-10 NL, 24 cmに添加し、Multiphor II電気泳動システムで一次元目の等電電

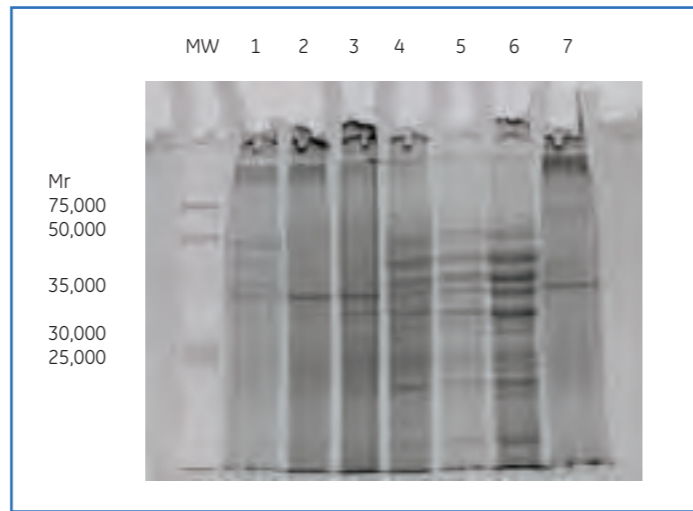


図2. 各フラクションのSDS-PAGEの結果
レーン1～7は2-D Fractionation Kitの標準プロトコールで調製したフラクション1～7を示します。MWは分子量マーカーを示します。Mr=分子量

a) 分画前サンプル



a) 分画前サンプル



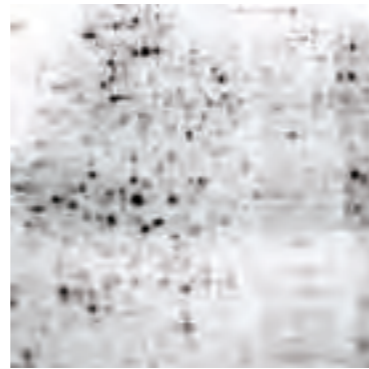
フラクション1



フラクション2



フラクション3



フラクション4



フラクション5



フラクション6



フラクション7

図3. 2-D Fractionation Kitによる処理効果

U937細胞から得られたタンパク質サンプルをEttan DIGEシステムを用いて分離しました。a)は分画前のサンプル、b)は分画後のフラクション1～7を示します。

気泳動を行いました。二次元目のSDS-PAGEは28×21 cmのゲルを用いてEttan DALT twelveシステムで行いました。ゲルイメージの検出にはバリアブルイメージアナライザー Typhoon 9410を、ゲルイメージの解析にはDeCyder 2D Softwareを用いました。

得られたゲルイメージを図3に示します。図3aはU937の全タンパク質を泳動した結果で、2,500以上のスポットが検出されました。図3bはキットによる処理で得られた各フラクションの泳動結果を示しています。泳動パターンは各フラクション間で大きく異なっており、タンパク質プロファイルの違いが反映されています。また、分画することでスポットの数が減少し、より解析しやすくなっていることがわかります。

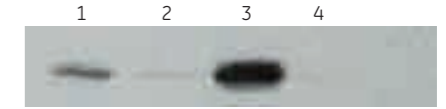
カスタマイズしたプロトコールの検証

2-D Fractionation Kitの特徴は必要に応じてフラクション数やFraction Precipitantの量を調節できることです。カスタマイズしたプロトコールで調製したサンプルの泳動結果を図4に示しました。標準プロトコールでは、フラクション1～4を得るためにそれぞれ0.1 ml、0.1 ml、0.2 ml、0.3 mlのFraction Precipitantを加えます(図1)。今回はFraction Precipitantの分量を0.15 ml、0.15 ml、0.3 ml、0.45 mlにして調製を行いました。標準プロトコールではチューブリンのほとんどがフラクション3に集中しているのに対し、カスタマイズしたプロトコールではフラクション1と2に分散させることができました(図4)。

まとめ

2-D Fractionation Kitは二次元電気泳動前のサンプル調製において新たな可能性を見出します。従来の二次元電気泳動では検出が難しかった膜タンパク質やシグナル伝達因子などの低発現のタンパク質の解析へ応用が期待されます。また、2D DIGE解析を併用することでより高精度、高感度な解析が可能となります。

a) 標準プロトコール



a) カスタマイズしたプロトコール

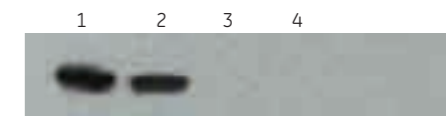


図4. カスタマイズしたプロトコールの効果

マウス肝細胞のタンパク質を2-D Fractionation Kitを用いて分画し、抗チューブリン抗体を用いてウェスタンブロッティングを行いました。レーン1～4はフラクション番号を示します。a)は標準プロトコールで、b)はカスタマイズしたプロトコールでそれぞれ調製したサンプルの結果です。