

免疫沈降と Agilent High Sensitivity Protein 250 アッセイ

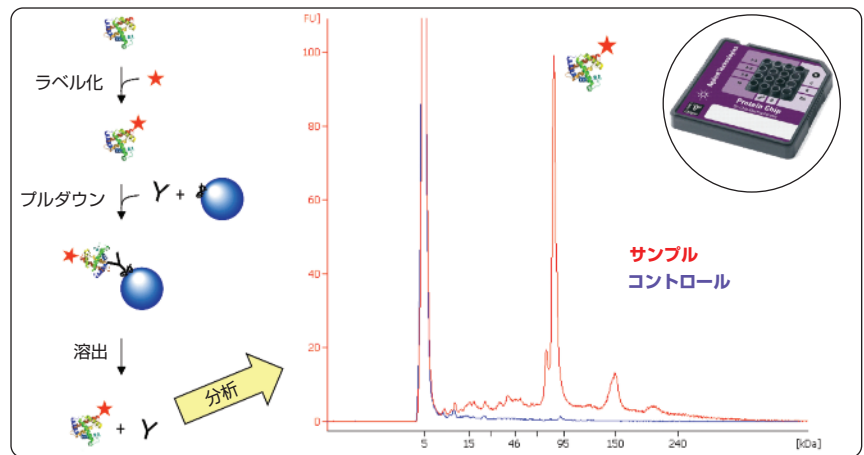
Agilent 2100 バイオアナライザによるタンパク質の特異的かつ高感度検出

アプリケーションノート

タンパク質電気泳動

著者

Christian Wenz and Andreas Rüfer
Agilent Technologies, Inc.
Hewlett-Packard Strasse 8
76337 Waldbronn
Germany



概要

タンパク質の標的解析のための新しいメソッドについて紹介します。このメソッドでは、免疫沈降の特異性と Agilent 2100 バイオアナライザの Agilent High Sensitivity Protein 250 アッセイによるタンパク質をマイクロチップ上で高感度に検出する方法を組み合わせたものです。このメソッドは、ウェスタンブロット法の代用として、たとえば、製薬分野、生物工学または専門研究機関でタンパク質の発現や精製に関与している研究に有用です。ウェスタンブロット法と比較すると、この新しいメソッドには以下の利点があります。

- より信頼できる結果: 高い特異性と感度
- 優れた精度: 手作業が少なく、定量データを直接取得可能
- 生産性の向上: 従来 1 日かかっていた分析時間を 3 時間に短縮
- 抗体にかかる費用の削減: 一次抗体は 10 分の 1、二次抗体は不要
- 試薬消費量が少ない: 環境に優しいプロセス



Agilent Technologies

はじめに

今日、免疫親和性は、複雑なサンプルに含まれるタンパク質を標的解析するための重要なツールとなっています。酵素結合抗体法 (ELISA) やウェスタンブロット法などの手法が、体液中のバイオマーカー候補の確認や組み換えタンパク質発現用のクローン選別などの幅広いアプリケーションで使用されています。Agilent 2100 バイオアナライザは、DNA、RNA、タンパク質および細胞などの様々な生物学的サンプルの特性解析が可能な多目的分析ツールです。¹しかし、現在のほとんどのアプリケーションでは、指定されたサイズレンジにあるすべての分析対象物を測定します。たとえば、Agilent Protein 80 アッセイは、5 から 80 kDa のすべてのサンプルタンパク質のサイズと量を測定します。本アプリケーションノートでは、Agilent High Sensitivity Protein 250 アッセイと、免疫沈降とを組み合わせた、Agilent 2100 バイオアナライザによるタンパク質の標的解析のアプリケーションについて説明します (IP/HSP250 メソッド、図 1)。Agilent High Sensitivity Protein 250 アッセイは、銀染色 SDS-PAGE より優れた感度と 4 桁のリニアダイナミックレンジでタンパク質のサイジングと定量を実現します。²図 1 に、IP/HSP250 メソッドのワークフローを示します。黄色のハイライト部分は、Agilent High Sensitivity Protein 250 アッセイによるサンプル調製とオンチップ分析のステップです。³これらのステップで必要な試薬、マイクロチップおよびプロトコルは、Agilent High Sensitivity Protein 250 キットと共に提供されます。サンプル調製後に、標的タンパク質特異的な抗体とProtein A 結合磁気ビーズを用いて免疫沈降を行いました。Agilent High Sensitivity Protein 250 キットで提供された、SDS と DTT を含むサンプル緩衝液中で熱変性することにより、ビーズが

ら免疫複合体の溶出を行いました。溶出したタンパク質は、マイクロチップ上のウェルに直接充填し、Agilent 2100 バイオアナライザで自動的に分析します。IP/HSP250 メソッドに要する総時間は、約 3 時間です。タンパク質検出用の銀またはクマシーで染色する SDS-PAGE による従来の免疫沈降法では、抗体や捕獲試薬などの分子ツールも染色されるため、バックグラウンドが問題になる場合があります。IP/HSP250 メソッドでは、最初のサンプル調製ステップで蛍光色素によりサンプルタンパク質をラベル化するので、このような問題は起こりません。免

疫沈降の後、レーザー励起蛍光検出により、これらのラベル化されたサンプルのみが検出されます。

IP/HSP250 メソッドの性能を、GST 標識タンパク質と GST 特異的な抗体を添加した大腸菌細胞溶解物サンプルを使用して示します。新しいメソッドとすでに確立している標的タンパク質検出方法との比較を行うために、同じサンプルと抗体を使用してウェスタンブロットも行いました。

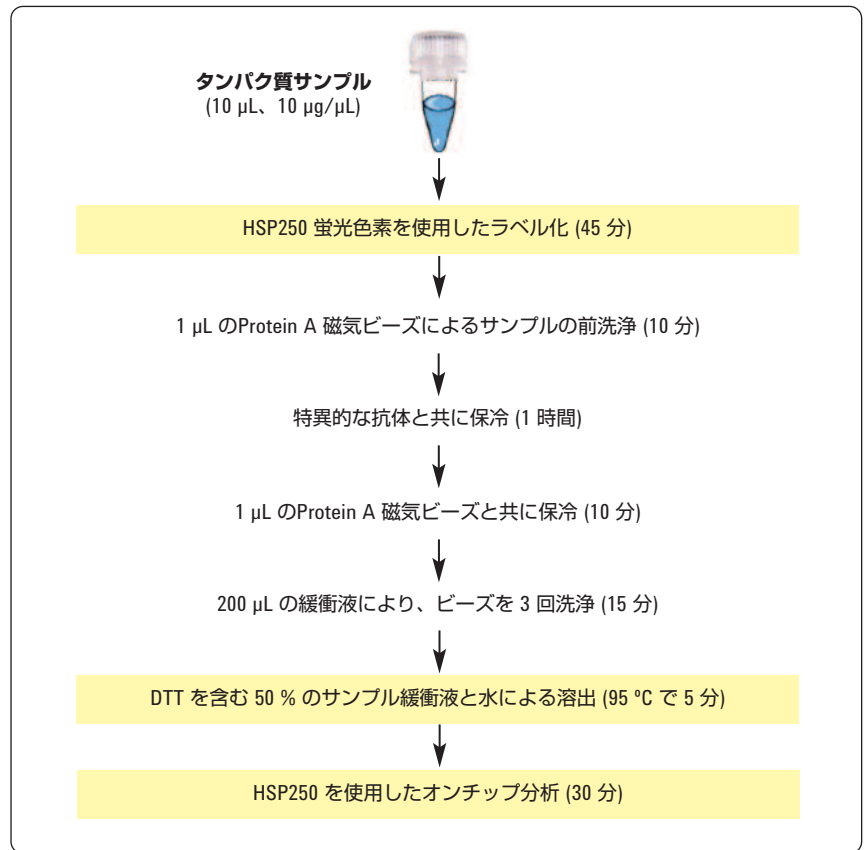


図 1 IP/HSP250 メソッドによる特定の標識されたタンパク質検出のためのワークフロー

実験

試薬

Dynabeads Protein A、DynaMag-2、XCell II Mini-Cell & Blot Module、成形済み 4 ~ 12 % BisTris ミニジェル、染色済み標準タンパク質溶液、PVDF 薄膜、SDS-PAGE およびウェスタンブロット用の緩衝液、WesternBreeze クロモジェニックウェスタンブロット検出キット (Invitrogen 社、米国カリフォルニア州カールズバッド)、Protein LoBind チューブ (Eppendorf GmbH 社、ドイツ Hamburg)、Zeba Desalt Spin Columns および Coomassie Plus Assay Reagent (Pierce 社、米国イリノイ州ロックフォード)、凍結乾燥大腸菌株 B 細胞 (ATCC 11303)、抗 GST ウサギポリクローナル抗体 (Sigma 社、ドイツ Taufkirchen)、GST 標識ホスファターゼテンシンホモログ (PTEN)、Agilent 2100 バイオアナライザおよび Agilent High Sensitivity Protein 250 キット (Agilent Technologies GmbH 社、ドイツ Waldbronn)。

サンプル調製

GST 標識 PTEN は、50 mM Tris/HCl pH 7.5、50 mM NaCl、1 mM EDTA および 5 mM DTT 中の 1 mg/mL 溶液として提供されました。凍結乾燥された大腸菌細胞は、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8、300 mM NaCl 中で再懸濁し、BeadBeater (Biospec Products 社、米国オクラホマ州パートルズビル) で破碎しました。12,000 g で 10 分間遠心分離して、細胞片を除去しました。2 mL の Zeba Desalt Spin Columns を使用して、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.3、300 mM NaCl への緩衝液交換を行いました。

細胞溶解物の総タンパク質濃度は、Coomassie Plus Assay Reagent を使用して測定しました。

濃度 10 µg/µL の大腸菌抽出物に 1 % の GST 標識 PTEN (100 ng/µL の標的タンパク質に相当) を添加しました。大腸菌溶解物を含むこの 1 % 混合物から連続 10 倍希釈溶液を準備し、それぞれ、0.1 % (10 ng/µL)、0.01 % (1 ng/µL)、0.001 % (100 pg/µL) および 0.0001 % (10 pg/µL) の GST 標識タンパク質を調製しました。標的タンパク質のコントロールサンプル (大腸菌溶解物を含まないもの) は、ラベル化緩衝液 (30 mM Tris/HCl、pH 8.5) で 100 ng/µL に希釈しました。

タンパク質のラベル化

タンパク質のラベル化は、Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide に記載されているとおり実施しました。³

免疫沈降

免疫沈降は、Protein LoBind チューブ内で、10 µL のラベル化されたサンプルを使用して行いました。最終濃度が 0.1 % になるように、サンプルに Tween 20 を加えました。

はじめに、バックグラウンドを減らすために、Protein A ビーズでサンプルの前洗浄を行いました。1 µL の Protein A 磁気ビーズ溶液を 100 µL の洗浄緩衝液 (50 mM リン酸ナトリウム、pH 8、300 mM NaCl、0.1 % Tween 20) で 2 回洗浄しました。洗浄後、ビーズをサンプルに加え、10 分間氷上に置きました。チューブを 2 ~ 3 分ごとに攪拌し、ビーズ溶液の懸濁状態を保ちました。10 分後、処理済みの上澄み液を収集し、ビーズを排出しました。

2 番目に、サンプルをタグ特異的な抗体と共に保冷しました。抗 GST 抗体を洗浄緩衝液で 100 対 1 に希釈しました。1 µL の抗体希釈液をサンプルに加え、混合物質を 1 時間氷上に置きました。

次に、免疫複合体を Protein A ビーズで捕獲しました。1 µL の Protein A ビーズを洗浄緩衝液で 2 回洗浄した後、サンプルに加えしました。2 ~ 3 分ごとに攪拌しながら、10 分間氷上に置いた後、上澄み液を取り除きました。ビーズを 200 µL の洗浄緩衝液で 3 回洗浄しました。最後の洗浄ステップでは、残りの液体を完全に除去し、塩類のキャリーオーバーがないように注意しました。

最後に、捕獲したタンパク質をビーズから溶出しました。10 µL の水と 5 µL の Agilent High Sensitivity Protein 250 サンプル緩衝液 (DTT を含む) に、ビーズを再懸濁し、すべての結合タンパク質を溶出しました。95 °C で 5 分間熱した後、サンプルを 30 秒間遠心分離し、(希釈せずに) マイクロチップ分析に直接用いました。

オンチップ分析

オンチップサンプル分析は、Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide の記載どおり行いました。標準的な手順に従って、Agilent High Sensitivity Protein 250 ラダーをラベル化し分析しました。

ウェスタンブロット

サブライヤの説明書に従って、4 % から 12 % の BisTris ミニジェルを使用して SDS-PAGE を行いました。ウェスタン転写は、PVDF 薄膜上に行いました。最後に、BCIT/NBT 基質およびアルカリフォスファターゼと結合した抗ウサギ二次抗体を使用して、クロモジェニック免疫検出を行いました。抗 GST 一次抗体は 2000:1 に希釈しました。

結果と考察

異なる量のGST 標識ホスファターゼテンシンホモログ (PTEN) を添加した大腸菌溶解物を用いて、IP/HSP250 メソッドの感度と特異性を調べました。サンプルを蛍光色素でラベル化し、Agilent High Sensitivity Protein 250 アッセイを使用して、それぞれ分析しました。サンプル間に違いは観察されませんでした (図 2A)。そのあと、抗 GST ウサギポリクローナル抗体と Protein A 磁気ビーズを使用して、サンプルを免疫沈降させました。ビーズから溶出した免疫複合体をマイクロチップに直接充填し、Agilent 2100 バイオアナライザで分析しました。ネガティブコントロールの泳動結果を差し引いた後のPTEN の LOD (S/N > 3) は、10 µg/µL の大腸菌溶解物のバックグラウンド中で 0.001 % または 100 pg/µL でした (図 2B)。Agilent 2100 バイオアナライザの定量結果から、大腸菌溶解物からの PTEN 標的タンパク質の回収率は約 15 % と評価できました。IP/HSP250 の実験で低いバックグラウンドが観察されるのは、前洗浄のステップが影響しています (図 1)。そのため、特に低濃度の標的タンパク質に対して、サンプルの前洗浄を行うことは検出限界をさらに改善するのに有効です (データは示さず)。免疫沈降したサンプルのエレクトロフェログラムは、標的タンパク質コントロールのものと非常によく似ており、これは、免疫沈降中に分解や凝集が生じていないことを表します (図 2)。

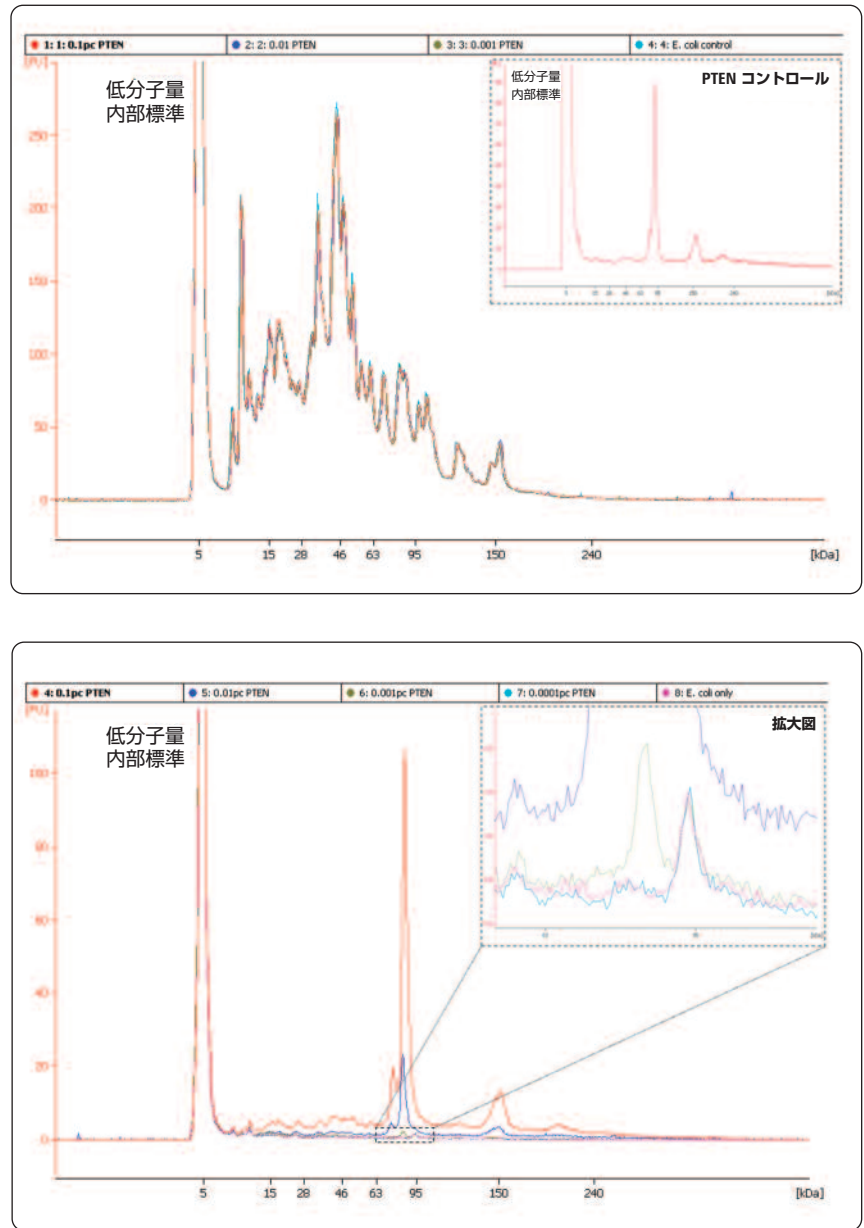


図 2
GST 標識 PTEN を添加した大腸菌溶解物の IP/HSP250。 (A) ラベル化ステップ後のサンプル分析。0.1 % (赤)、0.01 % (青)、0.001 % (緑) のサンプルと PTEN を含まないネガティブコントロール (明るい青) のエレクトロフェログラムを重ね書きしています。挿入図は、Agilent High Sensitivity Protein 250 アッセイを使用した PTEN のみの分析結果を示しています (PTEN コントロール)。(B) 免疫沈降後のサンプルの分析。0.1 % (赤)、0.01 % (青)、0.001 % (緑)、0.0001 % (明るい青) のサンプルと PTEN を含まないネガティブコントロール (マゼンタ) のエレクトロフェログラムを重ね書きしています。挿入図は、0.001 % サンプルの PTEN メインピークを拡大表示したものです (拡大図)。

比較のためにウェスタンブロットを行いました。IP/HSP250 メソッドの場合と同じサンプルとタグ特異的な抗体を使用しました (図 3)。PTEN に対するブロットの結果は、すべてのレーンで非特異的なバックグラウンドが高いことが示されました。おそらくこれは、使用した抗ウサギ二次抗体に要因があると考えられます。10 µg/µL の大腸菌タンパク質のバックグラウンド中で 1 % または 100 ng/µL の濃度の PTEN でのみ、特異的なバンドが観察されました (図 3 の左側のパネル)。従って、IP/HSP250 メソッドは、ウェスタンブロットと比較して高い感度と特異性を示し、標的タンパク質 PTEN の検出下限は1,000 分の 1 でした。抗体の品質が原因で結果が損なわれるリスクは、単一の抗体のみを使用する IP/HSP250 メソッドのほうが明らかに低くなります。さらに、IP/HSP250 メソッドでは、一次抗体の使用量がウェスタンブロット法の 10 分の 1 以下であり、二次抗体は使用しないので、抗体にかかるコストを削減できます。さらに他の利点として、IP/HSP250 メソッドはウェスタンブロット法に対して、短時間で結果が得られ (3 時間対 1 日)、手作業が少なく済み、Agilent 2100 バイオアナライザの分析結果から定量値を直接取得できることです。

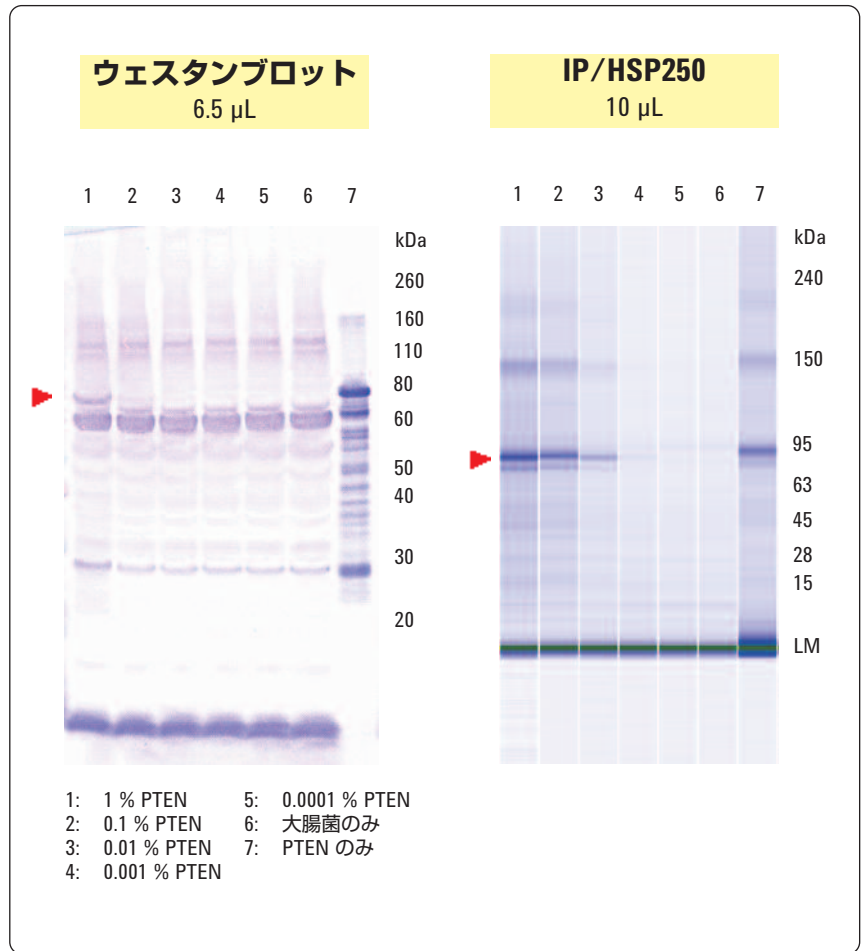


図 3
GST 標識 PTEN を添加した大腸菌溶解物サンプルについてクロモジェニック免疫複合体検出によるウェスタンブロット法と IP/HSP250 メソッドの比較。サンプル容量は、IP/HSP250 では 10 µL に対し、ウェスタンブロット法では 6.5 µL です。ウェスタンブロット (左) と Agilent High Sensitivity Protein 250 アッセイのゲル表示 (右) を示しています。PTEN バンドを赤い矢印で示しています。標準タンパク質の分子量を表示しています (LM は低分子量内部標準)。

結論

標的タンパク質検出のための新しい IP/HSP250 メソッドは、クロモジェニック免疫複合体検出を使用する従来のウェスタンブロット法に比べて、特異性、感度、使いやすさ、結果を得るまでの時間の点で優れた結果を示しました。このメソッドは、免疫沈降の特異性と Agilent 2100 バイオアナライザを使用したマイクロチップ型電気泳動によるタンパク質の高感度検出を組み合わせています。

参考文献

1.
www.agilent.com/chem/labonachip
2.
Performance characteristics of the High sensitivity Protein 250 assay for the Agilent 2100 Bioanalyzer, Technical Note, 5989-8940EN, Agilent Technologies.
3.
Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide, Agilent Technologies Manual, reference number G2938-90310.

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published June 1, 2009
Publication Number 5990-4097JAJP



Agilent Technologies