

2. 2-D Electrophoresis

2-1

二次元電気泳動のご依頼について

タンパク質の抽出 ※分解のリスクを避けるため、お客様側での調製をおすすめします

当社よりタンパク質抽出用の溶解溶液と抽出プロトコルをお送りしますので、サンプルの調製にご利用ください。当社にタンパク質抽出をお任せ頂く場合は、作業内容に応じて料金が設定されておりますのでお問い合わせ頂けますようお願いいたします。

総タンパク質： 1 mg以上を推奨
サンプル濃度： 1~5 mg/mL
塩濃度： 10 mM以下※

※感染性が疑われるサンプルの受け入れは、ウイルスチェックを行って頂いた後になります。詳しくはお問合せください。

※イオン濃度が高いとスポットのフォーカスが悪くなります。サンプル溶液の塩濃度は、10 mM以下(NaCl換算)でご調製ください。

二次元電気泳動の仕様

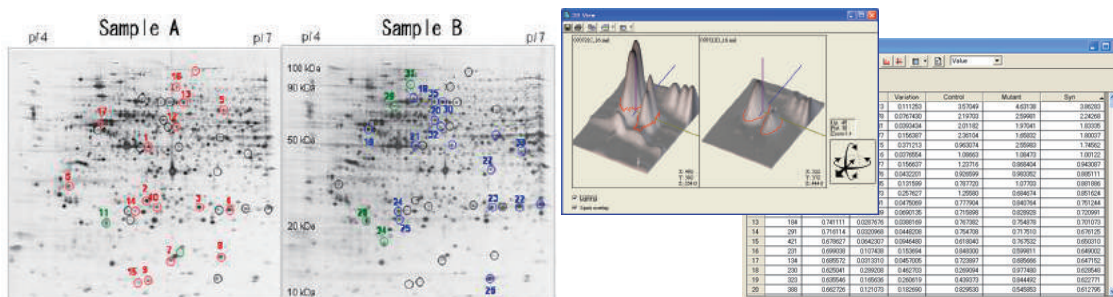
お預かりしたサンプルは、最初にタンパク質量と電気伝導度測定を行います。タンパク質量が泳動の必要量に満たない場合はご連絡いたします。また、電気伝導度が高く、泳動を阻害する塩の混入が疑われる場合は、限外ろ過または有機溶媒沈殿による脱塩濃縮をご提案させていただきます。

ゲルサイズ： 18×20 cm(標準), 24×20 cm(大型), 9×8 cm(ミニゲル)
等電点領域： 4-7, 3-10, 6-9, 6-11 ほか
分子量の分離レンジ： 10-200 kDaまで
アプライ量： 100-200 μg (18×20 cmゲルの場合)
染色： SYPRO Ruby, Pro-Q Diamond, 銀, CBB など

※等電点領域は、分離能と展開幅のバランスが良いpI 4-7と、広い領域をカバーするpI 3-10をおすすめしております。

二次元電気泳動像の比較解析と報告書の返却

取得した二次元電気泳動像の比較解析を行います。大型ゲルによる高分解能の二次元電気泳動像を解析する場合、サンプル間のスポットの比較を目視で行うには限界があります。膨大なスポット情報から有用な情報を引き出すため、画像解析ソフトウェアによる定量解析を行います。刺激の有無や経時変化に対応したスポットの出現・消失・増加・減少の情報を高い精度で得ることで、信頼性の高い解析結果をご提供いたします。報告書は、閾値を超える濃度変化が起こったスポットに印を付けた分かりやすい体裁で納品いたします。報告書末尾には濃度差が大きいスポットを順に並べた同定候補リストを記載し、お客様とのディスカッションののちに質量分析のステージに進みます。



接着性培養細胞

1. 装置と器具

セルスクレイパー

2. 試薬

◆ タンパク質溶解溶液 (Lysis Buffer)

- ・ 6 M 尿素
- ・ 2 M チオ尿素
- ・ 2% CHAPS
- ・ 1% Triton X-100
- ・ 1% DTT

*分注して冷凍保存(短期では-20℃、長期では-80℃)

◆ PBS(-)

※ヒト皮膚由来のケラチンの混入を防ぐため、実験操作の際には清浄な手袋をご着用ください。

3. 方法 (直径10 cmシャーレの場合)

1. 培養細胞の培地をアスピレーションで除き、PBS(-)10 mLをすばやく入れます。通常は氷冷PBS(-)が推奨されますが、温度は実験の目的にあわせてご検討ください。PBS(-)を入れるときは、細胞がはがれないように注意しながらシャーレの側面から入れてください。はがれやすい細胞の場合にはPBS(+))のご利用をご検討ください。
2. 手で軽くゆらしながら、まんべんなく細胞表面を洗い、PBS(-)を捨ててください。この操作を3~5回繰り返します。残ったPBS(-)はシャーレを傾け、アスピレーターもしくはピペットを使って完全に除去します。PBS(-)は塩を含むので、なるべく残らないように気をつけてください。
3. シャーレ1枚につきタンパク質溶解溶液0.5 mL加え、セルスクレイパーでかき混ぜて細胞を溶解します。
4. 複数枚のシャーレを調製する場合は、まず枚数分のタンパク質溶解溶液を最初のシャーレに加えます。2枚目のシャーレの細胞を洗浄後、最初のシャーレに加えたタンパク質溶解溶液を2枚目に移していきます。
5. チューブに回収後、遠心して不溶物を除去します(遠心20,000 x g、30分、20℃)。
6. 遠心後の上清をサンプルとし、ペレットを加えないように注意して新しいチューブに移します。冷凍保存(短期では-20℃、長期保存では-80℃)のうえ、冷凍の宅配便で当社へご送付ください。

※目安として、10⁶個のヒト真皮由来正常繊維芽細胞から、約0.5 mgのタンパク質が得られます。

参考文献
Rabilloud, T., Electrophoresis, 18, 307 (1997)

動物組織

1. 試薬

- ◆ タンパク質溶解溶液 (Lysis Buffer)
左項参照

※ヒト皮膚由来のケラチンの混入を防ぐため、実験操作の際には清浄な手袋をご着用ください。

2. 操作

1. 麻酔した動物から目的の臓器あるいは組織を採取します。
2. 必要であれば切除した臓器あるいは組織を氷冷PBS(-)で脱血します。タンパク質の分解を防ぐため手早く行うように注意してください。
3. 組織をはさみで切り刻み、PBS(-)で洗浄します。
4. 組織の重さ(A g)の5倍量のタンパク質溶解溶液 (5 x A mL)を加え、ホモジナイズします(当社ではポリトロンを使用)。ガラスホモジナイザーを使った場合には、組織の残渣が見られる場合があるので、残渣が見られた場合にはソニケーターで可溶化させます。
5. 可溶化後、20,000 x g、20℃で30分間遠心し、上清を取って電気泳動のサンプルとします。溶解液は高濃度の尿素/チオ尿素を含むため、4℃で遠心操作を行うと析出しますのでご注意ください。冷凍保存(短期では-20℃、長期保存では-80℃)のうえ、冷凍の宅配便で当社へご送付ください。

※組織によって異なりますが、動物由来の組織では概算で湿重量の約2-8%がタンパク質となります。

参考文献

1. 「図説 動物実験の手技手法」、緒方 規矩雄 監、1981 (共立出版、ISBN 4-320-05255-2)
2. Rabilloud, T., Electrophoresis, 18, 307 (1997)

液体培養細菌

細菌の種類や培地によって最適な抽出方法は異なります。一例をご紹介します。

1. 試薬

◆ タンパク質溶解溶液 (Lysis buffer) 前頁参照

◆ 10 mMリン酸バッファー (pH 7.4)

- Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.77 g
- NaH₂PO₄ 0.27 g
- MilliQ水で1,000 mLとする

※ヒト皮膚由来ケラチンの混入を防ぐため、実験操作の際には清浄な手袋をご着用ください。

2. 方法

- 培養液を8,000 rpm、10 min、4°Cで遠心分離を行い、菌体をペレットにします^{※1,2}。
- 上清を完全に除いた後、培養液の半量の10 mMリン酸バッファー (pH 7.4) を加えて菌体を再懸濁し、再び遠心分離でペレットにします。この操作を3回繰り返して洗浄を行います^{※3}。
- 上清を完全に除き、タンパク質溶解溶液 1 mLを加え、ピペティングまたはボルテックスで完全に懸濁して溶液を均一化させます。溶解液を20,000 x g、30 min、20°Cで遠心分離し、不溶性物質を沈殿させます^{※4}。
- 上清を回収して新しいチューブに移します。冷凍保存（短期では-20°C、長期保存では-80°C）のうえ、冷凍の宅配便で当社へご送付ください。

※1 集菌条件は、実験の目的にあわせてご検討ください。

※2 培養液量は下記資料(3.菌体数とサンプル量について)を参考にしてください。

※3 洗浄用バッファーの組成や温度は実験の目的にあわせてご検討ください。

※4 冷却すると尿素等が析出しますので、室温で遠心してください。

3. 菌体数とサンプル量について

二次元電気泳動に最低限必要な量は約100 μgですが、タンパク質定量やタンパク質同定分析、複数回の二次元電気泳動分析に備えるため、1 mg以上のタンパク質をご用意ください。

【1 mgのタンパク質の調製に必要な菌体数（大腸菌の場合）】

大腸菌細胞1個の体積：1×10⁻¹⁵ Liter,

細胞内タンパク質濃度：200~320 mg/mL

1 mg protein = 3.1 × 10⁹ ~ 5.0 × 10⁹ Cells^{※5}

※5 カナダ アルバータ大学 Project Cyber Cell, E. coli Statisticsより
http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/CCDB/cgi-bin/STAT_NEW.cgi

植物組織／植物細胞

植物の種類や組織によって最適な抽出方法は異なります。一例をご紹介します。

1. 試薬

◆ タンパク質溶解溶液 (Lysis buffer) 前頁参照

◆ 抽出Buffer

- 0.5 M Tris-HCl Stock 5.0 mL (50 mM)
- EDTA 18.6 mg (1 mM)
- 100 mM PMSF Stock 0.5 mL (1 mM)
- DTT 7.7 mg (1 mM)

→MilliQ 水で50 mLとする

◆ 0.5 M Tris-HCl Stock

- Tris base 3.03 g
- HClでpH 7.5に調製
- MilliQ水で50 mLとする

◆ 100 mM PMSF Stock

- PMSF 0.17 g
- メタノール 10 mLに溶解する

※ヒト皮膚由来のケラチンの混入を防ぐため、実験操作の際には清浄な手袋をご着用ください。

2. 操作

- 液体窒素を入れた乳鉢に試料組織(1~2 g)を入れ、凍結状態で粉状になるまで破碎します。この際、3% (w/v)になるようにPVP (Polyvinylpyrrolidone)を加えます。
- 試料が溶け始める前に、氷冷した抽出Buffer(試料重量に対し10倍量)を添加してよく混和します。
- 液状になったところでマイクロチューブ等に移し、20,000 x g、30 min、4°Cで遠心分離後、上清を回収します。
- 得られた上清を0.45 μmフィルターもしくはミラクロスに通してろ過し、混入した残渣等を完全に除去します。
- 上清を少量取ってタンパク質定量を行います。
- 泳動量ごとにチューブに分注し、等量の20% (v/v) TCAを加えて混和後、氷上で30分間静置します。
- 20,000 x g、30 min、4°Cで遠心分離後、上清を除去します。
- 得られた沈殿に冷アセトン1 mLを加え、軽くボルテックスした後20,000 x g、15 min、4°Cにて遠心します。この操作をもう一度繰り返します。
- アセトンを除去した後、タンパク質溶解溶液適量に溶解します。
- 冷凍保存(短期では-20°C、長期保存では-80°C)のうえ、冷凍の宅配便にて当社へご送付ください。

二次元電気泳動解析に関して、お客様から多く寄せられたご質問についてお答えいたします。

1. サンプルの量はどのくらい必要ですか？

二次元電気泳動の比較解析には、最低100 μ gのタンパク質が必要です。再現性の確認や、同定分析用のゲルを別に用意する場合に備えて、1 mg以上のサンプルをご用意ください。

2. サンプルの調製はどのようにするのですか？

当社からご送付するLysis bufferを用いてサンプルをご調製ください。培養細胞、組織、微生物からの抽出プロトコルをご用意しております。特殊なサンプルの場合はご相談ください。

3. サンプルの送付方法について教えてください。

冷凍の宅配便で平日18時までに弊社プロフェニックス事業部へ到着するようにお送りください。ドライアイスをご利用いただくことをおすすめいたします。分析依頼書をお送りしますので、サンプルに同封するかFAX、e-mail添付でご返送ください。

〒559-8519

大阪市住之江区南港北1-24-22

いであ株式会社 食品生命科学研究所

プロフェニックス事業部

電話:06-4703-2865 FAX:06-4703-2856

e-mail:proteome@ideacon.co.jp

4. サンプルの濃度はどのくらいが適当ですか？

サンプルのタンパク質濃度は1 mg/mL以上になるように調製してください。濃度が0.3 mg/mL 以下ですとサンプルを濃縮する必要があります。

5. どのpIレンジで泳動を行うべきでしょうか？

注目するpIレンジがない場合は、pI 4-7 かpI 3-10 をおすすめしております。pI 4-7 は泳動像の展開幅と再現性のバランスが良いレンジです。pI 3-10 はpI 4-7 に比べ分離能がやや劣りますが、酸性から塩基性まで幅広いスポット情報を得ることができます。

6. 二次元電気泳動像の定量的分析とは？

二次元電気泳動解析ソフトウェアによって電気泳動イメージからスポットを検出し、各スポット強度を数値化します。複数の泳動ゲルイメージを重ね合わせて各スポットのマッチングを行います。各スポット強度を表やグラフによって出力することができます。例えば、2倍以上の強度差を持つスポットなど、研究者の希望にそったスポット選出が可能です。

7. サンプルや泳動したゲルは保管できますか？

残ったサンプル溶液は -80°Cで保存します。銀染色やCBB染色後のゲルは乾燥させて、SYPRO Ruby染色のゲルはシールバックで保存します。保存期間は、泳動日より3ヶ月です。

8. 染色方法について教えてください。

二次元電気泳動の比較解析には、高感度かつダイナミックレンジが広く定量性が高いSYPRO Ruby染色で行います。タンパク質同定が目的の場合は、銀染色やCBB染色を行います。

9. リン酸化タンパク質の二次元電気泳動分析とは？

リン酸化タンパク質に結合する蛍光色素による染色(Pro-Q Diamond染色)を行います。リン酸基に対して色素が結合するため定量性はありませんが、定量性の高いSYPRO Rubyで二重染色することでサンプル間のリン酸化の程度を解析します。

10. 転写因子などの微量タンパク質は検出できますか？

SYPRO Ruby染色の検出限界は1 ng程度です。60 kDaのタンパク質を例にしますと、1 ngは 1.0×10^{10} 個のタンパク質分子に相当します。微量タンパク質が1細胞に 10^3 分子存在する場合は、 10^7 個の細胞(約5 mg protein)を分析する必要があります。この場合、1枚のゲルに泳動するのは難しいので、目的のタンパク質だけを部分精製するなどの処理が必要になります。

11. 異なる位置のスポットが同じタンパク質と同定されましたが、なぜですか？

リン酸化や糖鎖付加などの翻訳後修飾や、配列が異なるアイソフォームなど、同じタンパク質でも等電点と分子量が異なるvariantsが存在します。等電点方向に並んでいるスポットはリン酸化の修飾などが、斜めに並んでいるスポットは糖鎖付加が考えられます。大きく異なる位置に分解産物のスポットが観察されることもあります。

12. スポット濃度に変化があったタンパク質の遺伝子発現を調べると、遺伝子の転写量に変化がないのですが、なぜでしょうか？

二次元電気泳動におけるスポットの変化は、タンパク質の存在量の変化だけを示すものではありません。リン酸化などの翻訳後修飾や部分的切断によってタンパク質の等電点と分子量が変化し、結果的にスポットの座標や濃度の変化として観察されます。二次元電気泳動分析では、遺伝子解析では得られない情報にも着目されることをおすすめいたします。