

DIRECT BLOT 装置の開発

Development of a DIRECT BLOT System

矢部 公彦* 後藤 真一* 西村 宗徳* 緑川 宇一*

Kimihiko Yabe Shinichi Goto Munenori Nishimura Uichi Midorikawa

松永 貴輝* 木下 英樹*

Takateru Matsunaga Hideki Kinoshita

本論文では新製品自動電気泳動転写装置DIRECT BLOTを紹介する。本装置は電気泳動-転写プロセスを2時間以内で自動分析可能な理化学機器であり、分析再現性の点で優れた特長を示す。また、標的のタンパクを拡大し、解像度良く解析可能である。DIRECT BLOTは基礎研究分野でのタンパク分析技術としてだけでなく、今後、食品検査、バイオマーカーの探索、さらにバイオ医薬の開発においても有用なツールとして活用できる。

We developed an automated direct blotting system named "DIRECT BLOT" that completes the entire process of electrophoresis and electroblotting within 2 hours. We demonstrated that this system shows high reproducibility compared with the conventional semi-dry method. We also demonstrated that the "zoom feature" (expansion of protein spots) helps high-resolution analysis of target proteins. "DIRECT BLOT" would be a highly powerful Western blot analysis tool not only for basic research purposes, but also for industrial purposes including diagnostics, biomarker discovery and biomedicine development.

はじめに

ウェスタンブロット法はライフサイエンス分野、医療分野、食品分野において、タンパク質分析の基本技術として広く利用されている。ライフサイエンス分野においては、研究者の研究対象である特定タンパク質の発現解析の基本技術として定着しており、また医療分野においては感染症検査として、食品分野では食品アレルギーの原因タンパク質の検査法として利用されている^{1) 2) 3)}。

このように、既存のウェスタンブロット法は、目的のタンパク質を高感度かつ高精度に検出可能な優れた技術であるものの、作業工程の過程で、やわらかなゲルを手作業で取り扱う必要あり、自動化、再現性の点で改善の余地が残されていた。今回、我々はウェスタンブロットの一連の作業工程の中で、電気泳動から転写までを自動的に実施可能な新製品「DIRECT BLOT」の開発に成功した。本論文では、DIRECT BLOTの自動化技術の概要、分析性能について紹介する。さらに、分析例として、ウェスタンブロットのpositive controlとして多用されているベータアクチンと、臨床サンプルであるアミロイドベータの分析例を紹介する。

1. 従来ウェスタンブロットの概要

ウェスタンブロット法は1980年代に確立し、特定タンパクを検出する標準的な手法として普及している。

1.1 従来ウェスタンブロット法の操作手順

ウェスタンブロット法は次の手順で進める。(1) サンプル調整, (2) ポリアクリルアミド電気泳動, (3) 転写, (4) 抗原抗体反応, (5) 検出。詳細は以下の通りである。

(1) サンプル調整：一般的に、サンプルを可溶化、加熱処理、還元処理し、電気泳動に適した立体構造に変性する。(2) ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)：タンパク質をポリアクリルアミドゲル内で電氣的に泳動させ、分子ふるい効果により分子量に応じて分離する方法である。(3) 転写：ポリアクリルアミドゲル中のタンパク質を電氣的に、転写膜 (PVDF, ニトロセルロース膜) へ移動させる工程である。ゲル中のタンパク質は、拡散により移動し不安定な状態である。そこで転写膜上に物理吸着させることにより安定にできる。(4) 抗原抗体反応：転写膜上の目的のタンパク質を検出するため、抗体を添加し、結合を進める工程である。(5) 検出：一般的に、可視検出、蛍光検出、化学発光検出の方法により撮影できる。一般的に、以上の全工程に3時間～24時間要する。



図1 DIRECT BLOT外観
Fig. 1 Picture of the Directblot.

1.2 従来ウェスタンブロットの課題点

従来ウェスタンブロットの課題点として、作業が煩雑であることが挙げられる。例えば、電気泳動後、寒天状のやわらかいゲルが切断、変形しないように注意しながら電気泳動装置から取り外し、転写装置へ慎重に運ばなくてはならない。また、ゲルと転写膜を重ね合わせる際、気泡やゲル片が混入しないよう、注意が必要である。これらの不安定な手作業は実験再現性の低下の原因となる。さらに、転写膜への転写効率も課題点として挙げられる。分子量の小さなタンパク質の場合、転写膜を突き抜ける可能性がある。また、分子量の大きなタンパク質の場合、転写膜への移動が不十分で、ゲル中に残る可能性がある。

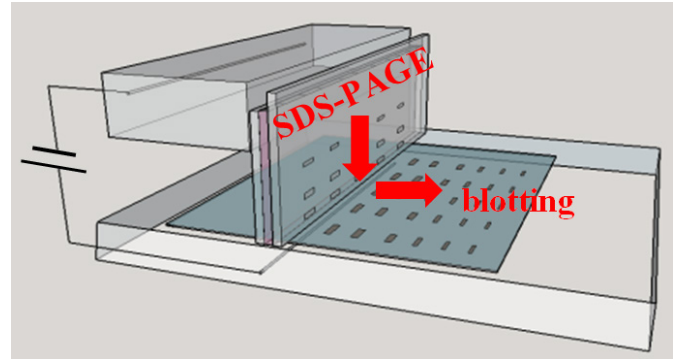
2. ダイレクトブロットの概要

従来技術の課題点を鑑み、我々はウェスタンブロット法の工程の中で特に自動化が必要とされる電気泳動・転写の自動化に取り組み、新製品「DIRECT BLOT」の開発に成功した⁴⁾。図1はDIRECT BLOTの外観である。寸法は縦41.6cm, 横24.5cm, 高さ17.0cm, 重さ約6kgであり、卓上へ容易に設置できる。従来、電気泳動装置と転写装置の2種類の装置が必要であり、それぞれに、試薬調整、備品の準備が必要であったが、本装置では本機一機のみで可能である。また、後述3. DIRECT BLOTの性能評価で詳細を紹介するように、従来技術と比して、優れた基本性能を確認できた。

2.1 排出転写方式

図2は、DIRECT BLOTの基本原理である排出転写方式の模式図を示す。SDS-PAGEゲルの末端に転写膜が密着するよう、セットする。タンパク質は電気泳動により下方方向に移動し、ゲル末端から排出、転写膜に移動する。この際、転写膜は右方向に稼働してゆく。このように、

電気泳動と膜移動を連動させることにより、低分子タンパクから順次、転写すること可能である。DIRECT BLOTは排出転写方式^{5) 6)}を採用することにより、電気泳動から転写までの工程を自動的に行うことができる。排出転写方式の操作上の利点として、実験者はゲルに直接接触することなく簡易に操作できること、サンプルが可視分子量マーカーであれば、膜に転写する過程を目視で確認できること、この他、後述するよう準備が簡易な点、さらに基本性能において優位性を確認している。



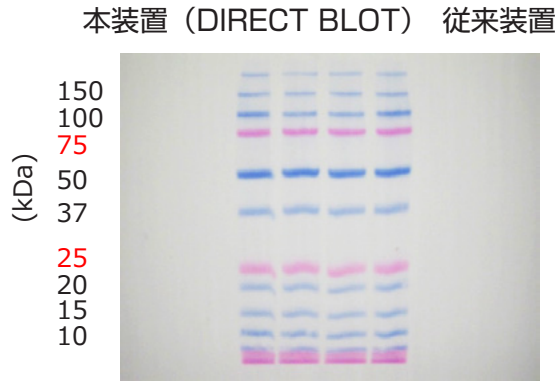
タンパク質は電気泳動により下方方向に移動し、ゲル末端から排出、転写膜に移動する
In the process of DIRECT BLOT, it elutes proteins from the end of a gel during electrophoresis to directly transfer a short protein band onto a transfer membrane.

図2 DIRECT BLOTの原理説明
Fig. 2 Schematic of DIRECT BLOT.

3. DIRECT BLOTの性能評価

3.1 再現性評価

本装置では、ゲル端面とPVDF膜が接する部分を小さくし、最適な圧力で圧着させることで高分解能を実現した。本装置では、ゲルは装置に固定されたまま、転写



(kDa)	再現性 (CV (%))		比
	本装置	従来装置	
150	4.7	5.2	0.90
100	4.3	4.0	1.07
50	3.4	4.7	0.72
37	4.0	7.2	0.55
20	2.9	nd	nd
15	2.4	nd	nd
10	2.1	nd	nd
5	1.5	nd	nd

N=5

図3 本装置の再現性評価
Fig. 3 Reproducibility of the band position.

までの工程が終了するので、手作業によるゲルの歪みによって転写パターンが乱れることはない。このように電気泳動-転写工程を完全に自動化したことで再現性の高い結果が期待できる。今回、再現性を評価するため市販の染色済分子量マーカーを用いてSDS-PAGEから転写までを本装置で行った(図3)。分離ゲルは10%、濃縮ゲルは4%とし、PAGEゲル、緩衝溶液、PVDF膜を予め装置にセットし、50mAの定電流でSDS-PAGEを行い、6μm/secでPVDF膜を移動させながら、連続的にプロットングを行った。本装置を利用した分子量マーカーの転写パターン(図3左)から位置再現性を算出し、従来技術と比較した結果、37,50,150kDaでCV値が低い、すなわち再現性が高いことを確認した(図3右)。

3.2 解像度評価

図3のデータを元に解像度を評価し、従来技術と比較した。今回、解像度の指標として各バンドの半値幅を算出した。その結果、従来技術と同等の解像度であることを確認できた(図4)。

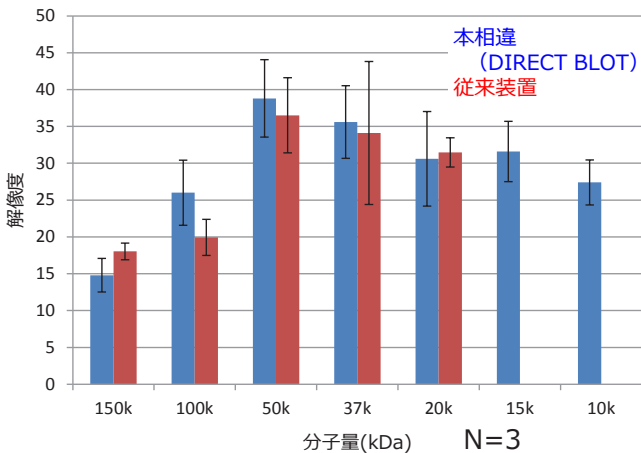


図4 解像度の従来技術との比較
Fig. 4 Resolution compared with the conventional semi-dry method.

3.3 ズーム機能

本装置の特長機能として、ズーム機能がある。ズーム機能とは転写膜の移動速度を任意に速めることにより、特定の領域を拡大する技術である。今回、一例として通常の転写条件でのパターン(図5左)と、ズーム機能を用いて75kDa~250kDaの領域を拡大したパターン(図5右)を示す。

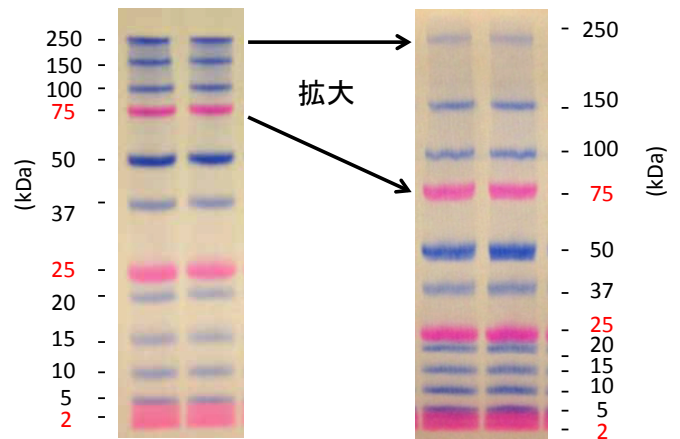


図5 ズーム機能の確認
Fig. 5 The expansion of the band of separated proteins.

4. DIRECT BLOTを用いた分析事例

4.1 ベータアクチンのウェスタンブロット

本装置を用いた分析例として、マウス肝臓抽出溶液に含まれるベータアクチンの検出を試みた。ベータアクチンはウェスタンブロットのpositive controlとして広く利用されている。サンプルとして、マウス肝臓の抽出溶液を加熱処理、還元処理した後、50μg、10μgをアプライした。SDS-PAGEチップはアクリルアミド濃度10%を利用した。DIRECT BLOTを用いて転写後、抗ベータアクチン抗体を用いてインキュベーションし、化学発光検

出法により撮影した。その結果、42kDaのベータアクチンを明瞭に検出することができた(図6)。また、サンプルアプライ量50 μ gと10 μ gの差異も明確に確認することができた。

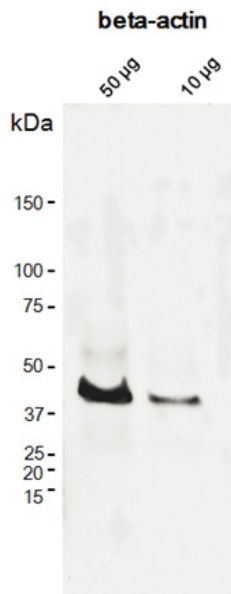


図6 ベータアクチンタンパクの分析例
Fig. 6 Western analysis of beta actin.

4.2 ベータアミロイドのウェスタンブロット

DIRECT BLOTを用いて、アルツハイマー病の原因物質として考えられているアミロイドベータタンパクのモノマー(4kDa)と神経細胞毒性を示すオリゴマー(高分子量)のウェスタンブロットを試みた。実験手法として、サンプルとして試験管内で線維化したアミロイドベータタンパクを用いて、原液及び1/2・1/4・1/8・1/16に希釈した溶液を左から順にアプライした。SDS-

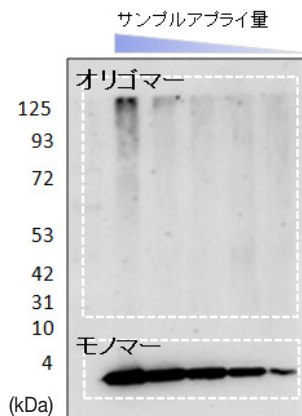


図7 アミロイドベータタンパクの分析例
Fig. 7 Western analysis of amyloid beta.

PAGEチップはアクリルアミド濃度10%を利用した。DIRECT BLOTを用いて転写後、抗アミロイドベータ抗体を用いてインキュベーションし、化学発光検出法により撮影した。その結果、アミロイドベータモノマー(4kDa)とオリゴマー(高分子量)を同一膜上で検出できた(図7)。医生物学分野において本装置が活用可能であることを示すことができた。

おわりに

本稿では、新製品DIRECT BLOTの基本原理、使い方、基本性能、分析例を紹介した。基本性能においては従来方法と比して優れた性能を示した。近年、キャピラリーやマイクロチップを利用したウェスタンブロットの自動化技術が報告されている。これらの技術は電気泳動から転写、さらに抗原抗体反応、検出までを自動的に行うことができる点が特長とされる。これらの技術と比して、DIRECT BLOTは従来法のセミドライ法、ウェット法で確立した抗原抗体反応条件をそのまま適用できる点である。つまり、一般的にウェスタンブロットを再現性よく行うためには、抗体反応(ブロッキング条件、抗体の選定、抗体濃度・反応時間)の条件検討が必要であるが、DIRECT BLOTは、従来法と同じ状態で転写されるため、従来法で確立している条件で抗体反応を行えば同様の結果が得られることが期待できる。このように従来技術と互換性、比較可能な点も本装置の特長のひとつといえる。

参考文献

- 1) D. R. Harper, M. L. Kit and H. O. Kangro, "Protein blotting: ten years on", 1990, J. Virol. Methods, vol. 30, p25-39.
- 2) B. T. Kurien and R. H. Sco, "Protein blotting: a review", 2003, J. Immunol. Methods, vol. 274, p1-15.
- 3) B. T. Kurien and R. H. Sco, "Western blotting", 2006, Methods, vol.38, p283-293.
- 4) Shinichi Goto, Nasa Savory, Koichi Abe, Hideki Kinoshita, Kazunori Ikebukuro. "Development of an automated direct blotting electrophoresis system for bioanalytical applications", 2015, Analytical Methods, vol.7, p4881-4884
- 5) S. Beck, "Protein blotting with direct blotting electrophoresis", 1988, Analytical biochemistry, vol.170, p361-366.
- 6) S. Beck and F. M. Pohl, "DNA sequencing with direct blotting electrophoresis", 1984, The EMBO journal, vol.3, p2905-2909