

# シンプルウェスタンTotal Protein Assayの同時測定 で、イムノアッセイデータのノーマライゼーション

## イントロダクション

従来のウェスタンブロットでは、標的タンパク質のシグナルをノーマライゼーション（標準化）する為に、GAPDH、チューブリンなどのハウスキープタンパク質がよく使用されています。しかしながら、これらの多くタンパク質は従来の見解とは異なり、その発現量は一貫しておらず、単一の標的タンパク質の標準化には理想的ではありません。メンブレンまたはキャピラリー上に固定された全てのタンパク質を、偏りなくノーマライズする方法を見つけることが必要です。

Journal of Biological Chemistryのような科学雑誌では、最近ウェスタンブロットの結果を投稿する際のガイドラインを更新し、発現変化をより正確に反映し、より良いデータとするために、総タンパク質でのノーマライゼーションを推奨しています。従来のウェスタンブロットを使用して総タンパク質を分析するのに、CBBまたはボンソーSでメンブレンを染色し、レーンごとに標準化した値を算出するように求めています。

このガイドでは、Total Protein Detection Module (DM-TP01) を各種イムノアッセイ検出モジュールと一緒に使用して、Total Protein Assayとイムノアッセイのデータを1回の測定で同時に取得する方法を説明します。この方法では、余計な追加測定をすることなく、論文を投稿する際に必要なノーマライゼーション係数をハイスループットでより正確に得ることができます。

## どのようにシンプルウェスタンTotal Protein Assayは行われる？

図1に示すTotal Protein Assayはキャピラリー内標識技術で、タンパク質を分子量によって分離し、キャピラリー内に固定し、次いでブロッキングの前にビオチンで標識します。次に、キャピラリー内のビオチン化されたタンパク質はHRP標識ストレプトアビジン (SA-HRP) と結合し、化学発光反応により検出されます<sup>2</sup>。

Compass for Simple Western (ソフトウェア) のアッセイメニューからTotal Protein Assayを選択します。このアッセイでは、Total Protein Detection Module試薬のインキュベーション時間が最適化されています。詳細は、製品同梱物およびTotal Protein Detection Module (DM-TP01) 付属のTotal Protein Assay Plate Layoutを参照してください。

## Total Protein Assayとイムノアッセイの同時測定

同じサンプルセットからTotal Protein Assayおよびイムノアッセイのデータを得るには、2つのアッセイを別々のキャピ

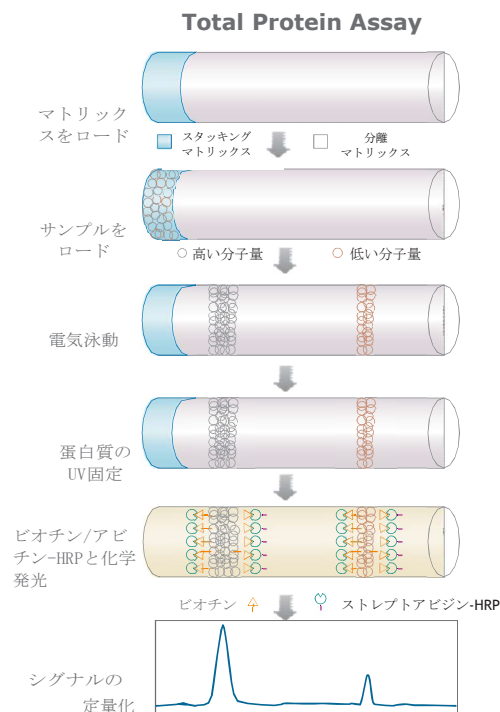


図1. タンパク質を分離後、イムノアッセイと同じようにキャピラリー内にUVで捕捉します。次に捕捉したタンパク質をBiotin Labeling Reagentで処理し、ストレプトアビジン-HRPによって検出を可能にします。

ラリーで行います。もしWesを用いて別々の測定を行うと、各アッセイは約3時間かかるため、総時間は約6時間になってしまいます。Total Protein Assayを使用して、同じプレートで同時に両方のアッセイを行うことにより、この時間を半減させる方法を考案しました。

初めに、図2で並んで示されている、Total Protein Assayとイムノアッセイのデフォルトの条件を見てみましょう。

2つのアッセイには多少違いがありますが、アッセイのステップ数は同じです。イムノアッセイには、5分間のブロッキングステップがあるのに対して、Total Protein Assayには、イムノアッセイと同じステップで30分のビオチンラベリング時間（図2で青色で強調表示）があります。これらの2つのインキュベーションのうち、ビオチンラベリング時間がより重要です。従って、両方のアッセイを同時にWes測定で測定するには、Total Protein Assayプロトコルのデフォルトの条件を使用します。総タンパク質と免疫検出する標的タンパク質の両方のシグナルが、それらの濃度とリニアな関係になっている範囲を特定するために、最初にサンプル希釈系列を用いて測定（アッセイ開発）することを推奨します。両方のアッセイの直線範囲内での定量が、最も正確で再現性のあるデータを得るのに重要です。

イムノアッセイ

	Value
> Separation Matrix	
> Stacking Matrix	
> Sample	
Separation Time (min)	25.0
> Separation Voltage (volts)	375
> Matrix Removal	
> Antibody Diluent Time (min)	5.0
> Primary Antibody Time (min)	30.0
> Secondary Antibody Time (min)	30.0
> Detection	

Total Protein Assay

	Value
> Separation Matrix	
> Stacking Matrix	
> Sample	
Separation Time (min)	25.0
> Separation Voltage (volts)	375
> Matrix Removal	
> Biotin Labeling Time (min)	30.0
> Primary Antibody Time (min)	30.0
> Total Protein HRP Time (min)	30.0
> Detection	

図2. WesのイムノアッセイおよびTotal Protein Assayのデフォルトのアッセイプロトコル。プロトコルの主な違いは、各プロトコルで青色でハイライト表示されたただ一つのインキュベーションです。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
A	Ladder	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Blank	S1	Blank											
B	Block	Label	Block	Label	Block	Label	Block	Label	Block	Label	Block	Label	Block	Label	Block	Label	Block	Label	Block	Label	Block	Label	Block	Label	Block
C	Block	Primary	Block	Primary	Block	Primary	Block	Primary	Block	Primary	Block	Primary	Block	Primary	Block	Primary	Block	Primary	Block	Primary	Block	Primary	Block	Primary	Block
D	Ladde...	TP	2' Ab	TP	2' Ab	TP	2' Ab	TP	2' Ab	TP	2' Ab	TP	2' Ab	TP	2' Ab	TP	2' Ab	TP	2' Ab	TP	2' Ab	TP	2' Ab	TP	2' Ab
E	Luminol/Peroxide																								

図3. 同じWesプレート上でTotal Protein Assayとイムノアッセイの両方を実行する場合の推奨プレートレイアウト。各サンプル（S1～S10）は、Biotin Labeling Reagent（ラベリング用）またはAntibody Diluent（ブロッキング用）のいずれかでB行で処理します。C行では、Antibody Diluent（ブロッキング用）または一次抗体のいずれかを使用します。D行では、Total Protein SA-HRPまたは適切な二次抗体（2'Ab）を検出用に使用します。ウェル22～25はコントロールです。

この2つアッセイをうまく同時に実行できるかどうかを検証するために、12-230kDa分離モジュール (SM-W004)、HeLa細胞ライセート (0.2mg / mL)、イムノアッセイ用の抗AKT1抗体およびAnti-Rabbit Detection Module (DM-001)、および試料中の総タンパク質を検出するためにTotal Protein Module (DM-TP01)を使用して測定しました。得られたデータは、両方のアッセイで高い再現性を示しました (図4)。総タンパク質のCV (変動係数) は4.23%であり、免疫検出されたAKT1は7.95%でした。免疫検出されたAKT1のCVは、総タンパク質でノーマライゼーション後、7.66%に減少しました。

Total Protein Assayを使用して検出したシグナルの総面積は、反応を通じてビオチン化されたタンパク質および内在性のビオチン化タンパク質が含まれます。内在性ビオチン化タンパク質は、ビオチン標識無しのコントロール (図4、レーン23)を測定することで同定することができます。これらのタンパク質は、データを定量化する際に解析に含めても問題ありません。

Peggy Sue™またはSally Sue™でもTotal Protein Assayとイムノアッセイを組み合わせて実行することができます。これらの機器では、サンプルをロードした同じウェルを使用して、2つのアッセイを別々のサイクルで行うこともできます。

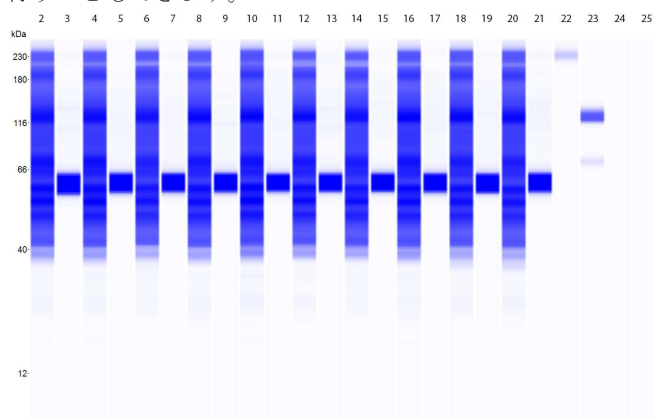


図4. WesでTotal Protein Assayとイムノアッセイを組み合わせたサンプルデータセット。HeLa細胞ライセート (0.2mg / mL) を用いて、Total Protein Assay (偶数レーン) または抗AKT1抗体 (奇数レーン) でイムノアッセイを行いました。Total Protein Assay (レーン22および23) のコントロール (右) として、230kDaの内部標準および内在性ビオチン化タンパク質の検出をそれぞれ示しています。レーン24および25では、一次抗体または二次抗体由来のバックグラウンドのコントロールを示しています。

## まとめ

従来のウエスタンブロットデータよりも正確な標準化が必要になっていますが、Total Protein Assayを使用することで、科学雑誌が要求するハイレベルの総タンパク質データを取得することができます。この方法は簡便で、再現性が高く、最適化されたアッセイ条件を用いることで真の定量性が得られます。さらにイムノアッセイの最適化をすでに完了している場合、同じプレート上でTotal Protein Assayとイムノアッセイを行うだけで、両方のデータを同時に取得することもできます。Compass for Simple WesternでデフォルトのTotal Protein Assayを使用し、両方の検出モジュールを1つのプレートに組み合わせるだけです。定量がより正確になるように、適切なコントロールを準備することも推奨します。

## 参考文献

1. Transparency is the key to quality, AJ Fosang and RJ Colbran, *J Biol Chem*, 2015; 290(50):29692-4.
2. Total Protein Analysis the ProteinSimple Way, ProteinSimple Application Note, 2015.