

Can Get Signal™を用いたWestern blotによるリン酸化タンパク質の検出

宮崎大学医学部薬理学講座 柳田 俊彦、和田 明彦



はじめに

抗リン酸化タンパク質認識抗体を用いたWestern blotは、様々な細胞内情報伝達系で活性化/不活性化されるタンパク質のリン酸化レベルの検出に広く用いられる方法です。簡便で容易である一方で、抗体の感度や特異性の良し悪しに、その結果が大きく左右されます。また、通常の抗体を用いる時と違って、ブロッキング溶液にカゼインを含むスキムミルクを使わないようにするなどの工夫が必要です。

Can Get Signal™は、抗原抗体反応を促進する効果があり、従来法に比べ、数倍から、数十倍のシグナルを得られること、またバックグラウンドを低く抑えることができるため、Western blotやELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)など、抗原抗体反応を用いた様々なアッセイ系に広く応用することが可能とされています。我々は、Can Get Signal™が抗リン酸化タンパク質認識抗体を用いたWestern blotにおいても従来法に比べ優れているかどうかを、インスリン刺激による下流のシグナル[AktおよびERK (Extracellular-signal regulated kinase)]のリン酸化を指標として検討しました。

方 法

1. サンプル調整

培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞(発生学的に神経堤に由来)の培養液に、インスリン(1nM, 10nM, 100nM)、あるいは、対照のH₂Oを添加し、5分間インキュベートしました。その後、Cell lysis buffer (SDS-lysis buffer) で可溶化し、95℃で5分間ボイルしました。

2. 電気泳動およびトランスファー

10μgの可溶性タンパクを12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動後に、Hybond-P PVDFメンブレン【Amersham Biosciences社】にトランスファーしました。

3. ブロッキング

TBS-tween (TBS-T: 10mM Tris, 0.15M NaCl, 0.1% Tween-20) 50mlに、BSA(Bovine serum albumin)0.5gを溶かし、1% BSA TBS-T溶液とし、トランスファー後のPVDFメンブレンを浸して、室温で1時間振とうしました。

4. 1次抗体反応

1次抗体を、Can Get Signal™ Solution 1で1/2,000に希釈し、PVDFメンブレンを室温で1時間振とうした後、TBS-Tで洗浄(10分間振とう×3)しました。コントロールは、TBS-Tで1次抗体を希釈しました。

使用した1次抗体:

抗phospho-Akt ポリクローナル抗体

【Cell Signaling Technology社製】

抗phospho-ERK モノクローナル抗体【Santa Cruz社製】

5. 2次抗体反応

2次抗体を、Can Get Signal™ Solution 2で1/20,000に希釈し、PVDFメンブレンを室温で1時間振とうした後、TBS-Tで洗浄(10分間振とう×3)しました。コントロールは、TBS-Tで2次抗体を希釈しました。

使用した2次抗体:

HRP標識抗ラビット抗体【Amersham Biosciences社製】

HRP標識抗マウス抗体【Amersham Biosciences社製】

6. 検出

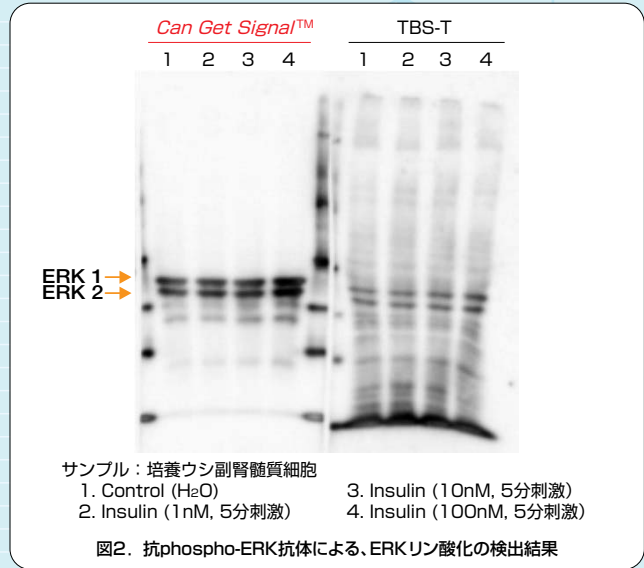
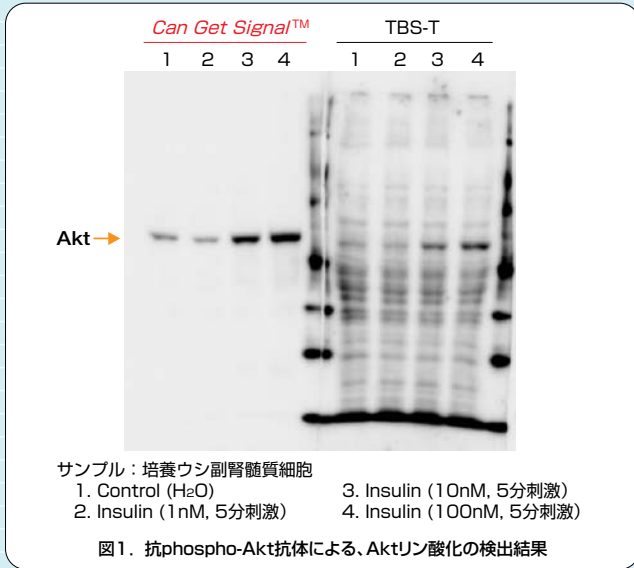
ECL Plus【Amersham Biosciences社製】により発色し、LAS-3000システム【富士フイルム社製】で検出しました。

結果及び考察

図1にAktのリン酸化、図2にERKのリン酸化の検出結果を示します。インスリンの濃度が増加するに従って、AktおよびERKのリン酸化が増加しました。

Can Get Signal™使用例とコントロール(従来法:TBS-T使用例)を比較すると、明らかなシグナルの増強と、バックグラウンドの低下が認められました。

以上の結果から、抗リン酸化タンパク質認識抗体を用いたWestern blotにおいて、Can Get Signal™はTBS-Tで希釈する従来法に比べ、高い感度と低いバックグラウンドでの検出が可能になるものと考えられました。



品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
Can Get Signal™ Immunoreaction Enhancer Solution Solution 1 for primary antibody Solution 2 for secondary antibody	各250ml	4℃	NKB-101	¥30,000
	各50ml		NKB-101T	¥10,000
Can Get Signal™ Solution 1 for primary antibody	250ml	4℃	NKB-201	¥17,000
Can Get Signal™ Solution 2 for secondary antibody	250ml	4℃	NKB-301	¥17,000

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格	2004~2005 総合カタログ
Santa Cruz社抗体 (シグナル伝達系関連)		お問い合わせください			—
PeproTech社抗体・抗原		お問い合わせください			—
Fitzgerald社抗体 (成長因子関連)		お問い合わせください			—
Lumino Imaging Analyzer FAS-1000 (標準画素CCDタイプ)	一式	—	FAS-1000	¥2,500,000	8-32.33
FAS-1100 (高画素CCDタイプ)			FAS-1100	¥3,500,000	