

Total protein (トータルタンパク質) によるノーマライズの方法

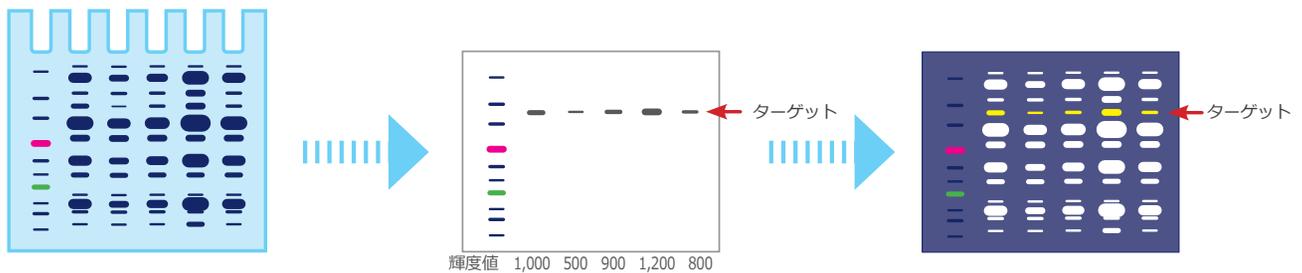
2023年05月10日

1. 概要

ウェスタンブロットリングはターゲットタンパク質の検出をするために、最もよく使用されている方法です。ターゲットタンパク質の発現量の変化や、サンプル間における発現量の比較を検出するためには、ターゲットタンパク質の量を何らかの方法で定量する必要があります。一般的にウェスタンブロットリングのデータはサンプル間やレーン間でのバラつきがあります。そこで、それらの影響を最小限にするために、ある指標（リファレンス）を利用して補正します（ノーマライズ）。これまでノーマライズといえば、ハウスキーピングタンパク質（HKP）の発現量がリファレンスとして利用されてきました。しかし最近になって、ハウスキーピングタンパク質の発現量が組織や細胞種によって、また細胞周期や発生段階によって必ずしも一定ではないこと、その発現量もターゲットタンパク質のものとはかけ離れていることが指摘されるようになり、ノーマライズに使用する場合は十分注意する必要があるといわれるようになりました。そんな中、ハウスキーピングタンパク質に変わってノーマライズに使用できるリファレンスとして、Total protein (TP、トータルタンパク質、総タンパク質) が注目されてきています。

今回は、アトー製品などを使用したトータルタンパク質によるデータノーマライズの方法をご紹介します。

ターゲットタンパク質の検出



① 電気泳動

サンプル中に含まれるタンパク質は？

電気泳動をするとサンプル中に含まれるタンパク質がバンドに分かれます。しかし、ターゲットタンパク質が、どのバンドなのかは判別できません。

② ウェスタンブロットリング

ターゲットタンパク質は発現しているの？

ウェスタンブロットリングをするとターゲットタンパク質のバンドと量（輝度値）が分かります。分子量マーカーの移動度から、ターゲットタンパク質の分子量も推定できます。しかし、どのサンプルで最も多く発現しているのかは判断できません。

③ データの解析

ターゲットタンパク質のバンドはどれ？

電気泳動パターンとウェスタンブロットリングの検出バンドを重ねると、どのバンドがターゲットタンパク質なのか判別できます。各レーンのトータルタンパク質の情報をリファレンスとして、サンプル中にどのくらい含まれるのか、どのサンプルで最も多く発現しているのかなども解析可能になります。

なぜノーマライズは必要？

- ① **サンプル自体の不均一さ**
生物種や組織・発生ステージによる違い、抽出方法などにより影響を受けます。
- ② **アプライ量の不均一さ**
タンパク質定量の方法や抽出溶媒の影響、アプライするときの手技などにより影響を受けます。
- ③ **転写効率・検出効率・抗体反応の不均一さ**
転写バッファーや転写方法、手技、抗体のタイターや希釈率や反応時間などにより影響を受けます。
- ④ **複数のプロット間での比較**
多検体を比較するときなど複数のプロットの発現量を比較するときに基準が必要になります。

これらの影響を最小限にするため
ノーマライズは必要です

ノーマライズのリファレンスには？

- ① **トータルタンパク質**
 - ◆ EzLabel FluoroNeo, Cy5 などの蛍光色素により標識
 - ◆ ステインフリーゲルの利用
 - ◆ ブロットリング膜の染色（CBB、ポンソーなど）

- ② **ハウスキーピングタンパク質**

- ◆ GAPDH、アクチン、チューブリンなどの発現量
- ※ただし、ハウスキーピングタンパク質をリファレンスに使用するときには下記の注意が必要といわれています。
- ・実験条件によりリファレンスの発現量が影響されないこと
 - ・リファレンスの発現量とターゲットタンパク質の発現量はかけ離れていないこと
 - ・リファレンスの検出がターゲットタンパク質の検出を妨げないこと

データノーマライズは
ターゲットタンパク質の発現量を
リファレンスにより補正します

ウェスタンブロットティングのノーマライズ

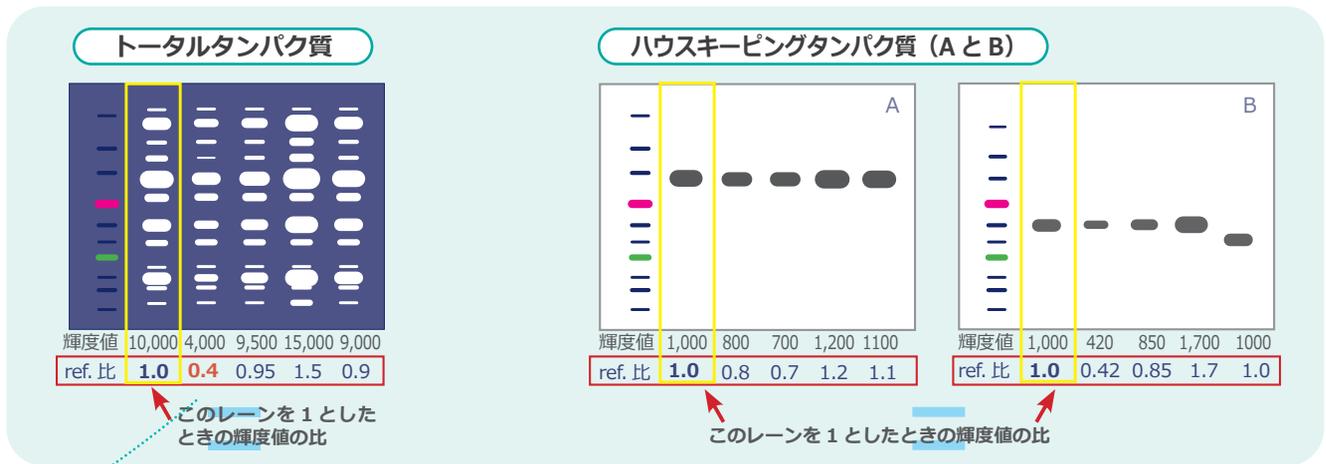
2. ノーマライズとは

前述したようにタンパク質のサンプルは不均一な上に、同じサンプルを同じ量だけアプライして電気泳動をしたとしても、レーン間の差は生じます。どんなに注意をしても、転写ムラや抗体反応のバラつきなども避けられません。そこで精度良く、再現性良く、定量的にウェスタンブロットティングを行う上で、ノーマライズというプロセスは必要不可欠になります。ウェスタンブロットティングのノーマライズでは、ターゲットタンパク質の輝度値を、リファレンスの輝度値から算出された各レーンの相対値（リファレンス比）で割って補正します。

ノーマライズによる定量

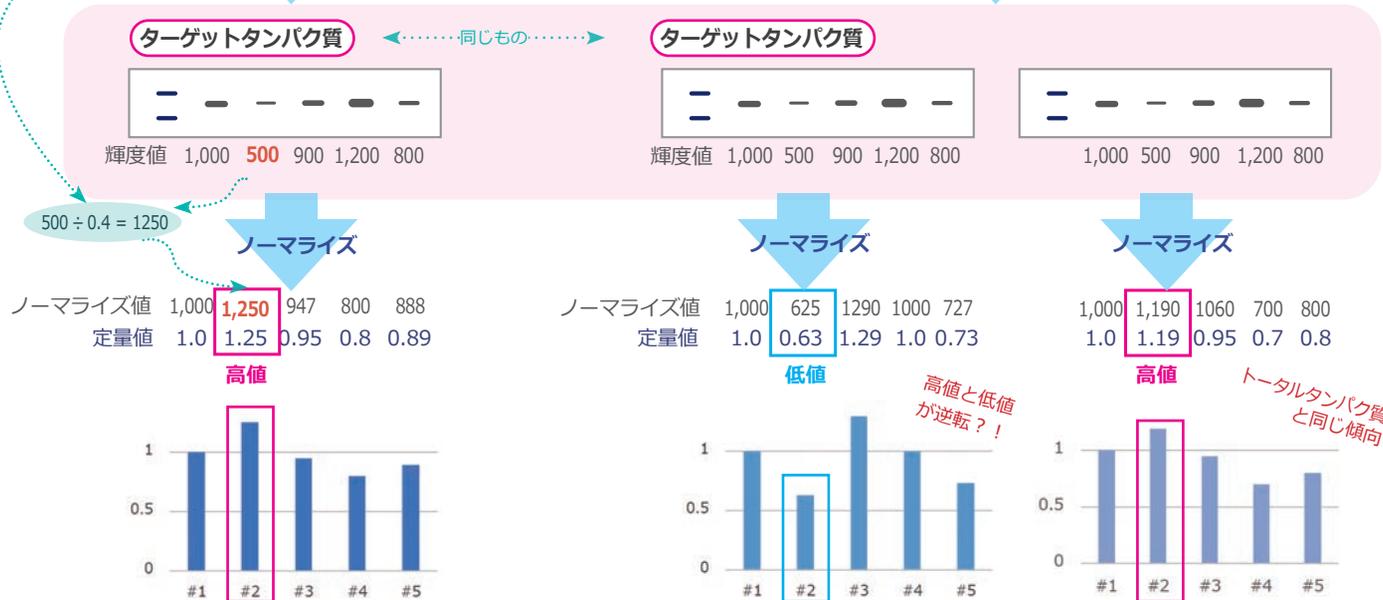
リファレンスの輝度値のレーン間での比（『リファレンス比』）を算出し、これをばらつきの補正係数とします。

$$[\text{リファレンス比 (ref. 比)}] = [\text{各リファレンスの輝度値}] \div [\text{最初の番号のレーンのリファレンスの輝度値}]$$



各レーンのターゲットタンパク質のバンドの輝度値を『リファレンス比 (ref. 比)』で割ってノーマライズします。

$$[\text{ノーマライズ値}] = [\text{レーン N のバンドの輝度値}] \div [\text{レーン N のリファレンスバンド比 (ref. 比)}]$$



① トータルタンパク質によるノーマライズ

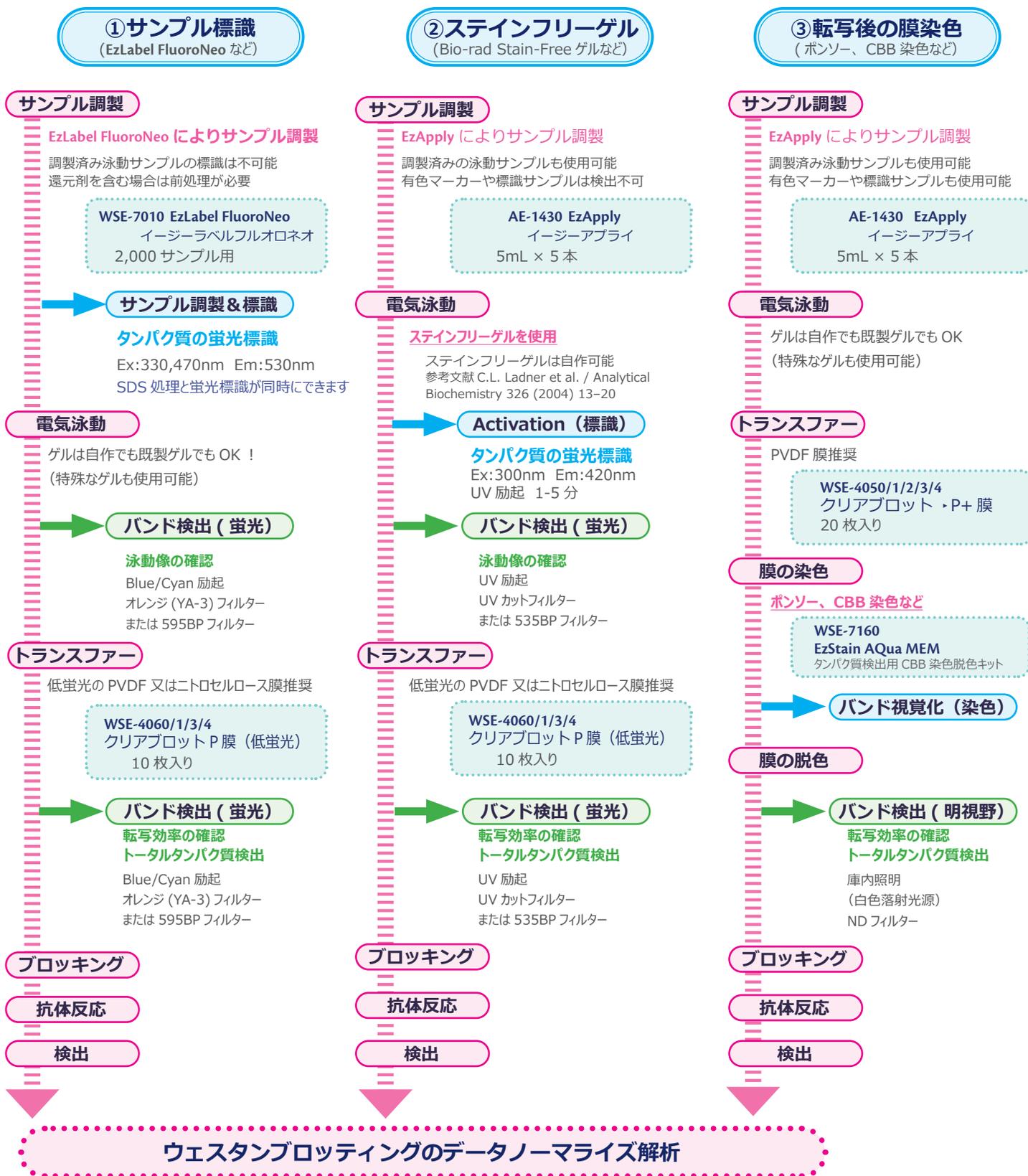
PVDF 膜に転写されたタンパク質量（トータルタンパク質）をリファレンスとしてノーマライズした例です。トータルタンパク質は、ある特定のタンパク質の発現量ではないため、普遍的な指標といえます。抗体反応や転写ムラによる影響や、組織の違いなどによる影響も最小限に抑えられます。上記は最もターゲットタンパク質のシグナルが弱かったサンプルが、ノーマライズした結果、最も多く発現している例を示しています。

② ハウスキーピングタンパク質によるノーマライズ

GAPDH やアクチンなどのハウスキーピングタンパク質をリファレンスとしてノーマライズした例です。ハウスキーピングタンパク質は比較的安定に発現していますが、組織により発現量が異なる場合や、発現量がターゲットタンパク質よりも著しく高い場合、抗体の反応性が良く過剰に検出される場合は、正確に補正できないことがあります。上記はハウスキーピングタンパク質が過剰に検出される例 (A) と理想的に検出される例 (B) のイメージです。極端な例ですが、発現量が高いサンプルと低いサンプルが逆転する可能性を示しています。

3. 実験の流れ

下図はトータルタンパク質でノーマライズするための実験フローを示しています。トータルタンパク質でノーマライズする場合、転写された PVDF 膜上のタンパク質バンドを視覚化する必要があります。PVDF 膜上のタンパク質を検出する方法は大きく分けて①サンプル標識、②ステインフリーゲル、③転写後の膜染色があります。



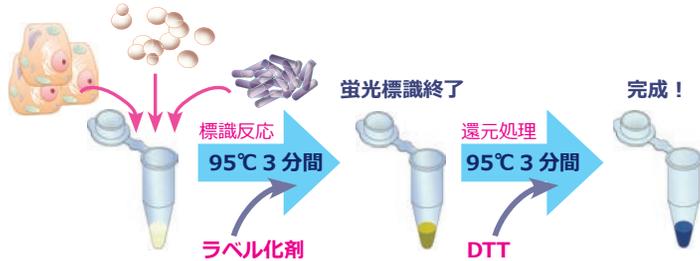
今回は上記のうち、①サンプル標識と②ステインフリーゲルの実験方法に関して説明します。またウェスタンブロットティングの結果のノーマライズ解析に関して、アトーの画像解析ソフト CS Analyzer 4 を使用した方法を簡単にご紹介します。

EzLabel FluoroNeo を使用したトータルタンパク質の検出

4. サンプル標識によるゲル染色フリー

4-1. サンプル調製 (EzLabel FluoroNeo)

EzLabel FluoroNeo は SDS サンプルバッファーの代わりに使うだけで、タンパク質の蛍光標識と電気泳動用サンプル調製ができます。電気泳動後のゲルは、染脱色不要で、すぐにバンドが蛍光検出できます。



実験材料： 組織・細胞・細菌等
EzLabel FluoroNeo (WSE-7010)
マイクロ遠心チューブ、チップ等
遠心機、マイクロピペット等

実験方法：

- ① EzLabel FluoroNeo を使用して電気泳動サンプルを調製します。40 μ L のタンパク質サンプルにキット添付の 10 μ L の Sample buffer (5x conc.) と Labeling reagent を 0.5 μ L 添加して混合します。
 - ② 95°C で 3 分間加熱します (煮沸でも OK)。
 - ③ ②の混合液に Reducing agent (DTT) を 2 μ L 添加して混合します。
 - ④ 95°C で 3 分間加熱します (煮沸でも OK)。
- ※作製したサンプルは -20°C で遮光保存可能です。
※サンプル中に還元剤が含まれると蛍光標識反応を著しく妨げる原因となります。そのため標識後に還元処理 (ステップ③~④) をします。

4-2. 電気泳動

EzLabel FluoroNeo で標識した電気泳動サンプルは、一般的なゲル、泳動バッファー、泳動条件で分離できます。ここでは既製ゲル (ePAGEL-HR) を使用した、高速電気泳動についてご紹介します。



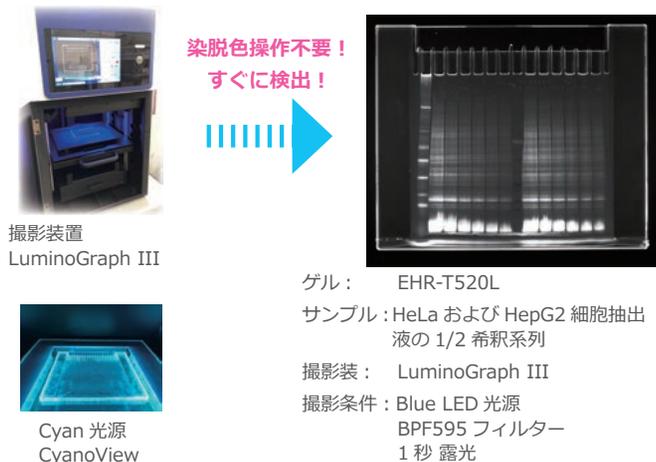
実験材料： EzLabel FluoroNeo で調製した泳動サンプル
既製ゲル (ePAGEL-HR など)
泳動バッファー (AE-1410 EzRun など)
電気泳動装置、電源、チップ等

実験方法：

- ① ePAGEL-HR を PageRun Ace (電源付電気泳動装置) にセットします。
- ② 1 レーンあたり 5 ~ 10 μ L のサンプルをアプライします。
※サンプル濃度は精製タンパク質では 100ng ~ 1 μ g/lane、抽出液では 1 ~ 50 μ g/lane が適当です。
- ③ スタートボタンを押して電気泳動を開始します。
※ High mode (24W) で約 35 分間、もしくは Standard mode (20mAgel) で約 80 分間泳動します。
※ 外部電源を使用する場合は、300V で約 35 分間、もしくは 150V で約 75 分間泳動します。
- ④ 泳動先端 (色素ライン) がゲルの下端から 5-10 mm 上まで泳動されたら、出力を止めて終了します。
※サンプルの溶媒に Tris などのアミノ基が含まれると、非特異的なシグナルが出る原因になります (ゲルの蒸留水洗浄により消えます)。

4-3. 電気泳動パターンの確認 (蛍光検出)

EzLabel FluoroNeo を使用した電気泳動後のゲルは、すぐに、Blue LED あるいは Cyan で励起することにより、バンドパターンを確認できます。



実験材料： 泳動後のゲル (EzLabel FluoroNeo 使用)
LuminoGraph III もしくは
Luminograph I/II などの撮影装置
[Cyan (CyanoView) もしくは
BlueLED (VariRays) 光源 とフィルター]

実験方法：

- ① 泳動終了後のゲルを泳動槽から外し、ゲルプレートを外さずに、水道水でガラス表面を軽く洗浄し、水気をペーパータオルで拭きとります。
- ② 撮影装置と光源、フィルターを準備します。

撮影装置	光源	フィルター
LuminoGraph I/II など	VariRays (Blue) もしくは CyanoView	YA-3 (560LPF) もしくは オレンジフィルター
LuminoGraph III	Blue LED もしくは Cyan 光源	BPF595 もしくは BPF535

[Ex: 330 (UV), 470 nm, Em: 530 nm]

- ③ ゲルをプレートごと光源照射面に置いて撮影します。

4-4. 転写

通常の転写条件で転写できます。PVDF 膜は、自家蛍光の低い蛍光検出用の PVDF 膜の使用が望ましいですが、一般的な PVDF 膜でも検出可能です。特に Blue LED 光源で検出する場合は、自家蛍光の影響が低減できます。ここでは高速転写バッファー (EzFastBlot) を使用した、高速転写に関してご紹介します。



Powered BLOT 2M

セッティング方法

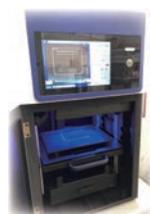


転写バッファーと転写条件

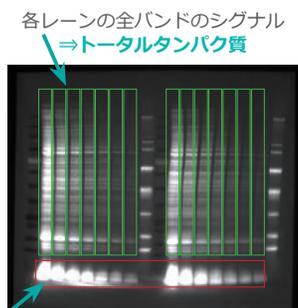
	EzBlot	EzFastBlot	EzFastBlot HMW	EzRun TG (Towbin 法)
Cat#	AE-1460	AE-1465	WSE-7210	WSE-7055
転写条件	2 mA/cm ² 60 min (~40V)	20~25V c.v. 5~15 min (500mA/gel)	25V c.v. 15~30 min (500mA/gel)	2 mA/cm ² 60 min (~40V)

4-5. 転写効率の確認 (蛍光検出)

EzLabel FluoroNeo で調製したサンプルは、転写後の PVDF 膜上のバンドもゲルと同様に蛍光検出できます。EzLabel FluoroNeo の蛍光強度は、タンパク質濃度と相関しているため、PVDF 膜上のタンパク質バンドのシグナル強度をトータルタンパク質としてノーマライズに利用することが可能です。ノーマライズに関しては 8 ページ『6. トータルタンパク質によるノーマライズ』を参照してください。



撮影装置
LuminoGraph III



サンプル中の夾雑物やアミノ酸由来の非特異的なシグナル TCA 沈殿で除去可能 水洗でも軽減可能

PVDF 膜: クリアプロット P+ 膜
撮影装: LuminoGraph III
撮影条件: BlueLED 光源
BPF595 フィルター
0.1 秒 露光

実験材料:

泳動後のゲル (WSE-7010 EzLabel FluoroNeo 使用)
転写バッファー (AE-1465 EzFastBlot など)
PVDF 膜 (クリアプロット P 膜 (低蛍光) など)
プロットング装置 (PoweredBLOT 2M など)
遠心機、マイクロピペット等

実験方法:

- ① あらかじめ PVDF 膜をメタノールで親水化処理し (5 秒)、EzFastBlot に浸漬します (15 分以上振とうします)。
- ② 蛍光検出後のゲルを EzFastBlot で洗浄し、陽極側 (下) からろ紙 (0.9mm 厚) 2~3 枚、PVDF 膜、ゲル、ろ紙 2~3 枚の順に重ねます。ろ紙は重ねる直前に EzFastBlot に充分浸漬します。
※空気を専用ローラーを使って押し出し、ろ紙、膜、ゲルを密着させます。
- ③ スタートボタンを押してトランスファーを開始します。
※ Rapid mode で 10~15 分通電します。
※ 外部電源を使用する場合は、24V で約 10~15 分間、もしくは 12V で約 30 分間転写します。

実験材料:

転写後の PVDF 膜 (EzLabel FluoroNeo 使用)
LuminoGraph III もしくは
Luminograph I/II などの撮影装置
[Cyan (CyanoView) もしくは
BlueLED (VariRays) 光源 とフィルター]

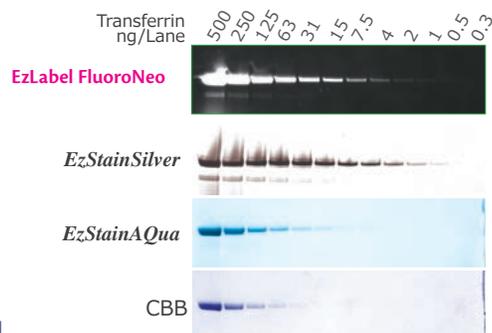
実験方法:

- ① 転写終了後の PVDF 膜を蒸留水等で軽く洗浄します。
- ② 撮影装置と光源、フィルターを準備します。

撮影装置	光源	フィルター
LuminoGraph I/II など	VariRays (Blue) もしくは CyanoView	YA-3 (560LPF) もしくは オレンジフィルター
LuminoGraph III	Blue LED もしくは Cyan 光源	BPF595 もしくは BPF535

- ③ PVDF 膜を光源照射面に置いて撮影します。
※ PVDF 膜は汚れないように十分注意して取り扱ってください。ピタットクリア (2322438) に挟むと、蛍光検出に影響を与えずに、汚れから保護できます。
※ PVDF 膜は乾燥した方が、蛍光シグナルを強く明瞭に検出できます。乾燥した PVDF 膜はメタノールで親水化処理をした後に、ブロッキング、抗体反応に進んでください。

ちょっと紹介 関連製品



EzLabel FluoroNeo の検出感度

イージーラベルフルオロネオ

- ✓ サンプル調製 & 蛍光ラベル
- ✓ ゲル染色フリー !!
- ✓ 電気泳動後すぐに蛍光検出!
Cyan, Blue LED, UV 光源対応
Ex: 330 (UV), 470 nm, Em: 530 nm
- ✓ 銀染色レベルの検出感度
- ✓ ラベル後のバンド移動度の変化なし
- ✓ ウェスタンブロットング可能

名称	EzLabel FluoroNeo
型式・コード	WSE-7010・2332333
キット内容	Sample buffer (5x): 12 mL Labeling reagent: 10 mg Reducing agent (DTT): 300 mg MW marker: 600 μL RIPA Lysis buffer: 10 mL
保存	冷凍 -20℃ 1年 (未開封時)

ステインフリーゲルを使用したトータルタンパク質の検出

5. ステインフリーゲル

5-1. サンプル調製 (EzApply)

ステインフリーゲルを使用する場合も、電気泳動サンプルは通常の方法で調製します。有色マーカーは検出できないので、無色マーカーを併用します。



実験材料： 組織・細胞・細菌等
SDS サンプルバッファー (AE-1430 EzApply)
マイクロ遠心チューブ、チップ等
遠心機、マイクロピペット等

- 実験方法：**
- 50 μ L のサンプルに 50 μ L の EzApply (2 \times 濃度、DTT 添加済み) を加えて混合します。
 - 小型ブロックインキュベータ WSC-2610 MyMiniBlock で 95°C 5 分間加熱します (煮沸でも OK)。
 - 15,000rpm で 5 分間遠心し (しなくても OK) 上清を回収します。
※作製したサンプルは -20°C で保存可能です。

5-2. 電気泳動

ステインフリーゲルを使用して泳動します。プレキャストゲルを使用する場合は、取扱説明書に従ってください。ここでは、自作ステインフリーゲルを作製し、泳動する方法を紹介します。

ステインフリーゲル作製方法の詳細は下記 Ladner らの文献を参照してください。

参考文献

C.L. Ladner et al., *Analytical Biochemistry* 326 (2004) 13–20
Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining

実験材料： 泳動サンプル
ステインフリーゲル
泳動バッファー (AE-1410 EzRun など)
電気泳動装置、電源、チップ等

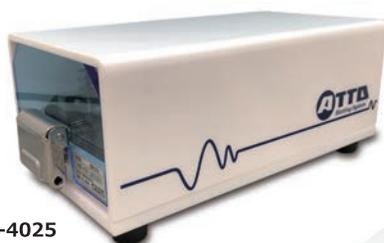
(自作する場合) 30(w/v)% アクリルアミド / ビス (29:1) 溶液
ゲル緩衝液 (WSE-7310 EzGelAce)
過硫酸アンモニウム (APS)
TEMED

- 実験方法：**
- ゲル作製器を組み立てます。組み立て方法はご使用になる作製器の取扱説明書に従ってください。
 - 左記のゲル組成表を参照して、分離ゲルと濃縮ゲルのゲル溶液を APS と TEMED 以外の試薬を混合して調製します。重合開始直前に APS と TEMED を添加して、ゲルを作製します。
 - ゲルを PageRun Ace (電源付電気泳動装置) にセットします。
 - 1 レーンあたり 5 ~ 10 μ L のサンプルをアプライします。
※サンプル濃度は精製タンパク質では 100ng ~ 1 μ g/lane、抽出液では 1 ~ 50 μ g/lane が適当です。
 - スタートボタンを押して電気泳動を開始します。
※ High mode (24W) で約 35 分間、もしくは Standard mode (20mA/gel) で約 80 分間泳動します。
※ 外部電源を使用する場合は、300V で約 35 分間、もしくは 150V で約 75 分間泳動します。
 - 泳動先端 (色素ライン) がゲルの下端から 5-10 mm 上まで泳動されたら、出力を止めて終了します。

ゲル組成表	分離ゲル				濃縮ゲル
ゲル濃度	7.5%	10%	12.5%	15%	4.5%
蒸留水	5 mL	4.2 mL	3.3 mL	2.5 mL	3 mL
30% A.A/BIS*	2.5 mL	3.3 mL	4.2 mL	5 mL	0.75 mL
EzGelAce	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	1.25 mL
TCE**	0.05 mL				
10% APS	0.075 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL
TEMED	0.005 mL				

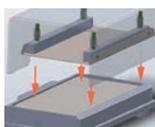
*30% A.A/BIS: 30(w/v)% アクリルアミド / ビス (29:1) 溶液
**TCE: 2,2,2- トリクロロエタノール (CAS 番号: 115-20-8)
上記組成表はミニゲル 1 枚あたりに必要な容量です。

ちょっと紹介
関連製品



WSE-4025
HorizeBLOT2M

4点バネ方式



電源付で
もっと簡単!



WSE-4125
パウダーブロット 2M



HorizeBLOT 2M/4M

ホライズプロット 2M/4M

- ✓ 4点バネ方式で強力かつ均等な押圧でゲル&膜を密着固定
- ✓ 転写流れ・ムラなどのリスクを最小限に低減
- ✓ 最短5分の高速転写対応 (2枚のミニゲル、1枚のワイドゲル)
- ✓ 装置の操作性・データの再現性向上

名称	ホライズプロット 2M	ホライズプロット 4M
型番・コード	WSE-4025 2322466	WSE-4045 2322476
転写方式	ミニゲル 2 枚、ワイドゲル 1 枚	ミニゲル 4 枚、ワイドゲル 2 枚
転写サイズ	205(W) × 100mm(H)	205(W) × 200mm(H)
電極板	陽極 耐腐食性白金めっきチタン板	陰極 ステンレス
寸法・質量	246 × 145 × 92mm ・ 1.8kg	246 × 235 × 92mm ・ 3kg

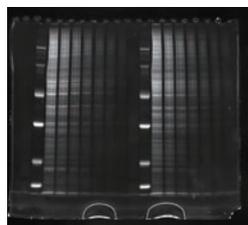
5-3. 検出

電気泳動後のゲルは、すぐには蛍光検出できません。タンパク質を可視化するために、ゲルを直接 UV 照射装置の上に置き、約 1 分間照射します。UV 波長は 312nm を使用します。いったん UV 照射で可視化したゲルの蛍光は比較的安定なので、蒸留水等でリンスしてゲルの状態を整えてから撮影すると、きれいな画像が得られ、電気泳動パターンが確認できます。



撮影装置 LuminoGraph III の UV 照射面

UV 照射で標識！



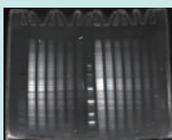
ゲル： 10% 自作ス테인フリーゲル

サンプル： HeLa および HepG2 細胞抽出液の 1/2 希釈系列

撮影装： LuminoGraph III

撮影条件： UV 光源
BPF535 フィルター
2 秒 露光

《参考》
プレキャストゲルの泳動パターン
サンプルと撮影条件は右記と同等



危険 UV を直視した場合、失明や皮膚の炎症などの危険性があります。保護眼鏡・手袋・防護服をご使用ください。

5-4. 転写

PVDF 膜は、自家蛍光の低い蛍光検出用の PVDF 膜を使用します。転写方法は 5 ページ『4-4. 転写』を参照してください。

5-5. 転写効率の確認 (蛍光検出)

可視化処理をしたス테인フリーゲルは、転写後の PVDF 膜上のバンドもゲルと同様に蛍光検出できます。PVDF 膜上のタンパク質バンドのシグナル強度をトータルタンパク質としてノーマライズに利用することが可能です。ノーマライズに関しては 8 ページ『6. トータルタンパク質によるノーマライズ』を参照してください。



撮影装置 LuminoGraph III

各レーンの全バンドのシグナル
⇒トータルタンパク質



PVDF 膜： 低蛍光用 PVDF 膜
撮影装： LuminoGraph III
撮影条件： UV 光源
BPF535 フィルター
1 秒 露光

実験材料： 泳動後のゲル (ス테인フリーゲル使用)
LuminoGraph III もしくは
Luminograph I/II などの撮影装置
[UV 光源 (312nm) とフィルター]

実験方法：
ゲルの可視化

- ① 泳動終了後のゲルを、ゲルプレートを外さず水でガラス表面を軽く洗浄し、ペーパータオルで水気を拭きとります。
- ② UV 照射装置の上に蒸留水を 1~5mL 滴下します。
- ③ ゲルをプレートから外し、UV 照射装置に滴下した水滴の上に載せます。
※ゲルをリンス・洗浄しないでください。シグナルが弱くなります。
※ UV の波長が異なると可視化されない原因になります。
※ UV 照射光源を直視・接触しないようにご注意ください。
※ゲルを可視化するための工程なので、照射面にゲルを整えて置く必要はありません。またゲルが破れやすいので注意してください。
- ④ UV 照射装置を点灯し、ゲルを約 1 分間、照射します。
- ⑤ UV 照射後、蒸留水等でリンスしてゲルの状態を整える。

ゲルの撮影

- ⑤ 撮影装置の UV 光源とフィルターをセットします。

撮影装置	光源	フィルター
LuminoGraph I/II など	UV (312nm)	SWP フィルター (UV / 近赤外カット)
LuminoGraph III	UV (312nm)	BPF535

- ⑥ ゲルを UV 照射面もしくは専用のトレイに置いて撮影します。
※ UV 照射面をきれいにしてから撮影してください。
※ UV 照射面の水垢汚れはくえん酸水溶液を使用すると落とせます。

実験材料： 転写後の PVDF 膜 (ス테인フリーゲル使用)
LuminoGraph III もしくは
Luminograph I/II などの撮影装置
[UV 光源 (312nm) とフィルター]

実験方法：

- ① 転写終了後の PVDF 膜を蒸留水等で軽く洗浄します。
- ② 撮影装置の UV 光源、フィルターを準備します。

撮影装置	光源	フィルター
LuminoGraph I/II など	UV (312nm)	SWP パスフィルター (UV / 近赤外カット)
LuminoGraph III	UV (312nm)	BPF535

- ③ PVDF 膜を UV 照射面もしくは専用のトレイに置いて撮影します。
※ PVDF 膜は汚れないように十分注意して取り扱ってください。
※ UV 照射により励起する場合、PVDF 膜は濡れている方が、バックグラウンドが低くなり、バンドを明瞭に検出できます。撮影中に乾燥しないようにご注意ください。
※ピタットクリアやラップに挟むと、バックグラウンドが高くなる場合がありますので、ご注意ください。

トータルタンパク質によるノーマライズ方法

6. トータルタンパク質によるノーマライズの方法

6-1. トータルタンパク質によるノーマライズ

EzLabel FluoroNeo やステインフリーゲルなどを使用して検出したトータルタンパク質をリファレンスとしてノーマライズします。リファレンスには PVDF 膜上の各レーンの転写されたタンパク質の総量（輝度値）を使用します。

6-2. ノーマライズの手順

EzLabel FluoroNeo を使用する場合も、ステインフリーゲルを使用する場合も、同様の方法で画像を解析します。ノーマライズに必要な画像は PVDF 膜上に転写されたトータルタンパク質のバンド（蛍光像または色素染色した場合は明視野像）と抗体反応後のターゲットタンパク質のバンド（発光像あるいは蛍光像など）です。まず PVDF 膜上のトータルタンパク質の各レーンのバンド全体のシグナル強度を、続いてターゲットバンドのシグナル強度を定量します。ここでは画像解析ソフト CS Analyzer 4 を使用して解析する方法を紹介します。解析手順としては①～③の手順で行います。

- ① PVDF 膜上のトータルタンパク質検出画像のスポット解析
- ② ターゲットタンパク質の検出画像のスポット解析
- ③ ノーマライズ計算

スポット計測によりノーマライズ

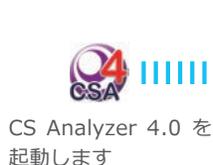
①トータルタンパク質の解析

②ターゲットタンパク質の解析

③ノーマライズ計算

6-3. トータルタンパク質の解析

まずノーマライズ換算するためのリファレンスとなるトータルタンパク質を検出した蛍光撮影画像をスポット解析します。



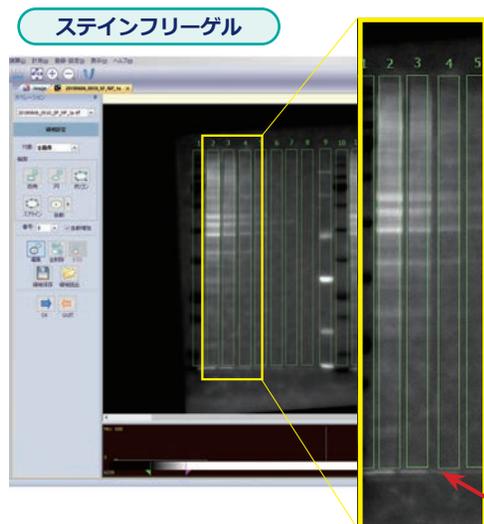
ウェスタンブロットティングのノーマライズでは主にスポット解析を使用します。

① 各レーンの輪郭を囲む

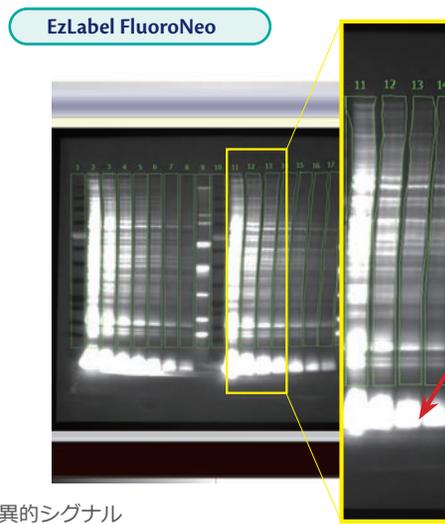
各レーンの輪郭を『領域設定』⇒『四角』あるいは『ポリゴン』などを選択して囲みます。レーンが曲がっているときは、『ポリゴン』の方がより正確に囲むことができます。

またレーンの輪郭を囲む際は、泳動先端が含まれないようにします。泳動先端には BPB などの色素由来の非特異的なシグナルなどが含まれており、トータルタンパク質量を必ずしも反映しません。特に EzLabel FluoroNeo でラベルした場合は、ゲル濃度が高いとサンプル中の夾雑物やアミノ酸由来の非特異的なシグナルが泳動先端に検出されますので、その部分を除いて囲みます。

CS Analyzer 4 でノーマライズ解析する際は、リファレンスタンパク質の解析データとターゲットタンパク質のレーン番号が一致している必要があります。



非特異的なシグナル



『ポリゴン』を使用するとレーンがゆがんでいても囲めます。

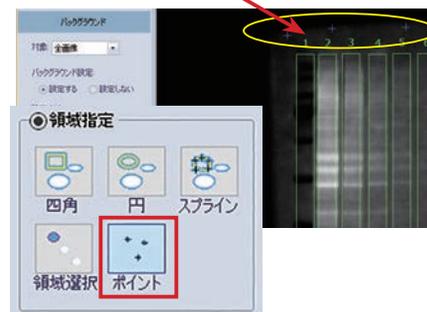
サンプル中の夾雑物やアミノ酸由来の非特異的なシグナル

※ TCA 沈殿などにより、あらかじめ除去することも可能です。

② バックグラウンドの設定

①で囲んだ領域以外の PVDF 膜の余白部分にバックグラウンドを設定します。『四角』や『領域選択』でスポットと同様の領域を設定する、または『ポイント』によりレーン以外の余白に複数のポイントを設定する、などの方法があります。

『ポイント』により設定



③ 解析およびデータ保存

解析ボタンをクリックしてバンドのシグナル強度を数値化し、さらに『解析情報保存』ボタンをクリックして解析結果を保存します。解析後のデータは CSV 形式でも出力できます。



計測結果が表示される。コピー＆ペースト、もしくは CSV 形式での出力、解析データの保存が可能



ノーマライズにデータを使用する場合は、必ず、解析情報を保存する。

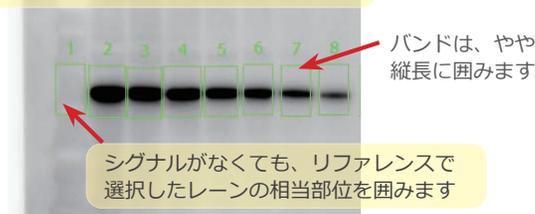
6-4. ターゲットタンパク質の解析

次に抗体反応によりターゲットタンパク質を検出した発光（蛍光など）撮影画像をスポット解析します。解析方法はトータルタンパク質の解析方法と同様です。

① バンドの輪郭を囲む

スポット解析により、ターゲットタンパク質のバンドの輪郭を『四角』あるいは『ポリゴン』を選択して囲みます。特に発光撮影画像はコントラストによりバンドの強さと大きさが影響されますので、ある程度コントラストを上げた状態でバンドを囲むようにします。また、このとき、トータルタンパク質解析で設定したレーンの番号と解析する対象のバンドの番号は同じにしてください。ターゲットのバンド番号とノーマライズするレーン番号がずれると、バンド番号と同じ番号の別レーンのデータで誤った補正がされることとなります。

ターゲットタンパク質のバンドを囲む。
(トータルタンパク質で設定した全レーン)



② バックグラウンドの設定

①で囲んだ領域以外の PVDF 膜の余白部分にバックグラウンドを設定します。『四角』や『ポリゴン』でスポットと同様の領域を囲むか、『ポイント』を利用してレーン以外の余白に複数のポイントを設定します。



ちょっと紹介
関連製品

LuminoGraph III ルミノグラフ III

最高の画質でデータを残せるハイエンドケミルミ撮影装置

- ✓ 10 インチタッチパネル制御による簡単操作
- ✓ 超高感度・高解像度 6 メガピクセル冷却 CCD カメラ搭載
- ✓ 蛍光・発光・可視光など多種多様なサンプルの撮影に対応
- ✓ オートフォーカス・自動露光・積算撮影など多彩な撮影モード
- ✓ フラットフィールド・ディストーション補正・ダークイメージ処理対応



名称	WSE-6300H-CP LuminoGraph III
カメラ	絶対感度校正 高感度・高解像度冷却 CCD カメラ 画素数 2750 × 2200
レンズ	F0.8 オートフォーカス (電動制御)
制御	10 インチタッチパネルからの制御
蛍光励起光源	落射 LED : Blue(472nm)/Green(528nm)/Red(615nm) 落射 LED : Cyan(505nm) 透過 UV : 312nm
可視光	白色透過光源 (LED)
フィルター	電動ホイール方式 5 ポジション 535nmBPF / 595nmBPF / 680nmBPF / ND フィルター
撮影サイズ	10 × 7.5cm / 14 × 10cm / 18 × 13cm / 26 × 20cm 4 ポジション・オートフォーカス
保存画像形式	原画像 : 16bit TIFF (8bit 別名保存可能) USB / 本体内蔵メモリ
寸法	472mm(W) × 480mm(D) × 802mm(H) , 76 kg
電源・消費電力	AC100-240V 50/60Hz 200W

トータルタンパク質 によるノーマライズ方法

③ ノーマライズ解析

ターゲットタンパク質のバンドを囲み、バックグラウンドを設定したら、『解析』ボタンをクリックしてシグナル強度を数値化します。

『ノーマライズ』ボタンをクリックして、リファレンスタンパク質（トータルタンパク質）の解析データを読み出します。

解析ボタンをクリック

ノーマライズをクリック

計測結果が表示される。コピー＆ペースト、もしくはCSV形式での出力、解析データの保存が可能

リファレンス解析データを選択する

リファレンスタンパク質の解析データが表示されますので、ノーマライズするバンドと同じ番号のトータルタンパク質のレーンをクリックして選択し『OK』します。ノーマライズの計測結果は、コピー＆ペースト、CSV形式での出力、もしくは解析データとして保存できます。

ターゲットタンパク質の解析中データ

バックグラウンドに指定した領域

①ターゲットタンパク質のバンドを囲む。(トータルタンパク質で設定した全レーン)

②解析ボタンをクリックする。

③ノーマライズボタンをクリックし、トータルタンパク質（もしくはHKP）の解析データを読み出す。

ノーマライズに使用するトータルタンパク質の解析済データ

同じ番号のレーンを選択する

④解析するターゲットタンパク質のバンドの番号と同じレーンを選択する。

⑤ノーマライズ後の計測結果（ノーマライズ値）が表示される。計測結果は直接コピー＆ペースト、CSV形式による出力、もしくは解析データとして保存できる。

ノーマライズ後の計測結果

④ ノーマライズ値の定量解析

ノーマライズ結果を相対値として換算する場合は『定量』ボタンをクリックします。基準となるバンドをクリックして選択し『OK』します。『ノーマライズ値』を選択し、『1（もしくは任意の数）』と入力します。ノーマライズ値が相対値として換算されますので、コピー＆ペースト、CSV形式による出力、もしくは解析データとして保存します。

ノーマライズ後の相対値換算

定量ボタンをクリックし、基準となるバンドを選択する（相対値として『1』になる）。

『ノーマライズ値』を選択し、相対値として『1』を入力する。

ノーマライズ後の計測結果

保存・出力

解析情報保存

レポート

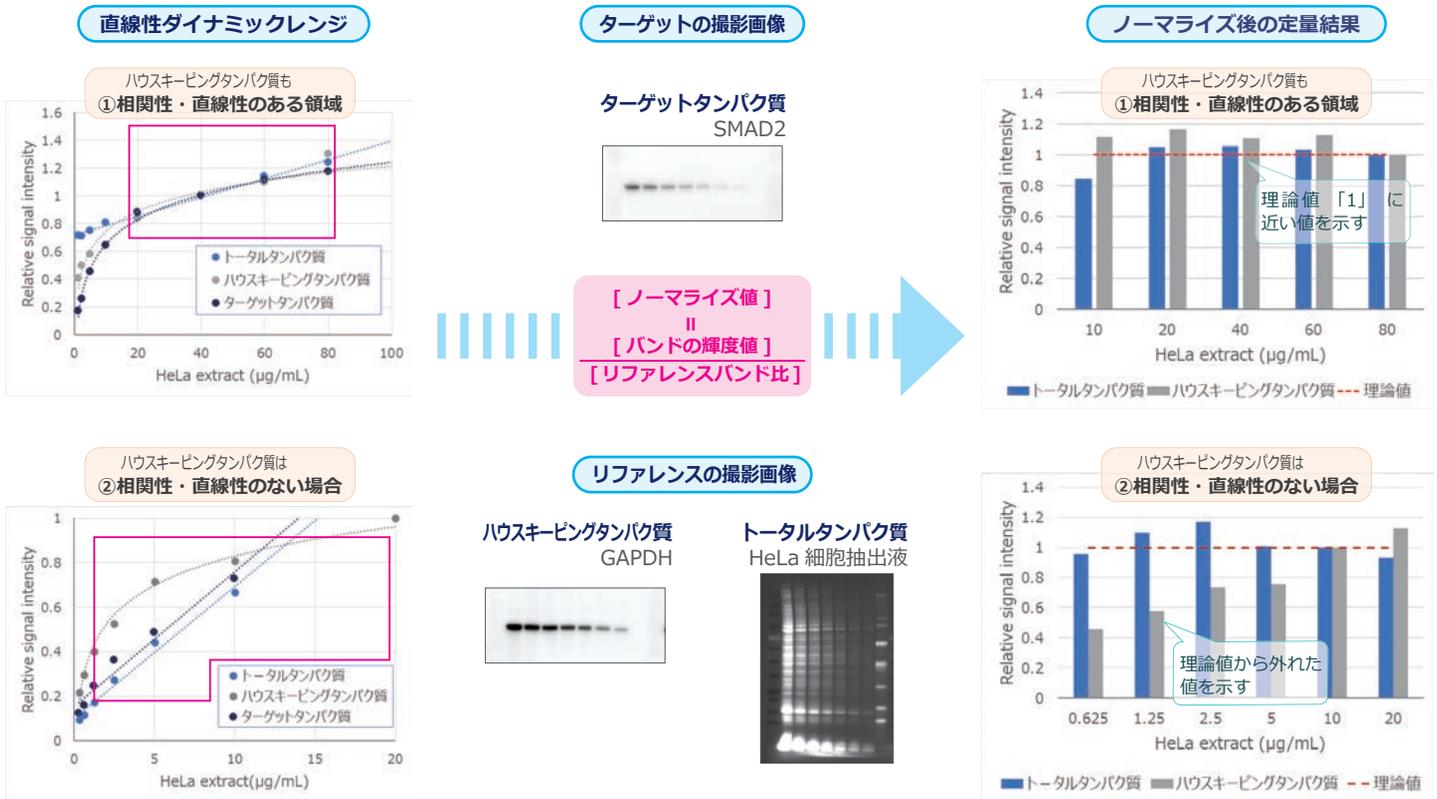
平均輝度：指定した領域の輝度の平均値（ノーマライズ前）
 積算値：指定した領域の輝度の総和（ノーマライズ後）
 定量値（ノーマライズ値）：ノーマライズ後の積算値の相対値
 ノーマライズ値：ノーマライズ後の積算値
 Ref. スポット比：リファレンスとなるトータルタンパク質の相対比

ノーマライズ解析結果

7. ノーマライズ解析結果

7-1. トータルタンパク質とハウスキーピングタンパク質によるノーマライズ定量結果の比較

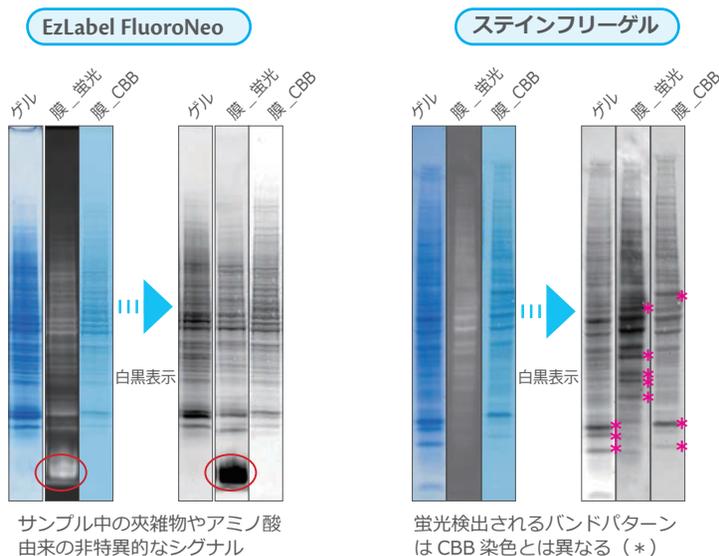
下図は EzLabel FluoroNeo でラベルした HeLa 細胞抽出液からウェスタンブロッティングにより SMAD2 タンパク質を検出したデータです。1/2 希釈系列したサンプル中の SMAD2 タンパク質の発現量を、トータルタンパク質およびハウスキーピングタンパク質でノーマライズした結果を示しています。



上図①のようにターゲットタンパク質とリファレンスタンパク質の検量線が直線で相関性が高い場合は、トータルタンパク質でもハウスキーピングタンパク質でも、ノーマライズした結果は理論値の 1 に近い値を示します。しかし一般的に②のようにハウスキーピングタンパク質は発現量が豊富なため、ターゲットタンパク質とは検量線の直線性ダイナミックレンジが異なります。そのためハウスキーピングタンパク質によりノーマライズした結果は理論値から外れる場合があります。

7-2. EzLabel FluoroNeo とステインフリーゲルによるサンプル標識の比較

EzLabel FluoroNeo とステインフリーゲルにより検出したバンドを、ゲル、転写後の PVDF 膜の蛍光検出像 (膜_蛍光)、と CBB 染色像 (膜_CBB) で比較した結果を示しています。バンドを比較しやすいように、各イメージをグレースケールで表示しています。



『膜_蛍光』のレーンは、EzLabel FluoroNeo もしくはステインフリーゲルの蛍光色素で標識されたバンドを検出した結果を示しています。EzLabel FluoroNeo で検出すると (左図)、泳動先端にサンプル中のアミノ酸などに由来する非特異的なシグナルが見えますが (赤丸で表示)、検出されるバンドの数やシグナルの強さは、ほぼ同等です。EzLabel FluoroNeo は第 1、第 2 アミンが標識されるため、ほぼ全てのタンパク質が同等に標識されるためです。一方、ステインフリーゲルはアミノ酸のうちトリプトファンが標識されるため、トリプトファンの有無や数によりシグナルの強さが変わります。そのため、蛍光検出と CBB 検出でバンドパターンがやや異なります。* で示したバンドは、蛍光検出と CBB 検出で検出感が顕著に異なるバンドを示しています。

関連製品

主な既製ゲル

コードNo.	製品名	ゲル濃度	分画範囲	検体数	アプライ量	入数	価格
2331970	EHR-T520L	5-20%	5~400kDa	14検体	最大24μL	10枚	17,400円
2332070	EHR-R520L	5-20%	5~400kDa	18検体	最大18μL	10枚	17,400円
2332260	P-T16.5S	16.5%	1~75kDa	14検体	最大24μL	10枚	20,400円
2332265	P-R16.5S	16.5%	1~75kDa	18検体	最大18μL	10枚	20,400円
2331605	CHR-520L	5-20%	5~400kDa	15検体	最大7.5μL	10枚	20,400円
2331695	CP16.5S	16.5%	1~75kDa	15検体	最大7.5μL	10枚	20,400円
2332240	M-520L	5-20%	5~400kDa	30検体	最大20μL	6枚	17,400円

電気泳動用ランニングバッファ

コードNo.	型式名称	数量	価格
2332310	AE-1410 EzRun	1袋 10 L分の粉末 Tris-Glycine-SDS 高速泳動対応	5,720円
2332325	AE-1415 EzRun T	1袋 5L分の粉末 低分子用 Tris-Tricine-SDS 高速泳動対応	8,250円
2332326	WSE-7065 EzRun MOPS	1本 20×濃縮溶液 250mL/容器 Tris-MOPS-SDS さらに高速・広範囲分子量域分離が可能	8,250円

分子量マーカー

コードNo.	型式名称	数量	価格
2332348	WSE-7025 EzStandard LMW 100μL(20×) SDS-PAGE用低分子マーカー	1本	16,500円
2332346	WSE-7020 EzProtein Ladder 250μL×2本 SDS-PAGE用有色マーカー	1組	23,100円

サンプル調製用試薬

コードNo.	型式名称	数量	価格
2332336	WSE-7420 EzRIPA Lysis kit	1組 動物細胞用抽出液:100mL プロテアーゼインヒビター&フォスファターゼインヒビター付	10,780円
2332339	WSE-7423 EzBactYeast Crusher	1組 大腸菌・酵母用抽出液:100mL プロテアーゼインヒビター& DNase付	16,280円
2332330	AE-1430 EzApply	1組 SDS-PAGE用サンプル調製バッファ 5 mL × 5回分	8,580円
2332333	WSE-7010 EzLabel FluoroNeo	1組 タンパク質用蛍光ラベル化&泳動サンプル調製:2000サンプル分 分子量マーカー付	33,000円

ブロッキング用試薬・消耗品

コードNo.	型式名称	数量	価格
2322443	WSE-4057 QBlot kit M	1組 ろ紙、PVDF膜、転写バッファ不要 10回分のミニサイズゲルのトランスファーパック	18,480円
2322451	WSE-4051 クリアプロット・P+膜	1箱 ミニサイズゲル用カット済 PVDF膜 85×90mm 0.2μm 20枚 (その他サイズ有)	18,700円
2322506	WSE-4061 クリアプロットP膜 (低蛍光)	1箱 ミニサイズゲル用カット済 蛍光検出用PVDF膜 85×90mm 0.2μm 10枚 (その他サイズ有)	19,800円
2332375	WSE-7160 EzStainAQua MEM	1箱 洗浄液 (500mL)、染色液 (500mL)、脱色液 (500mL)、完全脱色液 (500mL)	22,000円
2332595	WSE-7210 EzFastBlot HMW	1本 5倍濃縮液 500mL 高分子量タンパク質の高速セミドライブロッキング試薬	9,680円
2332590	AE-1465 EzFastBlot	1本 10倍濃縮液 500mL 高速セミドライブロッキング試薬	11,000円
2332600	AE-1460 EzBlot	1組 3液法セミドライブロッキング試薬 溶液A: 475mL, B: 475mL×2, C:475mL	14,080円

その他の関連装置

コードNo.	型式・名称	数量	価格
2311130	WSE-3100 PowerStation Ghibli I	1台 タッチパネル式電源装置	217,800円
2322197	WSE-1165 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽	1台 アクリル製ミニサイズゲル対応電気泳動槽	85,800円
2321905	AE-6530P ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽	1台 バジエル・ミニゲル対応電気泳動槽	52,800円
2322210	WSE-1170 マルチレーンゲル電気泳動槽	1台 ワイドゲル用泳動層	91,300円
2321670	WSE-1150P バジエラ Ace	1台 電源付 バジエル・ミニゲル対応泳動槽	123,200円
2322240	WSE-1010 コンパクトPAGE Ace	1台 電源付 コンパクトサイズゲル対応泳動槽	112,200円
2322466	WSE-4025 ホライズプロット2M	1台 ミニゲル2枚対応プロッター	123,200円
2322476	WSE-4045 ホライズプロット4M	1台 ミニゲル4枚対応プロッター	154,000円
2322496	WSE-4125 パワードプロット2M	1台 電源付ミニゲル2枚対応プロッター	206,800円

本誌記載の価格(税抜き)および製品仕様は予告なく変更する場合がありますので、ご了承ください。最新の情報などにつきましては当社ホームページでご確認ください。



アトー株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

主要製品

- 発光・蛍光イメージングシステム
- 画像解析ソフトウェア ●電気泳動装置
- 電気泳動関連試薬 ●ウエスタンブロット試薬
- ペリスタポンプ ●細胞培養・観察システム

- 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2 ☎(03)5827-4861(代表) ☎(03)5827-6647
- 大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 ☎(06)6136-1421(代表) ☎(06)6356-3625
若杉センタービル別館 5F
- 技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎(03)5818-7560(代表) ☎(03)5818-7563
◆メンテナンスサービスグループ ☎(03)5818-7567(代表) ☎(03)5818-7563

■URL <http://www.atto.co.jp/> お問い合わせ WEB会員登録の上お問い合わせフォームをご利用ください。