

化学発光検出器を用いたウエスタンブロッティング検出条件の最適化

福井医科大学実験実習機器センター 岸本由香 田中幸枝 松川茂

【目的】

近年、核酸や蛋白質をブロッティングしたメンブレンやマイクロプレートからの化学発光シグナルを冷却 CCD カメラで捕捉し、その画像をコンピュータで解析する化学発光検出システムが各社から開発、販売されている。

当大学でも平成 10 年 3 月より、化学発光検出器を設置し（図 1）現在ウエスタンブロッティングの検出に主に利用されている。しかし、化学発光検出器で取り込んだ場合、現在使用されている検出試薬のアマシャムファルマシアの ECL 試薬では、従来の X 線フィルムに比べ若干劣る結果になっている。そこで今回、化学発光検出器における条件をウエスタンブロッティングを中心に検討し、高感度検出することを目的とした。

1. 【装置について】

化学発光装置を使用する利点は（1）従来の X 線フィルムに必要な暗室や現像操作が不要であること、（2）取り込んだ画像データの定量がそのまま解析ソフトで行えることにある。

表 1 は、各社から販売されている代表的な化学発光装置の特性をまとめたものである。各社の化学発光装置の特長は、CCD カメラの画素数、ピクセルサイズ、カメラの性能、データビット数、ピニングはどうかなどにあらわれている。当センターで設置したのはアルファ・イノテック社製 Chemi-Imager4000 である。

表 1：機器一覧

	ALPHA	A 社	B 社	C 社	D 社
型式	Chemi-Imager 4000	AE-6960/C/FC	LAS-1000	コダック IS440	ChemIDoc
撮像素子	0.5 インチ	0.5 インチ	1 インチ		
画素数	39 万画素	39 万画素	130 万画素	44 万画素	38 万画素
画素サイズ (μm)	9.6 × 8.9		11 × 11	11.6 × 11.4	8.4 × 9.8
冷却温度	室温より - 60 まで	- 10 まで	- 30 まで	室温より - 40 まで	- 40 まで
露出モード	通常・連続	通常・積算・連続 自動飽和検知	通常・逐次・連続選択		AUTO
レンズ	F1.2	F1.0	F0.85 高感度レンズ		
直線性	2.3OD	3 桁	4 桁	3.8 桁	
階調数	8bit (256)	12bit (4096)	14bit (16384)	単一取り込み 12bit	8bit (256)
最大サンプルサイズ	21cm × 35cm	20cm × 15cm	25cm × 25cm	20cm × 25cm	25cm × 25cm

図 2 は、カメラの光の波長における量子効率をあらわしたものである。実線で表したのが、ケミ・イメージャーのものである。これを見ると、量子効率が最も高い所（約 40%）は 500nm 付近であり、主に使われているウエスタンブロッティングの反応試薬である ECL の放出光の極大波長（428nm）での量子効率は 25% 程度と低くなっていることがわかる。428nm での他社カメラの量子効率と比べると、むしろ高い値で、ECL 型発光に適しているといえる。

量子効率とは光子が何ヶの電子に変換されるかを示す。



図 1：Chemi-Imager4000

化学発光検出部、解析部、出力装置、CCD カメラの冷却剤循環装置からなる

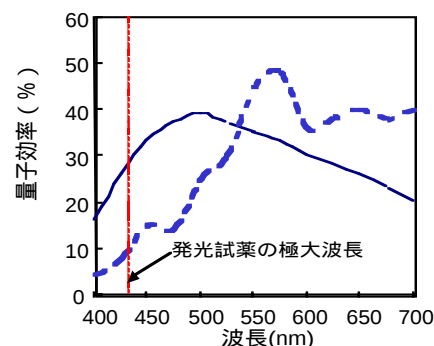


図 2：カメラの量子効率

実線はケミ・イメージャー。破線は他社メーカー。

2. 【試薬について】

ウエスタンブロッティングに使用されている検出試薬について検討した。今回は、HRP（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）標識抗体の検出に特化してあるアマシャムファルマシアから販売されている ECL、ECLplus、和光から販売されている ImmunoStar、ピラスから販売されている SuperSignal West Femto を検討した。和光から販売されている ImmunoStar は ABC 増感試薬を外し、セットになっている発光試薬のみを用いて比較した。

2. 1 「発光原理」

図 3 に ECL 系、ECLplus の発光原理を模式化したものを示した。

ECL はアルカリ条件下における HRP と過酸化水素によって触媒されるルミノール酸化反応を利用したもので、ルミノールは酸化されると直ちに励起状態となり、基底状態へと減衰する過程で光を放つ。このとき、フェノール環を持つ化合物（エンハンサー）が存在すると光の放出が高まり、放出時間も長くなる。この時の放出光の極大波長は 428nm である。ImmunoStar もこの原理によるもので、エンハンサーとして用いられている物質の違いによって、発光強度が異なっていると思われる。

ECLplus は ECLplus 基質が HRP により酸化されると、アクリジウムエステルを生成する。このエステルはアルカリ条件下で、過酸化水素と反応し、極大波長 430nm のケミルミネセンスを生じる現象を利用している。

SuperSignal West Femto はこれらと異なる新たな発光基質による反応ということであるが詳細は公開されてはいない。

2. 2 「発光強度」

それぞれの発光試薬 1 ml に対して、1000 倍希釈した 2 次抗体の HRP-標識 anti-rabbit Ig を 100 μ l 混合、直接発光スペクトル（図 4）を島津蛍光分光光度計（RF-5000）で測定した。各極大波長は 430nm 付近とほぼ同じ値であるが、蛍光強度の値は違いがある。即ち ECL では最大値がおおよそ 1.4、ImmunoStar では 5、ECLplus では 125、SuperSignal West Femto では 460 となっている。

2. 3 「発光の経時変化」

各発光試薬 100 μ l に対して、1,000 倍から 512,000 倍まで段階希釈した 2 次抗体の HRP-標識 anti-rabbit Ig を 10 μ l 混合し、ケミ・イメージャーで 1 フレームの露光時間を 2 分

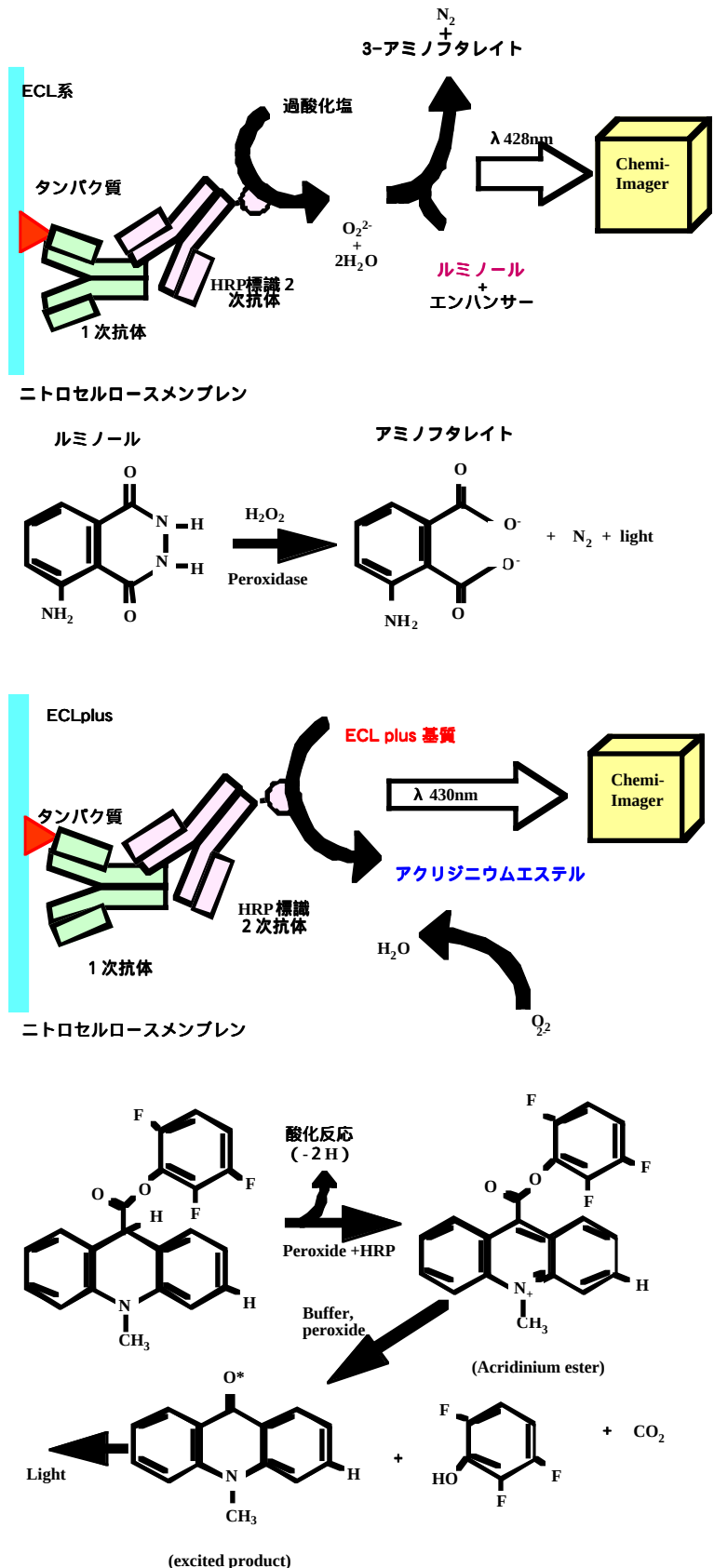
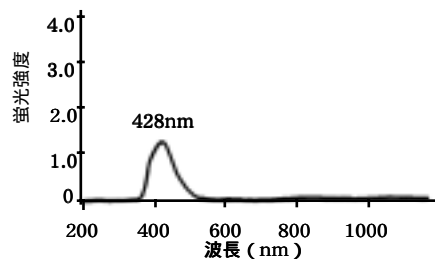


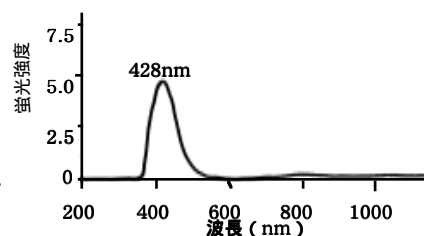
図 3：発光原理図

に設定し、20 フレーム連続して取り込む movie モードで検出し、その画像から発光強度を定量し、縦軸に発光強度、横軸にフレーム数を取り、プロットした。ECL では発光強度が低く、反応 40 分後(20 フレーム後)にはかなり減衰していることがわかる。ImmunoStar では、ECL に比べ、初期発光強度は高いが減衰は著しく速い(5 分以内)相と遅い相からなっている。これらに対して、ECLplus では高い発光強度、長い持続が特徴である。また、SuperSignal West Femto は、ECLplus よりもさらに発光強度が強く、他社製品に比べて、反応が長く続くグロー型といわれているが、その傾向が表れている。

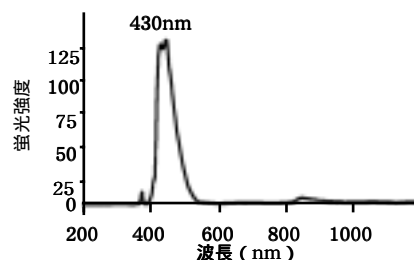
ECL



ImmunoStar



ECLplus



SuperSignal West Femto

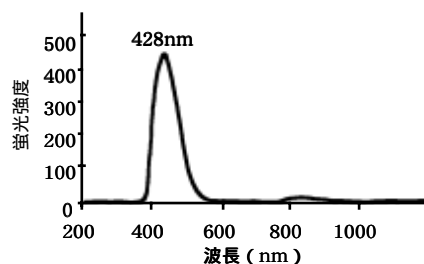
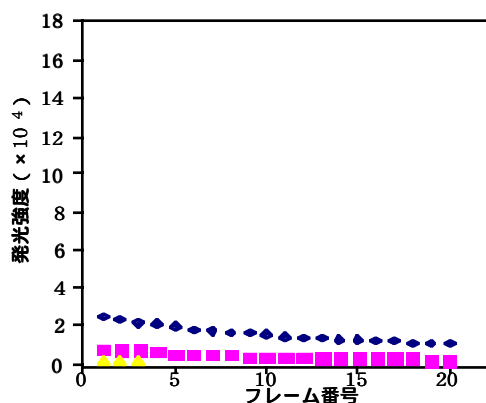


図 4：各試薬の発光強度

ECL



ImmunoStar

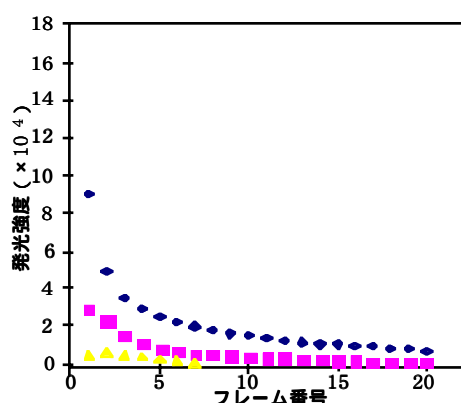
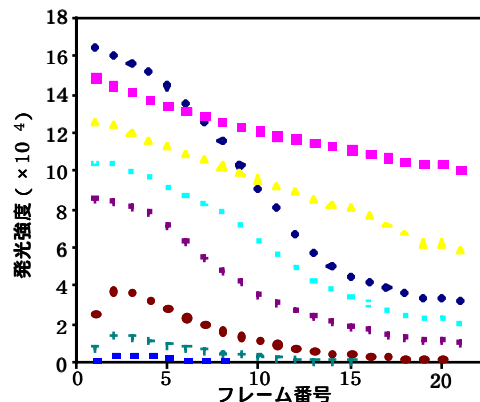


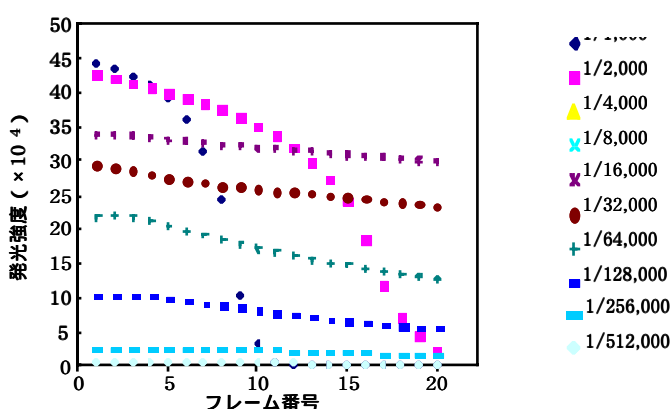
図 5：各試薬の発光特性

96穴ブラック型プレートのウエルに反応試薬100 μ lを入れ、希釈系列のHRP-Igを10 μ l添加混合直後から movie モードで検出した。HRP 抗体が過剰になると ECLplus や SuperSignal West Femto では発光が異常な経時変化を示すようになる。これは高い酵素活性のために基質の消費が著しく速く、反応産物ができなくなったか(SuperSignal West Femto) 反応中間体が安定化したためではないか(ECLplus)と考えられる。

ECLplus



SuperSignal West Femto



3.【ウエスタンブロッティング検出における各種条件の検討】

実際のウエスタンブロッティングでの条件を検討するため、Dr.Western(オリエンタル酵母proteinAのIgG結合ドメインA-Bが1～6回繰り返された構造を持つ6種の人工蛋白をE.coliで発現させ、それぞれIgG固定化カラムで精製後、マーカーとして利用できるように混合した物)をサンプルとして電気泳動(10%アクリルアミドゲル 40mA × 40min)、メンブレンへのトランスファー(42mA × 45min)、メンブレンのブロッキング(5%スキムミルク overnight)、抗体反応(室温、1時間)、各発光試薬との反応、検出(ケミ・イメージャーで5min露光)という手順で進めた(図6)。

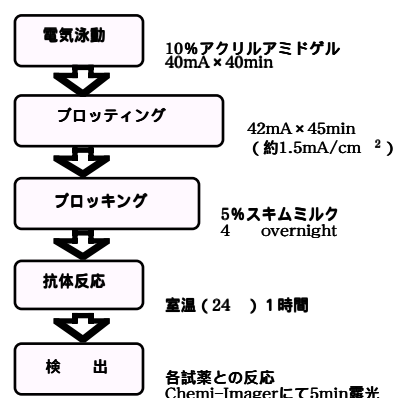


図6：ウエスタンブロッティング検出における各種条件検討の手順

3.1「メンブレンとブロッキング剤の組合せ」

高感度の試薬を使用する場合、メンブレン上に目的以外の蛋白が少量でも残っているとそれがバックグラウンドになる。目的以外の蛋白が残る原因は、ブロッキング、洗浄にあると考えられるため、ブロッキング剤とメンブレンの種類の組み合わせについて検討した。

ニトロセルロースメンブレン(Bio-Rad)とPVDFメンブレン(Millipore, Bio-Rad, Atto, Pharmacia)を5%スキムミルク、3%BSAでブロッキングし、5000倍希釈の2次抗体をかけ、室温で1時間置いた後、リンスのみでそれぞれの発光試薬を反応させ、ケミ・イメージャーで30分取り込んだ。得られた画像データから、発光強度を定量し、メンブレンごとに比較した(図7)。

この結果を各試薬ごとにメンブレンとブロッキング剤の組み合わせで検討した結果、ニトロセルロースメンブレンとPVDFメンブレン(Millipore)を5%スキムミルクでブロッキングした組み合わせがいずれの発光試薬においても比較的バックグラウンドが小さいことが判明した。今回は取り扱いも楽な、ニトロセルロースメンブレンを用いることにした。また、蛋白の保持量が多いPVDFメンブレンを用いて高感度検出する場合は、Millipore製メンブレンが中でも適していることを示す結果となった。

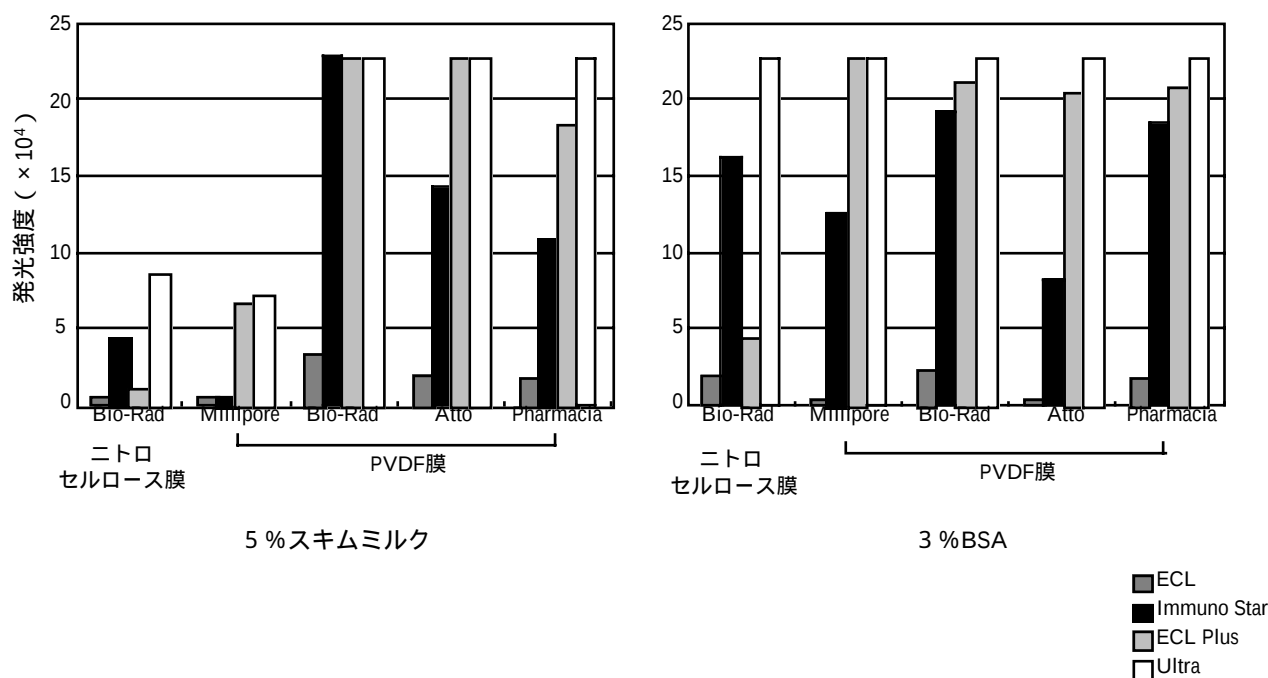


図7：メンブレンとブロッキング剤の組合せ

3. 2 「各反応試薬と2次抗体の希釈倍率」

図5のデータをもとに、縦軸に5フレーム分(10分間)の発光強度の加算値、横軸に2次抗体(HRP標識anti-rabbit Ig)の希釈倍率を取り、各試薬ごとに値をプロットし、両者の関係を得た(図8)。グラフの下に実際のウエスタンブロッティングの検討で得られた各試薬の測定適合範囲をバーで表した。斜線部分はこの装置においてバックグラウンドが高くなる測定実用不適範囲であることが判明した。図9には、この測定適合範囲内で検出した実際の画像結果をそれぞれの試薬について示した。実際のウエスタンブロッティングにおいても試薬特性のところで示したように発光強度の強いECLplus、SuperSignal West Femtoで高感度検出が可能となった。

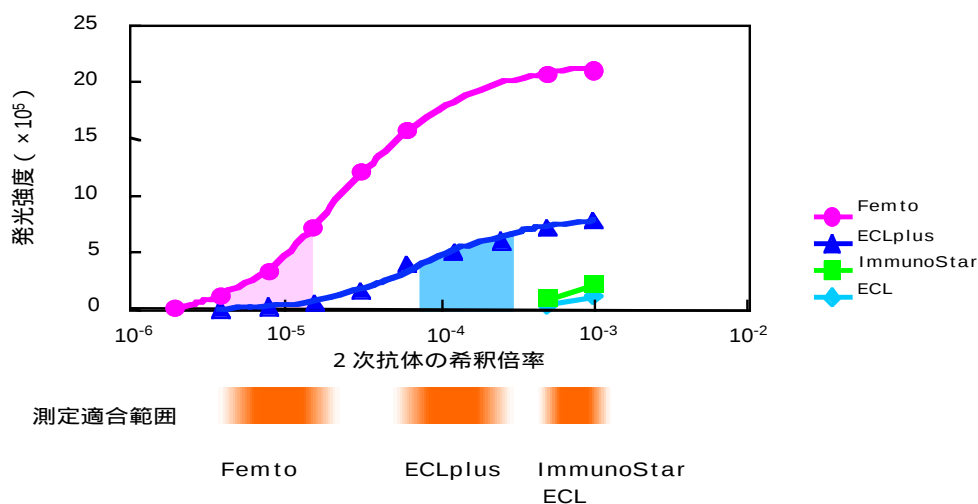


図8：発光強度の加算値と測定適合範囲
グラフ中の斜線部分は実用不適範囲を示す。

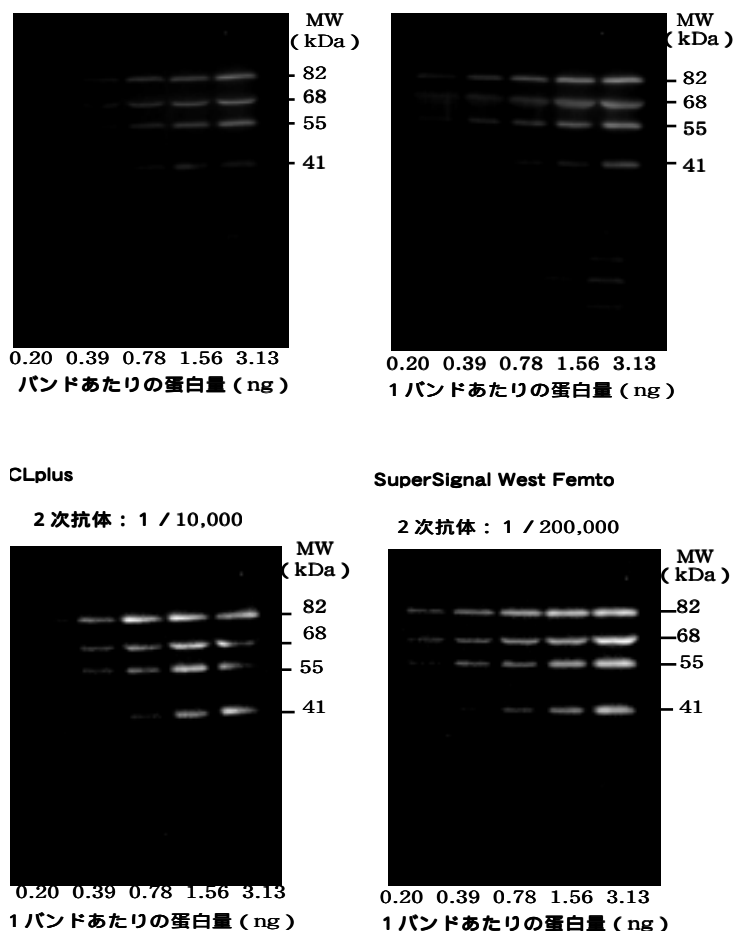


図9：ケミ・イメージャーによるウエスタンブロッティング検出像

各試薬で反応後、ケミ・イメージャーによる5分露光の像。
1バンドあたりの蛋白量は右のレーンより3.13、1.56、0.78、0.39、0.20 (ng)となっている。2次抗体の希釈倍率は、ECL、ImmunoStarは1000倍、ECLplusは10,000倍、Super Signal West Femtoは200,000倍になっている。

【まとめ】

- 1 . ルミノール発光系 (ECL、ImmunoStar) は発光が弱く、持続時間が短命である。改良型の ECLplus は中間型の発光強度と持続時間を持つ。また、グロー型発光の SuperSignal West Femto は強発光で持続安定型であることがわかった。
- 2 . 化学発光検出装置の検出感度はカメラや CCD 素子の性能によるところが大きいといえるが、システム化されると、他の要因 (たとえばレンズの開口数、ズームレンズの特性、密閉容器の光漏れ、試料との距離など) も絡んでくるので、実際のサンプルで測定条件を検討し、最適化する必要がある。
- 3 . 2 次抗体の希釈倍率と各発光試薬の組み合わせを最適化し、化学発光検出器の特性を生かすことにより、バックグラウンドの少ない鮮明な画像を得ることが可能になる。