

RePlexとNIR検出を用いた 総タンパク質ノーマライゼーション

高濃度ライセートサンプル中の低発現標的タンパク質の 発現解析プロトコル

ハウスキーピングタンパク質は、タンパク質の標準化（PN）においては信頼性の低い標準物質です。Simple Westernのテクノロジーを用いると、高濃度ライセートサンプルでも、迅速かつ再現性高く総タンパク質標準化（TPN）を行うことができます。

イントロダクション

Simple Western™テクノロジーを備えた**Jess™**システムは、細胞や組織溶解液中のタンパク質発現を正確に定量測定できます。Jessを用いると、正確なタンパク質発現測定のためのワークフローにTPNを簡単に実行し、いくつかの応用性の高い方法を利用することができます。

PNチャンネルを使用したTPNでは、化学発光または蛍光プローブを用いたイムノアッセイで標的タンパク質を検出し、同じキャピラリー内で総タンパク質も検出できます。一方、**RePlex**と化学発光検出を使用したTPNでは、**RePlex**を使用してイムノアッセイの抗体を除去後、化学発光で総タンパク質を検出できます。

本プロトコルでは、**RePlex**とNIR検出を使用したTPNという第三の方法について説明します。**RePlex**を使用して、化学発光もしくは蛍光プローブを用いたイムノアッセイの抗体を除去した後に、総タンパク質を検出します。**RePlex**とNIR検出を使用したTPNは、高濃度サンプル（0.5～2.5 mg/mL）に対して直線性を示し、低濃度ターゲットの分析を容易にします（**図1**）。すべてのSimple Westernアッセイと同様に、この方法も完全自動化されており、わずか数時間で結果を得ることができます。

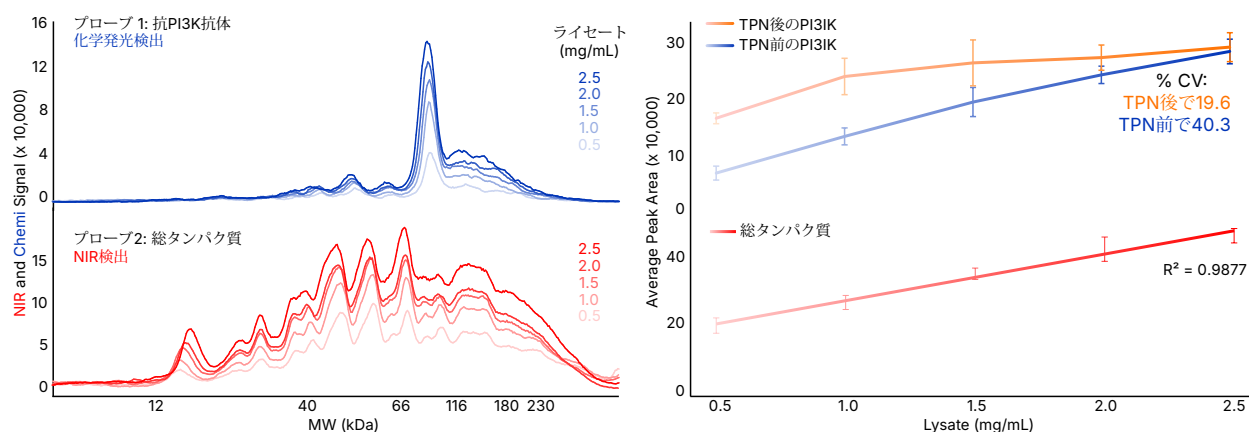


図1. ヒト小脳全組織ライセートにおけるPI3K発現（青）のSimple Western解析例。RePlexおよびNIR全タンパク質検出（赤）と、12-230 kDa 蛍光分離モジュールを使用し、信頼性の高いTPN（オレンジ）を行う。

ここで説明するプロトコルは、全細胞ライセート、脳組織、筋・骨格組織ホモジネートを用いて、低濃度のターゲットを測定するために検証されています。このプロトコルでは、高濃度タンパク質サンプル中の低濃度ターゲットを測定するためのTPNアッセイについて、アッセイの設定とデータ分析のヒントを含めて解説します。

材料と方法

RePlexとNIR検出を使用したTPNは、**Jessシステム**で測定します。**12-230 kDa**または**66-440 kDa**蛍光 Separation Module、**RePlex Module (RP-001)**、**総タンパク質Detection Module (DM-TP01)**、および**Streptavidin NIR 1.6 mL Conjugate (043-868)**を使用します。

抗体の準備

Simple Western Antibody Databaseを参照し、検証済みの抗体を見つけるか、ご自身で検証してください。新しい一次抗体を検証する場合は、まず飽和濃度を確認してください。適切にノーマライゼーションを行うためには、一次抗体がライセートの滴定に対して線形応答を示し、その範囲が総タンパク質検出シグナルの線形範囲と重ならない必要があります。詳細については、**RePlex Method Development Guide** (英文)を参照してください。同じターゲットに対して複数の抗体を評価する必要がある場合もあります。これは、抗体によってターゲットへの結合特性が異なり、TPNを歪めるような滴定勾配が生じる可能性があるためです。

一次抗体はAntibody Diluent 2で飽和濃度まで希釈し、一次抗体とready-to-useの二次抗体を氷上に置いておきます。**注: Anti-Goat Detection Moduleを使用する場合、Milk-Free Antibody Diluentを使用してください。**

サンプルの準備

還元条件下において、1X Master Mix中で、サンプルを95°Cで5分間（ほとんどのターゲットに対する一般的な熱変性設定）、または70°Cで10分間熱変性させます（サンプルの熱変性条件の最適化については**プロトコル**（英文）を参照）。

Jessプレートへの分注

Streptavidin-NIR 8μLをF列に加えます（**図2**）。プローブ1で化学発光検出を使用しない場合は、Wash BufferをJ列に1ウェルあたり170μL加えます。**注: ターゲット濃度が低い場合、化学発光検出を推奨します。**

Assayの設定とProtocolファイルの作成

サンプルの濃度希釈列を測定して、総タンパク質検出の線形範囲を特定することで、アッセイ条件を最適化します。

このプロトコルは、Compass for Simple Westernソフトウェアの標準プロトコルにはないカスタムメイドの方法でNIR検出を行っています。従って、以下に示すようなプロトコルを作成し、このアッセイを実行するたびにプロトコルファイルをインポートすることを推奨します。

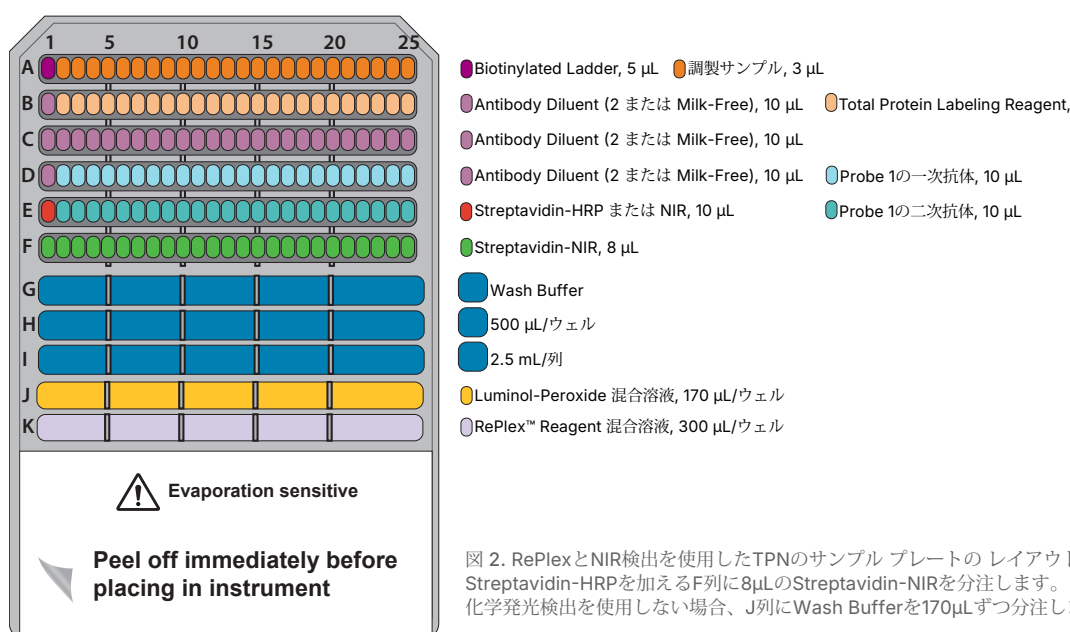


図 2. RePlexとNIR検出を使用したTPNのサンプル プレーットの レイアウト。通常 Streptavidin-HRPを加えるF列に8μLのStreptavidin-NIRを分注します。プローブ1で化学発光検出を使用しない場合、J列にWash Bufferを170μLずつ分注します。

1. Assay画面左上のFileメニューからNew Assayを選択し、New Jess Assayウィンドウで、まずRePlexを選択し、次にTotal ProteinをクリックしてOKをクリックします。
2. ProtocolタブのProbe 2の下で、Detection Profile (Chemi)列のRDRをクリックし、(...)ボタンをクリックします(図 3)。
3. RePlex Dynamic Rangeのチェックを外し、Exposure (sec)を0.1のみに変更後、OKをクリックします (図 3)。
4. Probe 2の下で、Detection Profile (NIR) 列のNoneをクリックし、オプションの(...) ボタンをクリックします(図 4)。
5. Add ボタンを6回クリックしてNIRの露光時間を追加します (図 4)。
6. NIRの露光時間を図のように設定します (図 4)。
7. OKをクリックします (図 4)。これで、RePlexとNIR 検出を使用したTPN測定のための準備が整いました!

図 3. RePlex Dynamic Range (RDR)を0.1秒の露光時間に変更

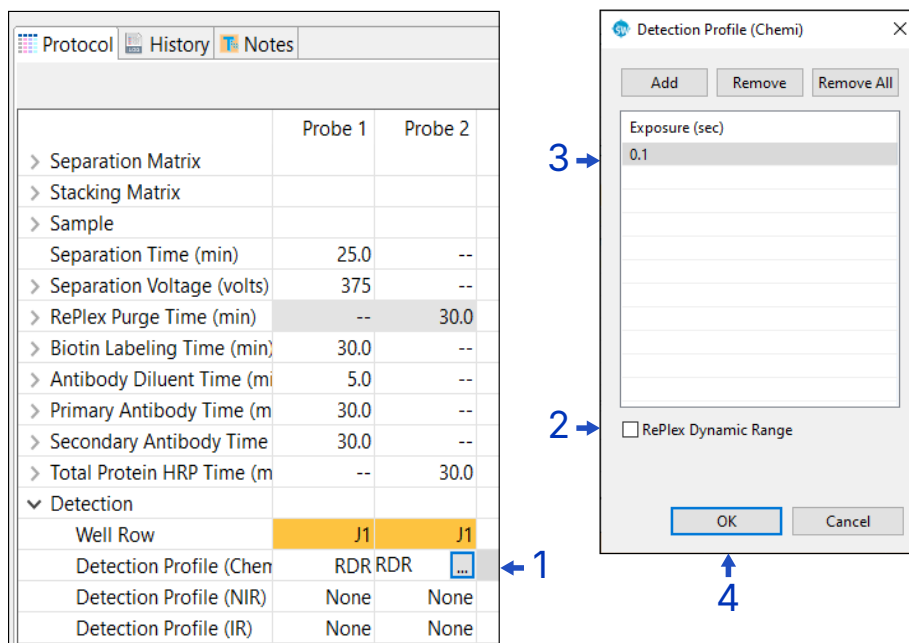
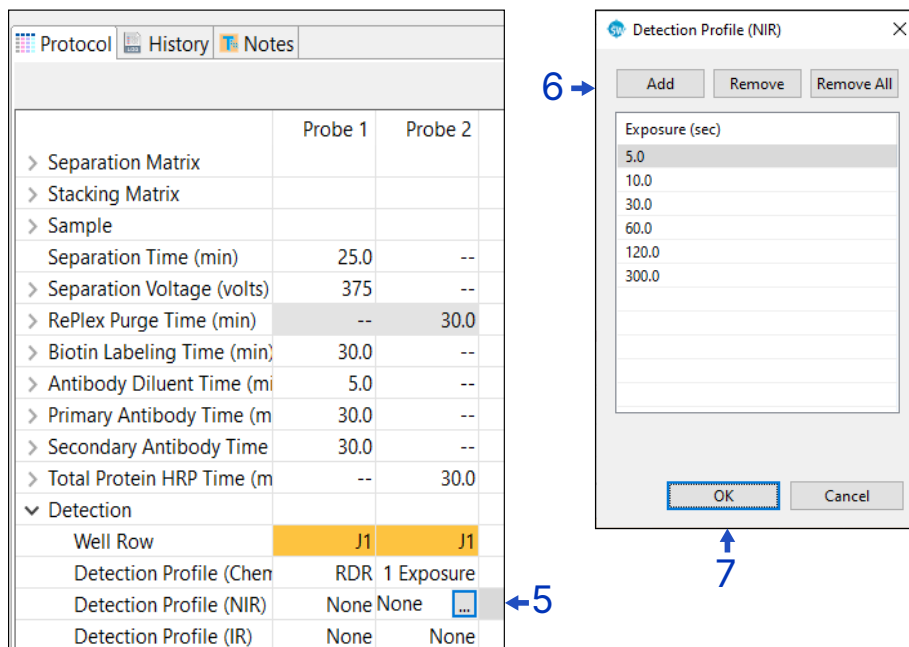


図 4. 図に示すように、RePlexの Probe 2にNIRの露光時間を追加



データ解析

RePlexとNIR検出設定を使用したTPN

最初にRePlexのProbe1（目的タンパク質）の設定を行い、次にRePlexとNIR検出を使用したProbe2（TPN）の設定を行います。これらの設定は以下の通りです。特定のターゲットに対するノーマライゼーションの影響を評価するため、2つの異なる範囲で総タンパク質面積を計算する必要があります。12-230および66-440 kDa Separation Module (それぞれ0.1 kDa～375 kDaおよび500 kDa) から得られる、目的タンパク質に最適な範囲を定義します。

ピーク図で各キャピラリーのBaseline Pointが左側の平坦な部分に正しく配置されているかを確認し、必要に応じて手動で調整します（次のページを参照）。

Peak Fit 設定

1. Editメニューから**Analysis**を選択し、次に**Peak Fit**オプションを選択します（図5）。
2. Analysis Groupsセクションで**Add**をクリックし、**fit 2**というグループを追加します（図5）。
3. Apply Overrideの下で**Add**をクリックし、2つ目のグループを追加します（図5）。それぞれのグループにProbe 1/ 2を割り当てます：

Probe 1/fit: 特定のターゲット用設定
Probe 2/fit 2: 蛍光NIR総タンパク質Area用設定
4. fit 2グループの**Range**、**Baseline**、および**Peak Find**の解析パラメータを変更します（図5）。
5. Range下の**Full View**を選択し、**Apply**をクリックします（図5）。Full Viewを適用することで、ピーク図の左端（平らな端）を正確に特定し、適切なベースラインフィッティングを行うことができます。

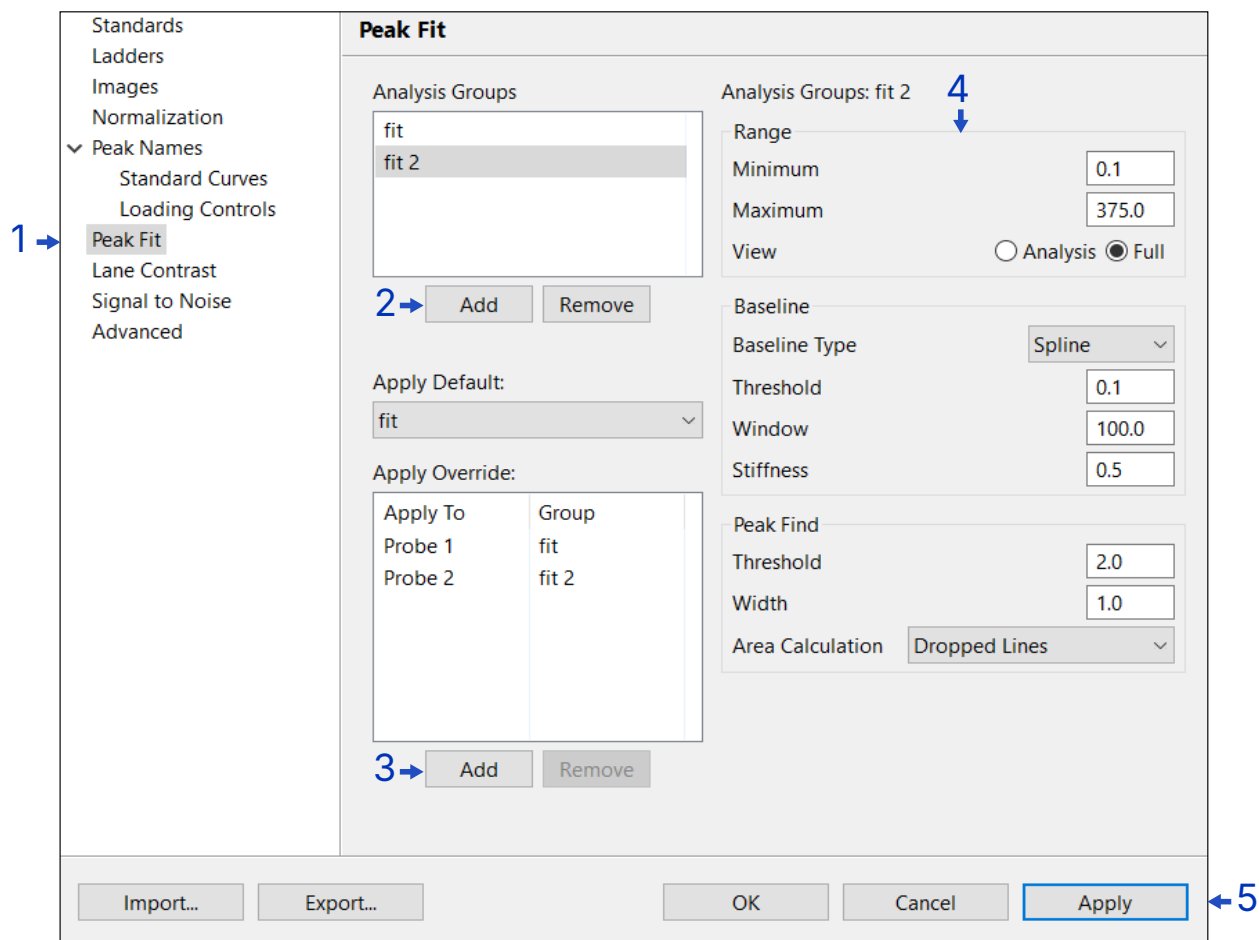


図 5. RePlexと NIR検出を使用したTPNのPeak Fit設定。

Baselineの最適化

総タンパク質のPeak Fit設定でBaselineにBaseline Pointが追加されず、Baselineが適切に設定されない場合があります。Baselineが正しく設定されていないと、ノーマライズしたデータが歪み、NIR総タンパク質面積が過大評価されることがあります。このような場合は、以下の手順に従ってください:

1. ピーク図の左側の平らな部分にBaseline pointを手動で追加し、Baselineを設定します。(図6) ピーク図の左側の平らな領域にカーソルを合わせ、右クリックして**Add Baseline Point**を選択します。
2. Baselineが正しく配置されるまで、この手順を4-5回繰り返します。

この例では、Baseline Pointを追加した後、NIR総タンパク質面積が約10%減少しました。(図6)

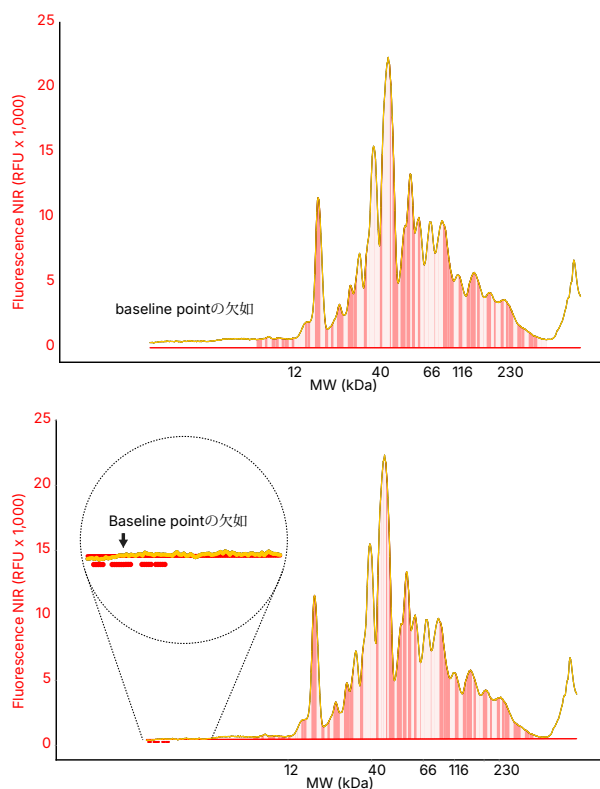


図 6. Baseline Pointが欠落している場合のNIR総タンパク質検出のピーク図 (上) とBaseline Pointを追加した後 (下) の例。

これとは逆に、Baseline Pointがピーク図の左端の平らな部分の外にある場合、Baselineに悪影響を与えるBaseline Pointの削除が必要な場合があります。図7の例では、Baseline PointがNIR総タンパク質の検出に悪影響を与え、その結果、総面積が過小評価されています。

このような場合、不要なBaseline Pointを右クリックし、**Remove Baseline Point**を選択して削除します。不要なBaseline Pointを削除しても、ピーク図の視覚的な影響はほとんどありませんが、総面積には大きな変化があります。この例では、Baseline Pointを削除した後、NIR総タンパク質面積が約10%増加しました(図7)。

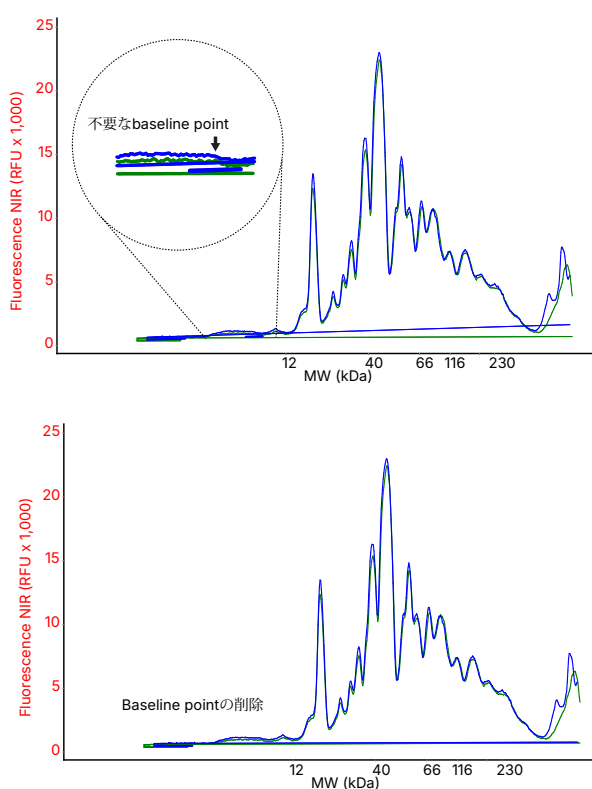


図 7. 不要なBaseline PointがあるNIR総タンパク質検出のピーク図 (上) と削除後 (下) の例。

データのエクспорт

1. Probe 1とProbe 2の解析が完了した後、**File**メニューから**Export Table...**を選択してデータをエクспортします（図 8）。
2. エクспортしたデータフォルダをダブルクリックして**Capillary Peaks Area.txt**を開き、右クリックで**Select All**を選び、再度右クリックして**Copy**を選択します（図 8）。
3. RawデータをTPN using RePlex and NIR Detection Worksheetに貼り付けることで、データのノーマライゼーションが自動的に行われます（図9）。詳細については、次ページのノーマライゼーションの計算方法を参照してください。

The figure illustrates the process of exporting data from the Compass for Simple Western software. It consists of three main parts:

- File Menu:** A screenshot of the 'File' menu with 'Export Tables...' highlighted. A blue arrow labeled '1' points to this option.
- Export List:** A list of files to be exported, including 'Capillary Groups Area.txt', 'Capillary Groups Corrected Area.txt', 'Capillary Groups Percent Total.txt', 'Capillary Groups Percent.txt', 'Capillary Groups Statistics Area.txt', 'Capillary Groups Statistics Corrected Are...', 'Capillary Groups Statistics Percent Total.txt', 'Capillary Groups Statistics Percent.txt', and 'Capillary Peaks Area.txt'. A blue arrow labeled '2' points to 'Capillary Peaks Area.txt'.
- Capillary Peaks Area.txt Table:** A screenshot of the exported table in Notepad. The table has columns: Sample, Attribute, Primary Attribute, Secondary, Scdry Attr, Capillary, CHEMI Total Area, NIR Total Area, TP Area, TPN (%), and 'P13K'. The data is organized by sample type (Human Skeletal Muscle whole Tissue Lysate) and includes various attributes and peak areas. A blue arrow labeled '3' points to the table.

図 8. Compass for Simple WesternソフトからCapillary Peak Areaの表をエクспорт。

ノーマライゼーションの算出方法

1. **TPN using RePlex and NIR Detection Worksheet**を開き、セル**A1 (黄色)** をクリックし、データをワークシートに貼り付けます (図9)。
2. このワークシートでは、NIR Total Area (オレンジ色) を使用して、Control Reference Capillary 2を基準にデータ (緑色) を自動的にノーマライズしています (図9)。

Normalization Ratio (**N列**) は、Control Reference Capillary 2 (**I26**) のNIR Total Areaを、後続キャピラリーのNIR Total Area (**I27:I49**) で割った値です。Corrected Area column (**O列**) は、ターゲットの面積 (Area) にNormalization Ratioを掛けたものです。



TPN using RePlex and NIR Detection Worksheet

QRコードをスキャンするか、[ここをクリック](#)してダウンロードしてください。

Jess RePlex TP-NIR Normalization Worksheet.xlsx - Excel															
File Home Insert Page Layout Formulas Data Review View Automate Help															
Clipboard Font Alignment Number															
T15															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	Sample	Attribute	Primary	Attribute	Secondary	Scdry Attr	Capillary	CHEMI	NIR Total	TP Area	TPN (%)	STATSb		Normalization Ratio	Corr. Area
2	CHO-S Lys 2.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:2		1401088		357291	100	682798			1.0	682798
3	CHO-S Lys 2 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:3		1136130		426471	119	682268			1.1	752419
4	CHO-S Lys 1.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:4		1082824		403620	113	560485			1.4	790073
5	CHO-S Lys 1 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:5		711601		482863	135	411746			1.9	794667
6	CHO-S Lys 0.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:6		364560		605242	169	211628			3.1	654373
7	CHO-S Lys 2.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:7		1557405		453286	127	721852			1.1	793535
8	CHO-S Lys 2 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:8		1234903		390677	109	687496			1.3	900533
9	CHO-S Lys 1.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:9		1122603		430503	120	517718			1.6	806732
10	CHO-S Lys 1 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:10		737429		374538	105	428974			1.9	796431
11	CHO-S Lys 0.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:11		396612		500328	140	225780			3.5	788677
12	CHO-S Lys 2.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:12		1412342		438281	123	615674			1.1	685234
13	CHO-S Lys 2 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:13		1052563		390644	109	592035			1.3	769747
14	CHO-S Lys 1.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:14		969931		346909	97	522294			1.5	774032
15	CHO-S Lys 1 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:15		666028		410635	115	368076			1.9	688474
16	CHO-S Lys 0.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:16		352593		568676	159	233104			3.0	707579
17	CHO-S Lys 2.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:17		1485740		460498	129	611684			1.1	670223
18	CHO-S Lys 2 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:18		1168419		433083	121	615006			1.2	746635
19	CHO-S Lys 1.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:19		1096612		468308	131	518890			1.4	745646
20	CHO-S Lys 1 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:20		861268		405754	114	370392			1.9	690179
21	CHO-S Lys 0.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:21		510694		368869	103	227938			2.8	646868
22	CHO-S Lys 2.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:22		1749094		384773	108	770357			1.2	890630
23	CHO-S Lys 2 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:23		1496075		388264	109	583840			1.3	771691
24	CHO-S Lys 1.5 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:24		898839		396386	111	472532			1.7	809684
25	CHO-S Lys 1 mg/mL	Rb anti-ST	1:20	anti-Rabbit Seconda	P1:25		675320		343035	96	369592			2.2	828997
26	CHO-S Lys 2.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:2		357291	7333175	357291	100					
27	CHO-S Lys 2 mg/mL	Primary Antibody			P2:3		426471	6649473	426471	119					
28	CHO-S Lys 1.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:4		403620	5202219	403620	113					
29	CHO-S Lys 1 mg/mL	Primary Antibody			P2:5		482863	3799587	482863	135					
30	CHO-S Lys 0.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:6		605242	2371588	605242	169					
31	CHO-S Lys 2.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:7		453286	6670738	453286	127					
32	CHO-S Lys 2 mg/mL	Primary Antibody			P2:8		390677	5598387	390677	109					
33	CHO-S Lys 1.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:9		430503	4706049	430503	120					
34	CHO-S Lys 1 mg/mL	Primary Antibody			P2:10		374538	3949794	374538	105					
35	CHO-S Lys 0.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:11		500328	2099319	500328	140					
36	CHO-S Lys 2.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:12		438281	6588768	438281	123					
37	CHO-S Lys 2 mg/mL	Primary Antibody			P2:13		390644	5640162	390644	109					
38	CHO-S Lys 1.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:14		346909	4948212	346909	97					
39	CHO-S Lys 1 mg/mL	Primary Antibody			P2:15		410635	3920500	410635	115					
40	CHO-S Lys 0.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:16		568676	2415837	568676	159					
41	CHO-S Lys 2.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:17		460498	6692680	460498	129					
42	CHO-S Lys 2 mg/mL	Primary Antibody			P2:18		433083	6040364	433083	121					
43	CHO-S Lys 1.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:19		468308	5103104	468308	131					
44	CHO-S Lys 1 mg/mL	Primary Antibody			P2:20		405754	3935430	405754	114					
45	CHO-S Lys 0.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:21		368869	2584008	368869	103					
46	CHO-S Lys 2.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:22		384773	6342887	384773	108					
47	CHO-S Lys 2 mg/mL	Primary Antibody			P2:23		388264	5548074	388264	109					
48	CHO-S Lys 1.5 mg/mL	Primary Antibody			P2:24		396386	4279649	396386	111					
49	CHO-S Lys 1 mg/mL	Primary Antibody			P2:25		343035	3269350	343035	96					
50															

図 9. TPN using RePlex and NIR Detection WorksheetのA1セルにデータを張り付け。

RePlex およびNIR検出データを使用したTPNは、キャピラリー2をReference Capillaryとして正規化し、NIR Total Area（オレンジ色）を基にNormalization Ratio（ノーマライズ比）を確立します。

Normalization Ratioの計算式は図 10に示されています。キャピラリー2のNormalization Ratioは常に1です。各キャピラリーのターゲットシグナルに、そのキャピラリーのNormalization Ratioを掛けるだけです。

Normalization Ratioの比率の決定

Capillary	Norm. Ratio
P2:2	Cap2 NIR Total Area/Cap2 NIR Total Area
P2:3	Cap2 NIR Total Area/Cap3 NIR Total Area
P2:4	Cap2 NIR Total Area/Cap4 NIR Total Area
P2:5	Cap2 NIR Total Area/Cap5 NIR Total Area
P2:6	Cap2 NIR Total Area/Cap6 NIR Total Area
P2:7	Cap2 NIR Total Area/Cap7 NIR Total Area
P2:8	Cap2 NIR Total Area/Cap8 NIR Total Area
P2:9	Cap2 NIR Total Area/Cap9 NIR Total Area
P2:10	Cap2 NIR Total Area/Cap10 NIR Total Area
P2:11	Cap2 NIR Total Area/Cap11 NIR Total Area
P2:12	Cap2 NIR Total Area/Cap12 NIR Total Area
P2:13	Cap2 NIR Total Area/Cap13 NIR Total Area
P2:14	Cap2 NIR Total Area/Cap14 NIR Total Area
P2:15	Cap2 NIR Total Area/Cap15 NIR Total Area
P2:16	Cap2 NIR Total Area/Cap16 NIR Total Area
P2:17	Cap2 NIR Total Area/Cap17 NIR Total Area
P2:18	Cap2 NIR Total Area/Cap18 NIR Total Area
P2:19	Cap2 NIR Total Area/Cap19 NIR Total Area
P2:20	Cap2 NIR Total Area/Cap20 NIR Total Area
P2:21	Cap2 NIR Total Area/Cap21 NIR Total Area
P2:22	Cap2 NIR Total Area/Cap22 NIR Total Area
P2:23	Cap2 NIR Total Area/Cap23 NIR Total Area
P2:24	Cap2 NIR Total Area/Cap24 NIR Total Area
P2:25	Cap2 NIR Total Area/Cap25 NIR Total Area

図 10. TPN using RePlex and NIR Detection WorksheetはNormalization Ratio（オレンジ列）を自動的に算出。



Simple Westernテクノロジーの詳細は

QRコードをスキャンか、下記までご連絡ください:
info.japan@proteinsimple.com

研究用途または製造目的にのみ使用してください。商標および登録商標は、それぞれの所有者に帰属します。

PL9-0075 Rev A

10/24

biotechnē // Global Developer, Manufacturer, and Supplier of High-Quality Reagents, Analytical Instruments, and Precision Diagnostics.

INCLUDES R&D Systems™ Novus Biologicals™ Tocris Bioscience™ ProteinSimple™ ACD™ ExosomeDx™ Asuragen® Lunaphore™