

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-16344

(P2014-16344A)

(43) 公開日 平成26年1月30日(2014.1.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 O 1 B	2 G O 4 3
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	
CO 9 K 11/06 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 2 5 A	
	CO 9 K 11/06	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願2013-120093 (P2013-120093)	(71) 出願人	301021533 独立行政法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1
(22) 出願日	平成25年6月6日(2013.6.6)	(71) 出願人	591045677 関東化学株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁目2番8号
(31) 優先権主張番号	特願2012-134262 (P2012-134262)	(74) 代理人	100102842 弁理士 葛和 清司
(32) 優先日	平成24年6月13日(2012.6.13)	(72) 発明者	鈴木 祥夫 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	高木 信幸 東京都中央区日本橋室町2-2-1 関東 化学株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の分析方法及び分析試薬

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 1) 迅速性、2) 高い操作性、3) 高感度、かつ、4) 可視光で励起するゲルイメージャー、あるいは汎用性の高いUV光源を有する検出装置(UVトランスイルミネーター)で検出可能なタンパク質分析用試薬及びタンパク質分析方法を提供する。

【解決手段】 タンパク質の分析用組成物であって、化合物、またはその塩を含み、分離されたタンパク質を含む担体に適用されることによってタンパク質の染色および固定を行い、適用後に担体の脱色を必要としない、前記組成物。

【選択図】 なし

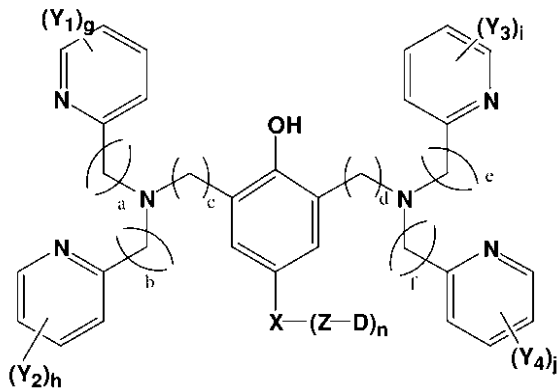
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質の分析用組成物であって、

式 I

【化 1】



(1)

式中、 $a \sim f$ は互いに独立して 1 ~ 5 であり、

Y_1 は、1 ~ 10 個の C 原子を有する直鎖状もしくは分枝状のアルキル基、カルボキシル基、水酸基、アミノ基、チオール基またはハロゲンであり、 Y_1 が複数存在する場合には、互いに独立して同一でも異なっていてもよく、

$Y_2 \sim Y_4$ は、互いに独立して Y_1 と同一の意味を示し、

g, h, i および j は、互いに独立して 0 ~ 4 であり、

X は、1 ~ 10 個の C 原子を有する直鎖の炭化水素基であり、1 もしくは 2 以上の水素原子は、互いに独立して $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 R_1 、 $-OR_1$ 、 $-COR_1$ 、 $-COOR_1$ 、 $-CONHR_1$ 、 $-SH$ 、ハロゲンで置換されていてもよく、 R_1 は、1 ~ 5 個の C 原子を有するアルキル基であり、炭化水素基の末端の炭素原子に結合する水素原子は少なくとも 1 つの $-Z-D$ で置換されており、

n は、1 ~ 3 であり、

Z は、複数存在する場合には互いに独立して、単結合あるいはアルキレン基であって、1 もしくは 2 以上の $-CH_2-$ は、互いに独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-NH-SO_2-$ 、 $-SO_2-NH-$ 、 $-CS-NH-$ 、 $-NH-CS-$ 、 $-CO-NH-$ 、 $-NH-CO-$ 、 $-CO-$ 、 $-COO-$ 、 $-OCO-$ 、 $-OCO-O-$ 、 $-S-CO-$ 、 $-CO-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-CH=CH-$ 、 $-C=C-$ によって、置き換えられてもよく、

D は、複数存在する場合には互いに独立して、発色団である、

で表される化合物および/またはその塩を 1 種または 2 種以上含み、分離されたタンパク質を含む担体に適用されることによってタンパク質の染色および固定を行い、適用後に担体の脱色を必要としない、前記組成物。

【請求項 2】

D が、

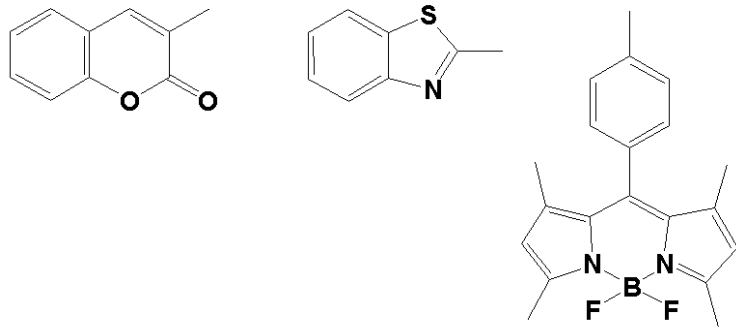
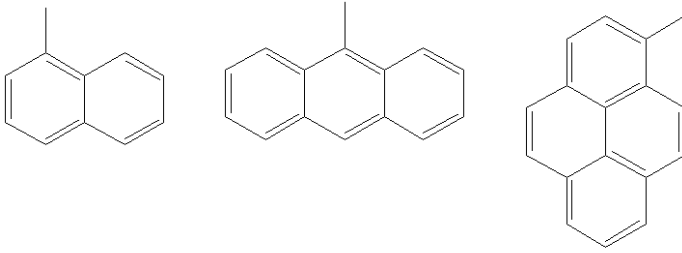
10

20

30

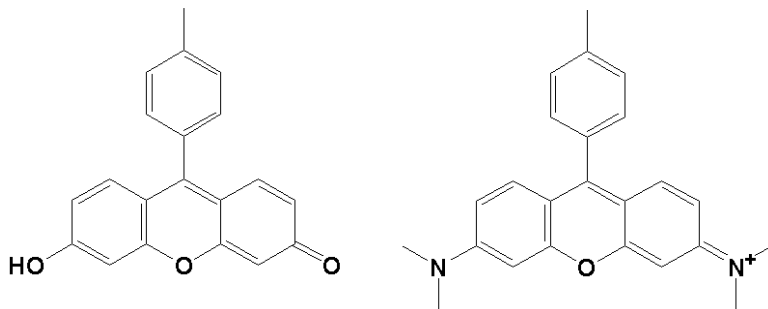
40

【化 2】

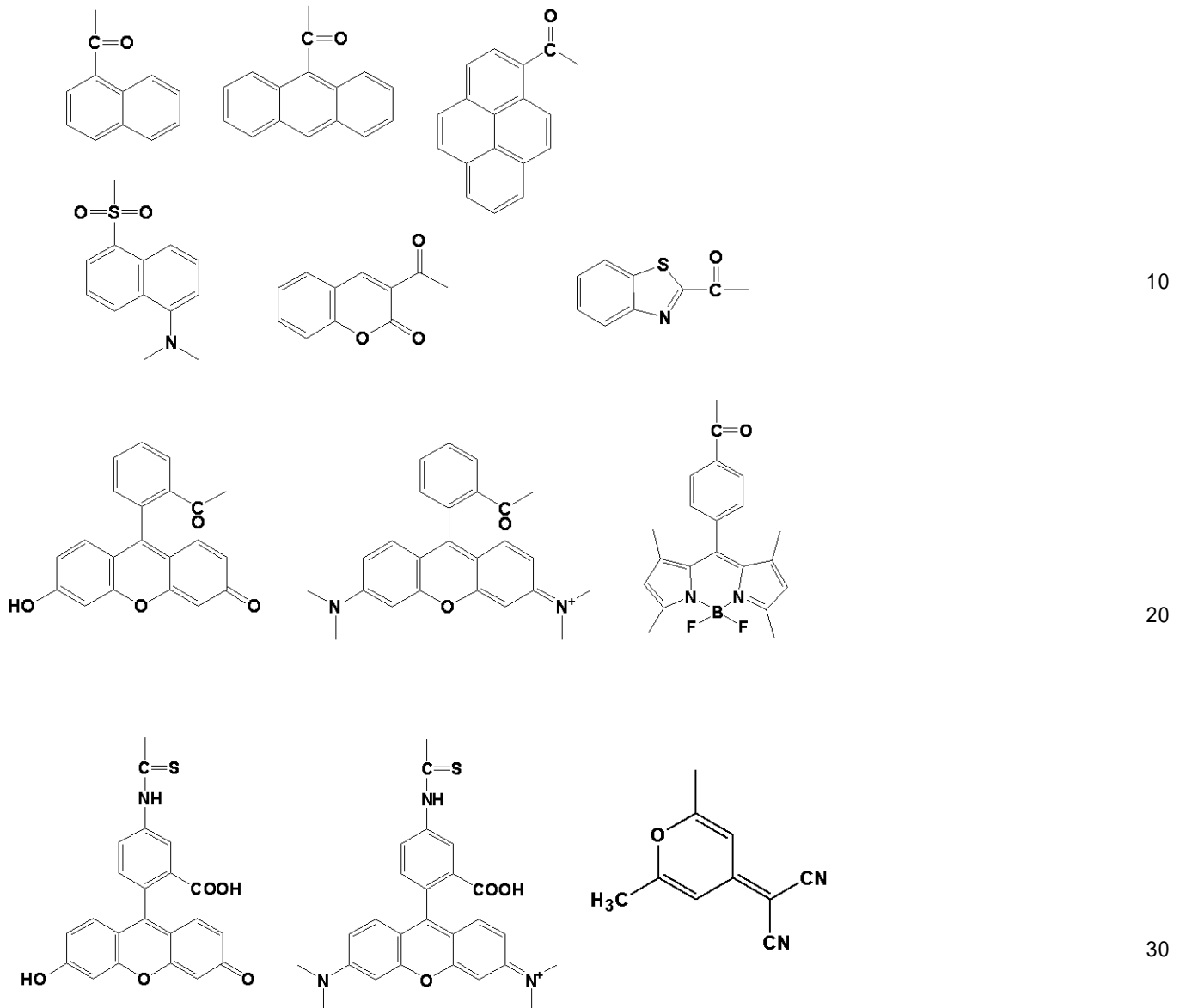


10

20



【化3】

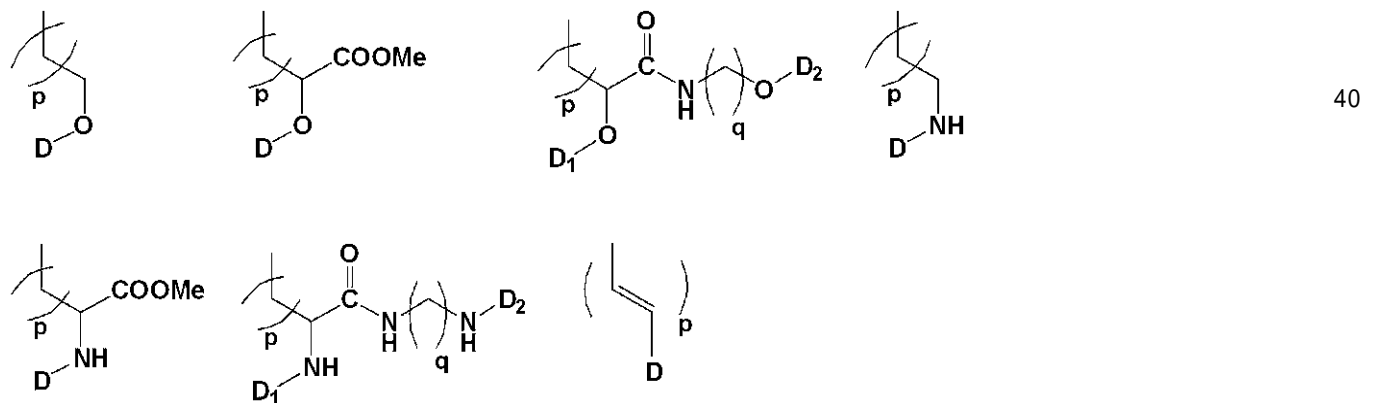


からなる群から選択される、
請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

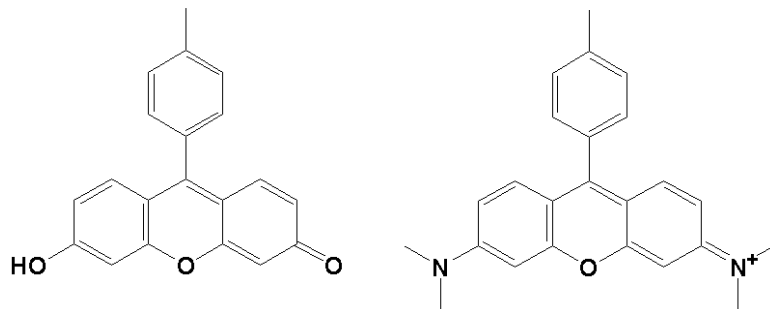
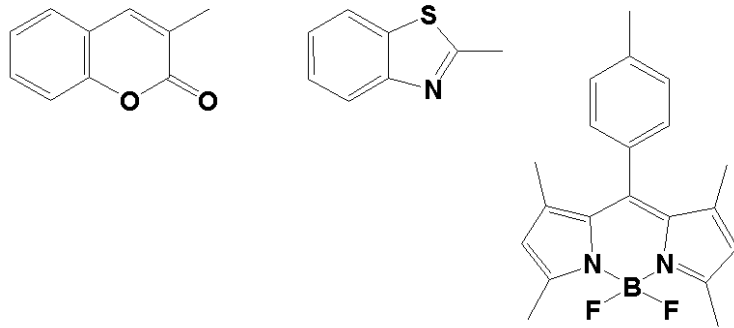
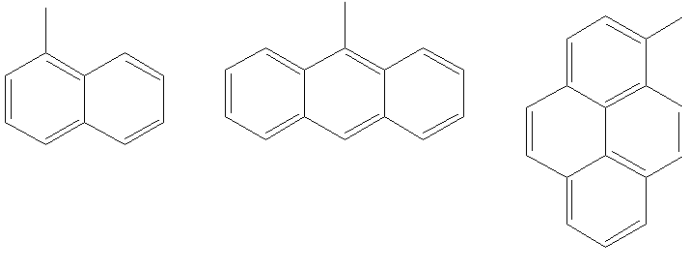
- X - (Z - D)_n が、以下

【化4】



からなる群から選択され、
Dが、

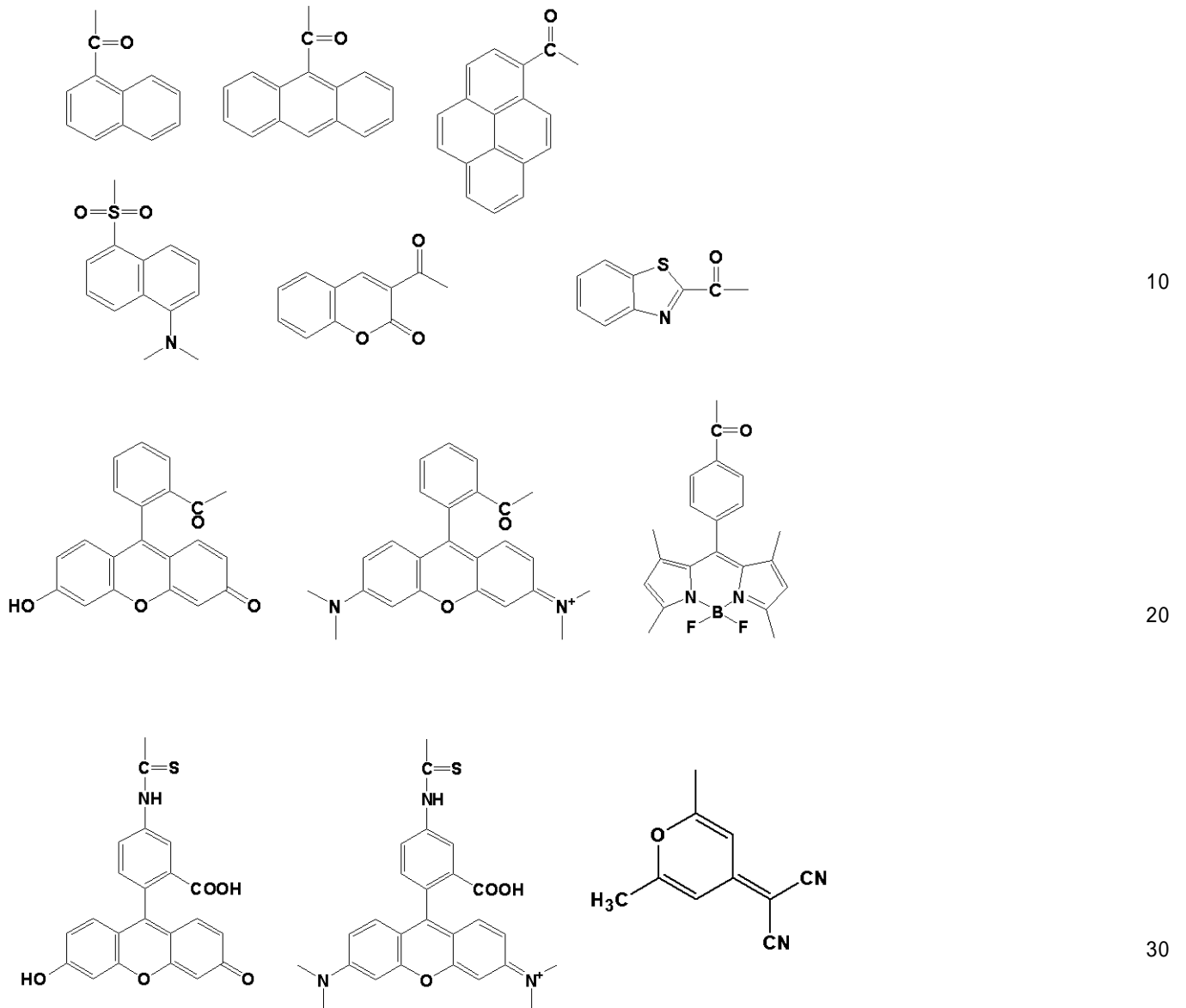
【化 5】



10

20

【化6】

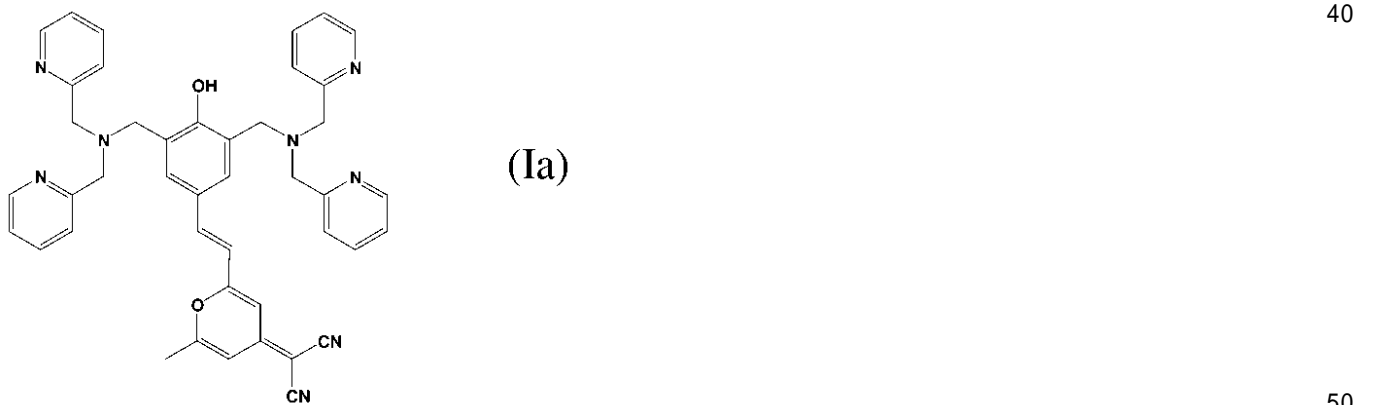


からなる群から選択され、
 D_1 および D_2 は互いに独立して D と同一の意味を示し、
 p および q は互いに独立して 1 ~ 10 の数である、
 請求項 1 または 2 に記載の組成物。

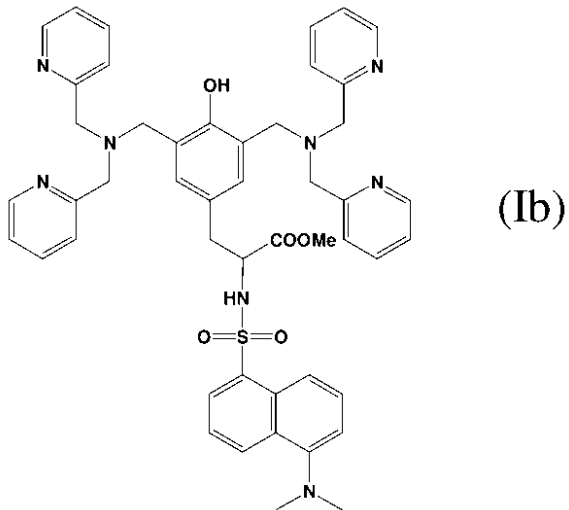
【請求項4】

少なくとも1種の式 I a ~ I c

【化7】

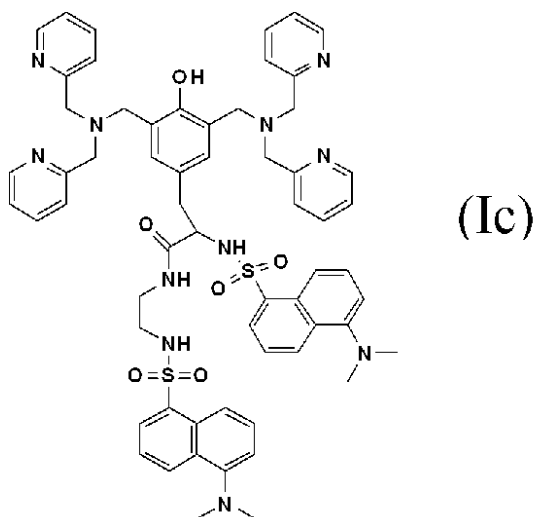


【化 8】



10

【化 9】



20

30

で表される化合物および/またはその塩を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

タンパク質の分析方法であって、電気泳動により担体上でタンパク質を分離するステップ、該担体を請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物を含有する水溶液に浸漬することによって、タンパク質の染色および固定を行うステップ、を含み、浸漬後に担体を脱色するステップを含まない、前記方法。

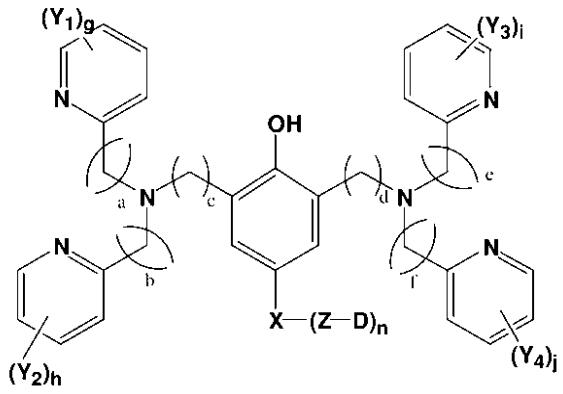
【請求項 6】

さらに、浸漬後の担体に可視光または UV を照射して蛍光イメージ解析をする工程を含む、請求項 5 に記載の方法。

40

【請求項 7】

【化 1 0】

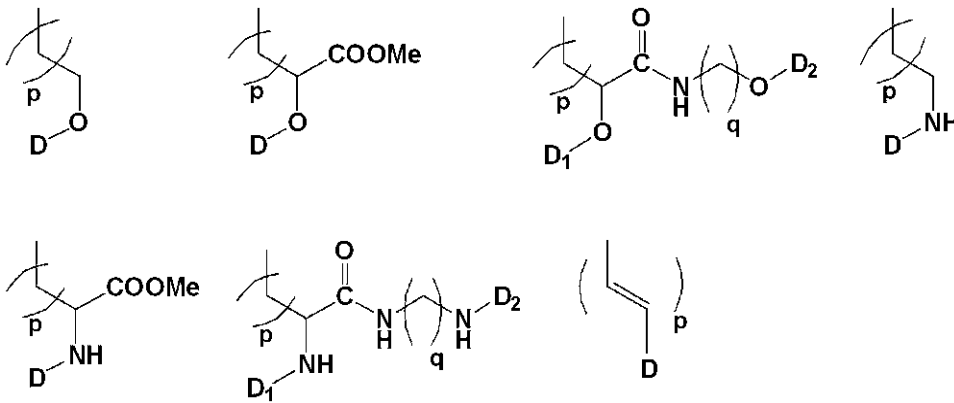


(1)

式中、

- X - (Z - D)_n が、以下

【化 1 1】



からなる群から選択され、

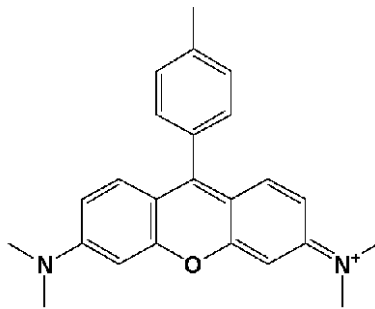
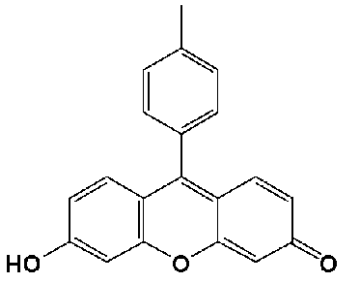
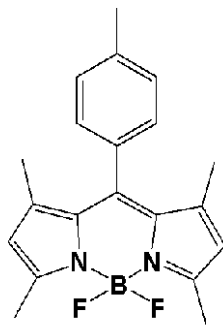
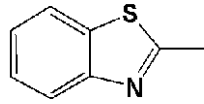
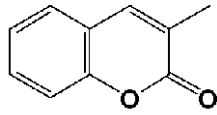
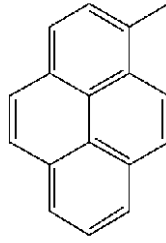
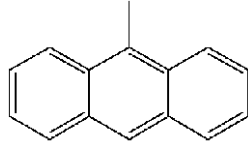
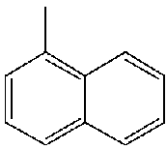
D が、

10

20

30

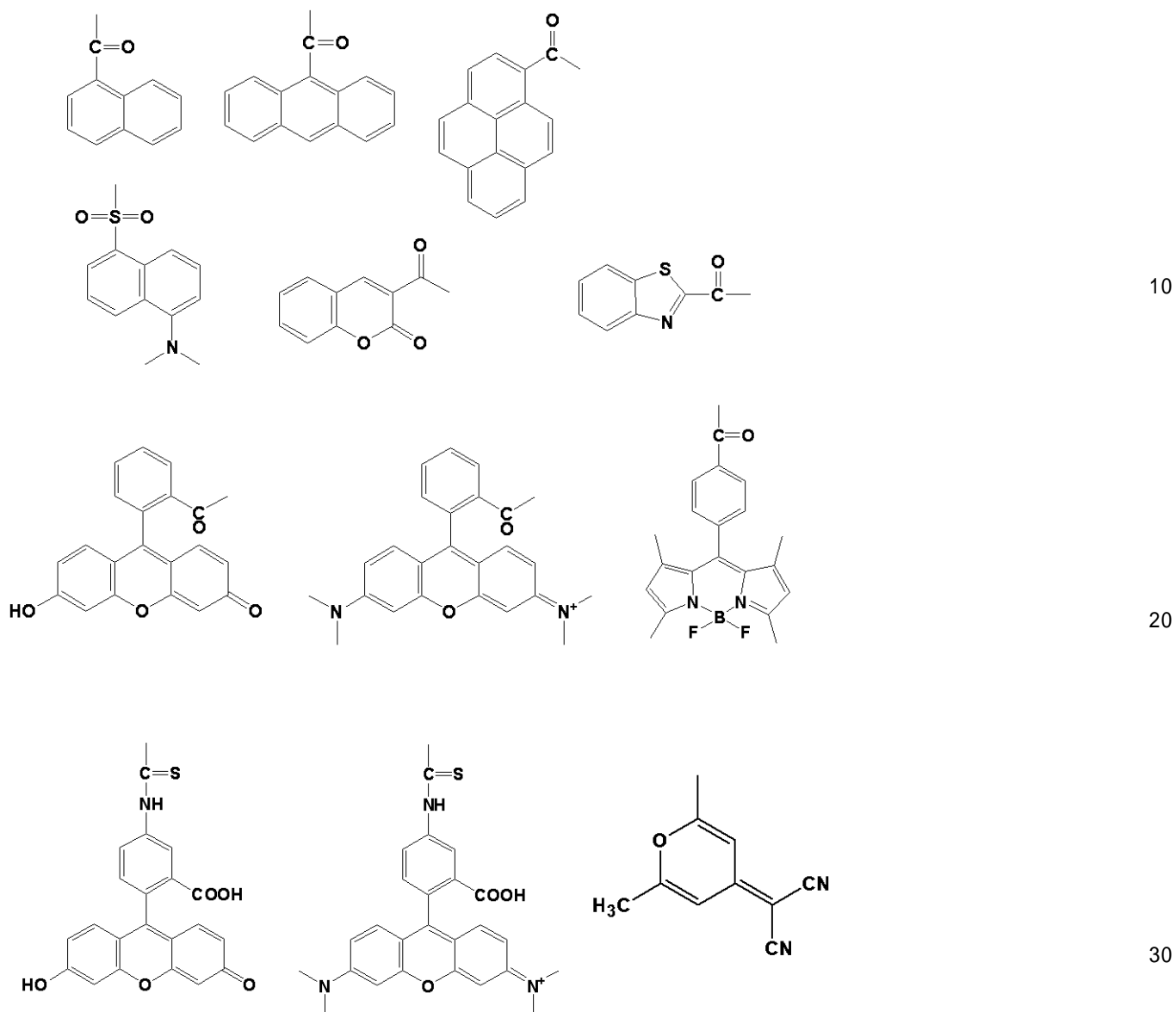
【化 1 2】



10

20

【化 1 3】



からなる群から選択され、

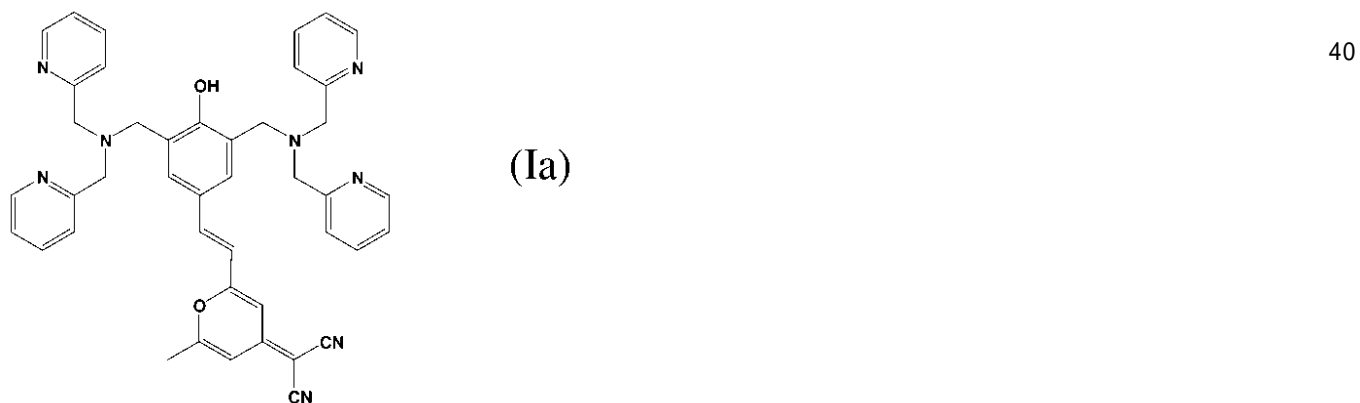
D_1 および D_2 は互いに独立して D と同一の意味を示し、

p および q は互いに独立して 1 ~ 10 の数である、で表される化合物、またはその塩。

【請求項 8】

式 I a

【化 1 4】

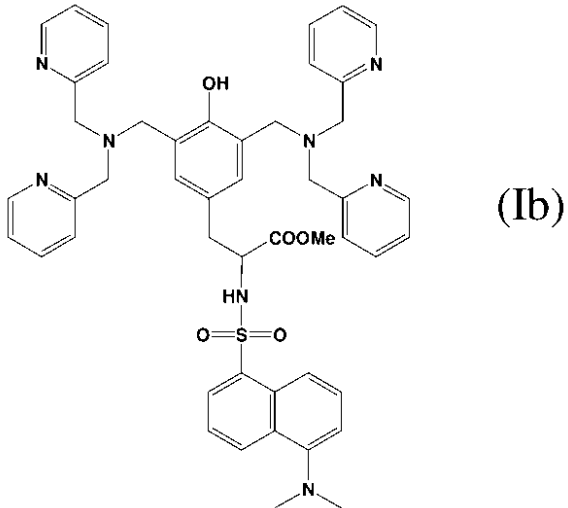


で表される、請求項 7 に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 9】

式 I b

【化 1 5】



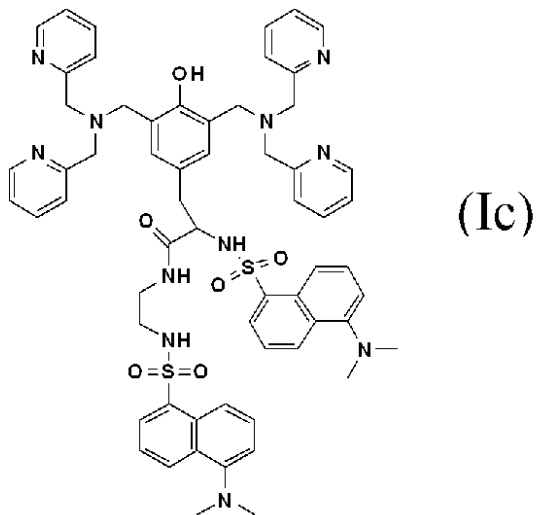
10

で表される、請求項 7 に記載の化合物、またはその塩。

【請求項 10】

式 I c

【化 1 6】



30

で表される、請求項 7 に記載の化合物、またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、特定の蛍光化合物を含むタンパク質の分析用組成物、および該組成物を用いたタンパク質の分析方法、ならびに該組成物に含まれる蛍光化合物などに関する。

【背景技術】

【0002】

タンパク質を分析する方法として電気泳動法が広く行われている。その主な目的は、タンパク質の分子量を測定することやタンパク質を同定するための試料を調製することである。電気泳動で分離されたタンパク質は通常、電気泳動前もしくは電気泳動後にタンパク質と相互作用を示す試薬を作用させ、目視もしくは専用の検出器にて検出できるようにする必要がある。タンパク質を高感度に検出する方法、試薬にはこれまでに多くの種類が開

50

発され、実用化されている。例えば銀染色法、SYPRO Ruby染色法、が挙げられる。

【0003】

銀染色法は検出感度が1~10ngレベルと高感度な方法ではあるが、所要時間が長く(120分以上)、定量性がないことと、銀イオンの廃液処理が必要であるという欠点を有している。SYPRO Ruby(ライフテクノロジーズ)のように蛍光色素を用いた方法は銀染色以上の検出感度を示す場合があるが、所要時間が長いことに加え(240分以上)、SDS-PAGEに適用した場合はゲルに残存するSDSの影響を受けやすく、目的タンパク質を検出できなかつたりすることがある。また、ゲル上に残存した過剰な蛍光色素が、検出感度に大きく影響するため、通常は蛍光色素を作用させる前後に、ゲル中のタンパク質を固定化し、十分な回数で洗浄する作業が必要となり、迅速性を損なうと同時に作業者の負担が大きいという問題が指摘されている。そこで、特許文献1、非特許文献1に記載されたように、これらの欠点を解消する「Rapid FluoroStain KANTO」が開発された。

10

【0004】

その後、Oriole染色法(バイオラッド)が開発された。Oriole染色法は、電気泳動後の固定化操作および染色後の脱色操作が不必要で、ゲルを染色液に浸すだけで染色できるワンショット染色法が可能である。しかし、所要時間は90分以上と長く、また染色後にゲルが収縮するため、隣り合うタンパク質スポットの判別がしにくくなることがある。またNative-PAGEに使用することができず、さらに可視光励起による蛍光検出ができないため用途が限定されている。

一方、Rapid FluoroStain KANTOは、Oriole染色法と比較して作業工程時間は短く(約60分)、染色後のゲルの収縮は観察されないが、ワンショット染色法が出来ない。

20

【0005】

特許文献2には、脱染色および固定化の必要性を排除したポリ(アミノ酸)の染色方法に用いられる、金属複合体が記載されている。しかしながら、同複合体を用いる染色方法は、最大染色強度を得るのに約90分を要し、所要時間が長い。また同染色方法は、医薬用外劇物に指定されているメタノールを使用するため、安全性に優れているとはいえない。

このように、高感度で検出可能であり、かつ操作性の高い染色方法が依然として求められている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2010-014673号公報

【特許文献2】特表2011-505342号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Electrophoresis 2011, 32, 1403-1413

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の課題は、より一層の1)迅速性、ならびに、2)高い操作性を有しながら、3)高感度で検出可能であり、かつ、4)可視光で励起するゲルイメージャー、あるいは汎用性の高いUV光源を有する検出装置(UVトランスイルミネーター)で検出可能なタンパク質分析用試薬及びタンパク質分析方法を提供することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねる中で、本発明の蛍光化合物を含有した組成物により、UVおよび可視光で励起するゲルイメージャーにより、タンパク質を簡便、かつ、高感度に検出できることを見出し、さらに研究を進めた結果、本発明を完成させるに至った。

50

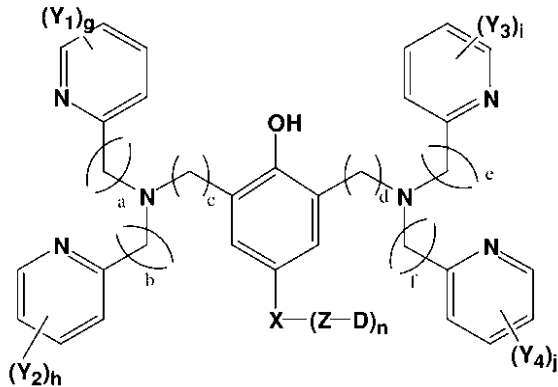
【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は以下に関する。

(1) タンパク質の分析用組成物であって、

式 I

【 化 1 】



(1)

式中、 a ~ f は互いに独立して 1 ~ 5 であり、

Y₁ は、 1 ~ 10 個の C 原子を有する直鎖状もしくは分枝状のアルキル基、カルボキシル基、水酸基、アミノ基、チオール基またはハロゲンであり、 Y₁ が複数存在する場合には、互いに独立して同一でも異なっていてもよく、

Y₂ ~ Y₄ は、互いに独立して Y₁ と同一の意味を示し、

g、 h、 i および j は、互いに独立して 0 ~ 4 であり、

X は、 1 ~ 10 個の C 原子を有する直鎖の炭化水素基であり、 1 もしくは 2 以上の水素原子は、互いに独立して -COOH、 -OH、 -NH₂、 R₁、 -OR₁、 -COR₁、 -COOR₁、 -CONHR₁、 -SH、 ハロゲンで置換されていてもよく、 R₁ は、 1 ~ 5 個の C 原子を有するアルキル基であり、炭化水素基の末端の炭素原子に結合する水素原子は少なくとも 1 つの -Z-D で置換されており、

n は、 1 ~ 3 であり、

Z は、複数存在する場合には互いに独立して、単結合あるいはアルキレン基であって、 1 もしくは 2 以上の -CH₂- は、互いに独立して、 -O-、 -S-、 -NH-、 -NH-SO₂-、 -SO₂-NH-、 -CS-NH-、 -NH-CS-、 -CO-NH-、 -NH-CO-、 -CO-、 -COO-、 -OCO-、 -OCO-O-、 -S-CO-、 -CO-S-、 -SO₂-、 -CH=CH-、 -C=C- によって、置き換えられてもよく、

D は、複数存在する場合には互いに独立して、発色団である、

で表される化合物および/またはその塩を 1 種または 2 種以上含み、分離されたタンパク質を含む担体に適用されることによってタンパク質の染色および固定を行い、適用後に担体の脱色を必要としない、前記組成物。

【 0 0 1 1 】

(2) D が、

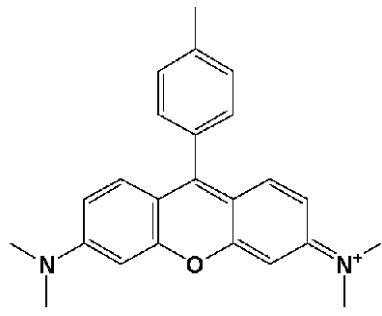
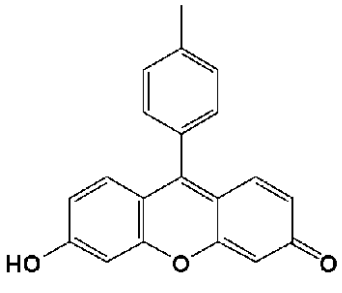
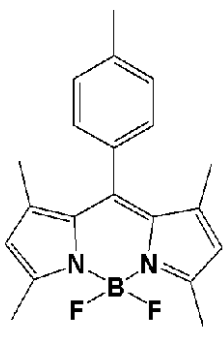
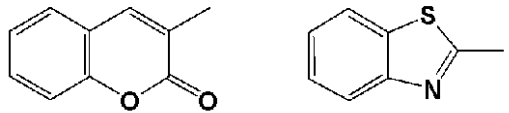
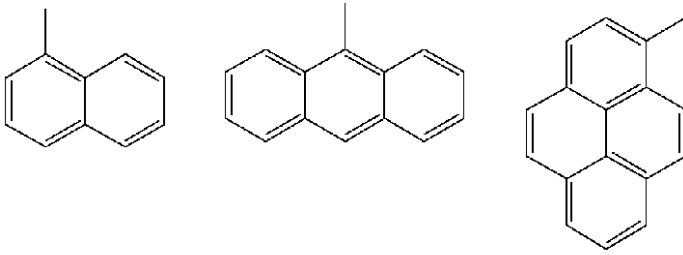
10

20

30

40

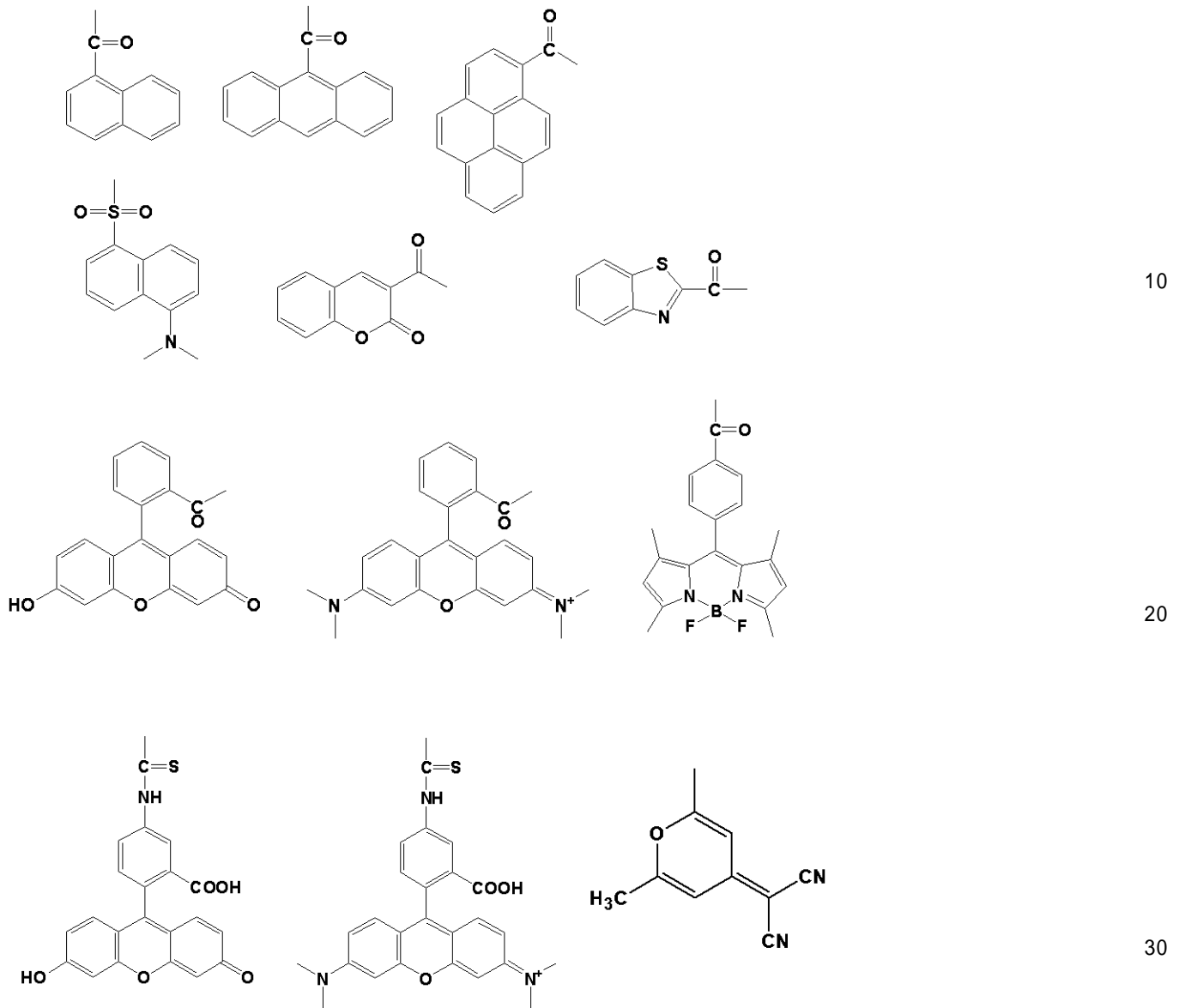
【化 2】



10

20

【化3】

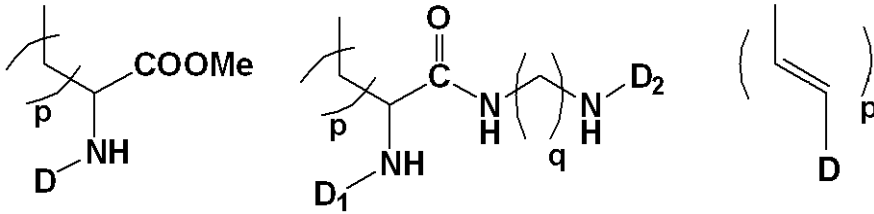
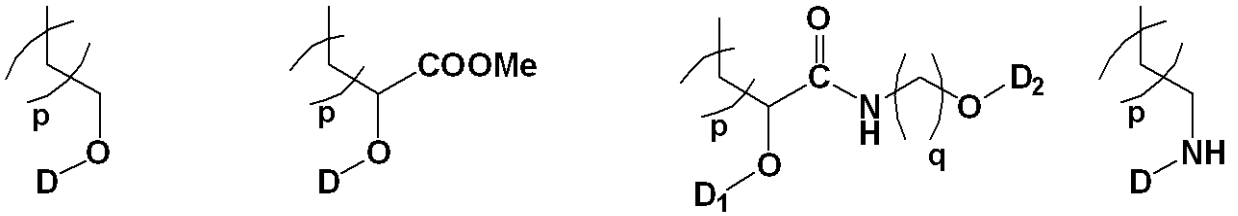


からなる群から選択される、(1)に記載の組成物。

【0012】

(3) - X - (Z - D)_n が、以下

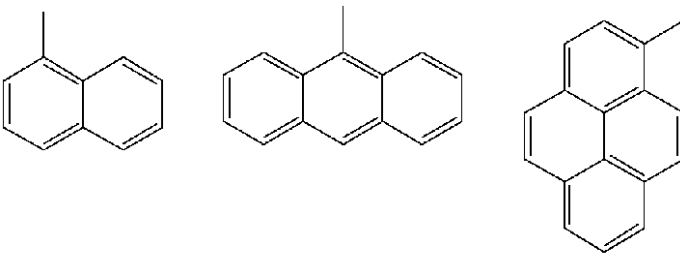
【化4】



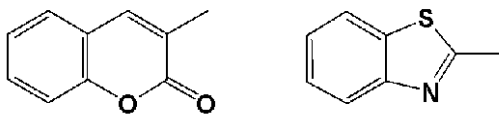
10

からなる群から選択され、
Dが、

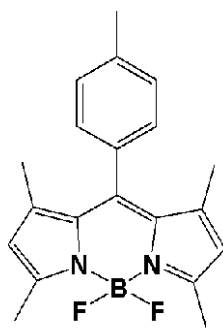
【化5】



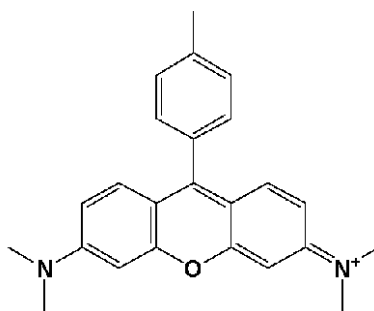
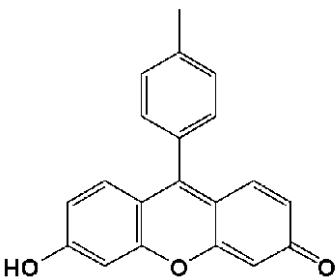
20



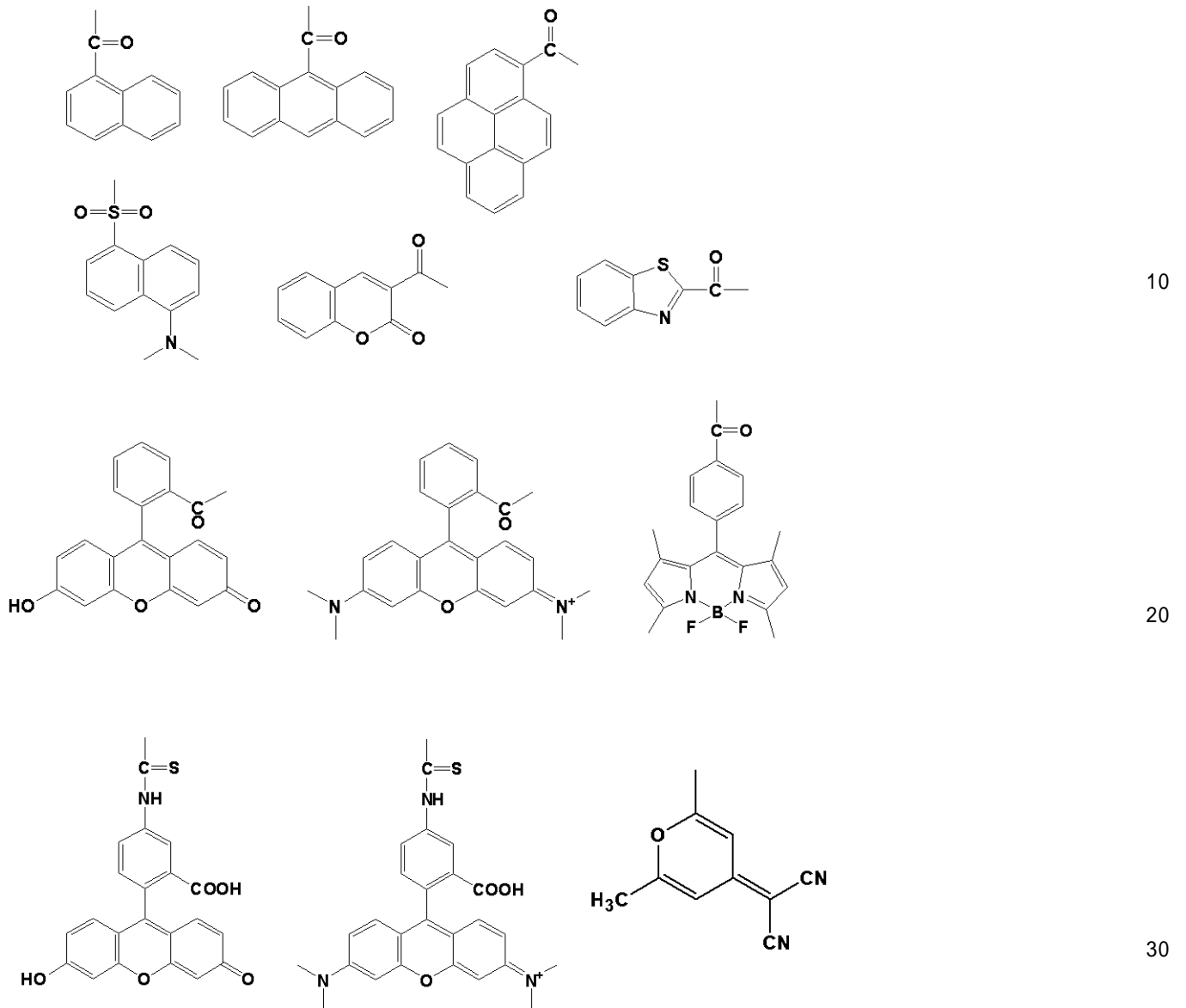
30



40



【化6】



10

20

30

からなる群から選択され、

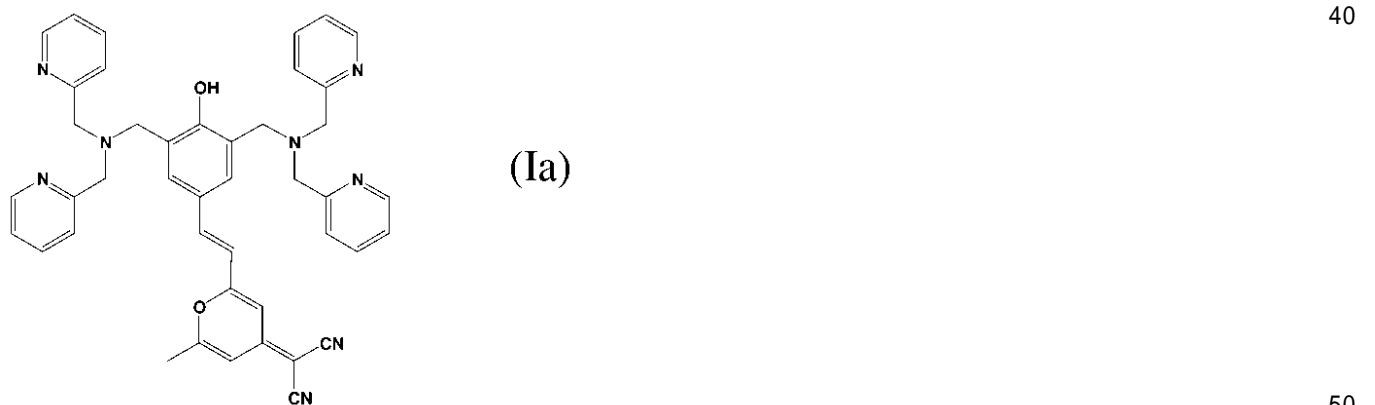
D_1 および D_2 は互いに独立して D と同一の意味を示し、

p および q は互いに独立して 1 ~ 10 の数である、(1) または (2) に記載の組成物。

【0013】

(4) 少なくとも1種の式 I a ~ I c

【化7】

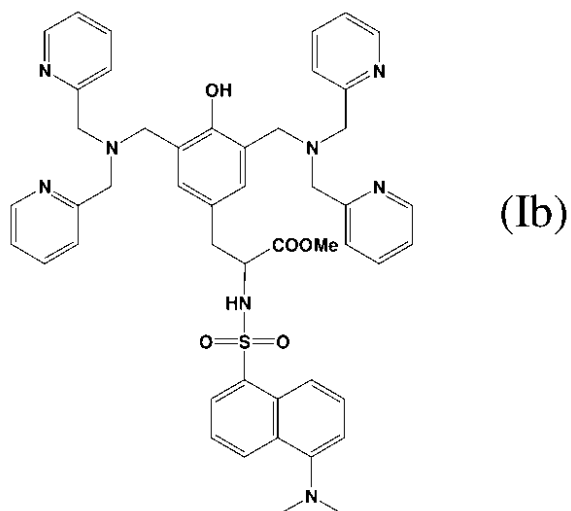


(Ia)

40

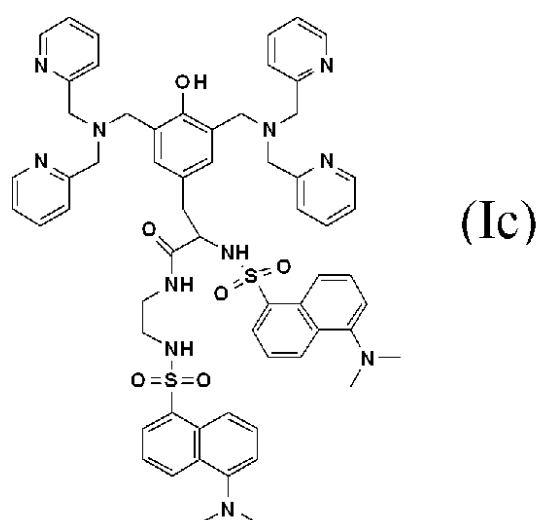
50

【化 8】



10

【化 9】



20

30

で表される化合物および/またはその塩を含む、(1)~(3)のいずれかに記載の組成物。

【0014】

(5) タンパク質の分析方法であって、電気泳動により担体上でタンパク質を分離するステップ、該担体を(1)~(3)のいずれかに記載の組成物を含有する水溶液に浸漬することによって、タンパク質の染色および固定を行うステップ、を含み、浸漬後に担体を脱色するステップを含まない、前記方法。

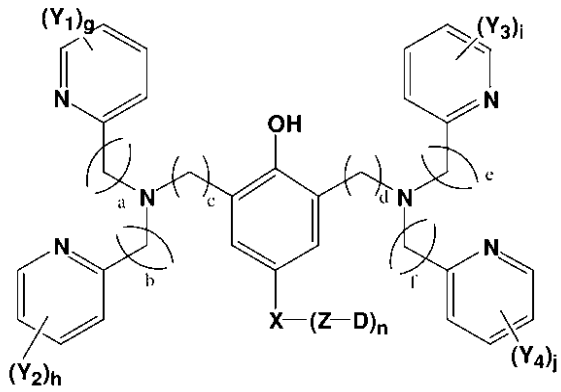
(6) さらに、浸漬後の担体に可視光またはUVを照射して蛍光イメージ解析をする工程を含む、(5)に記載の方法。

40

【0015】

(7)

【化 1 0】



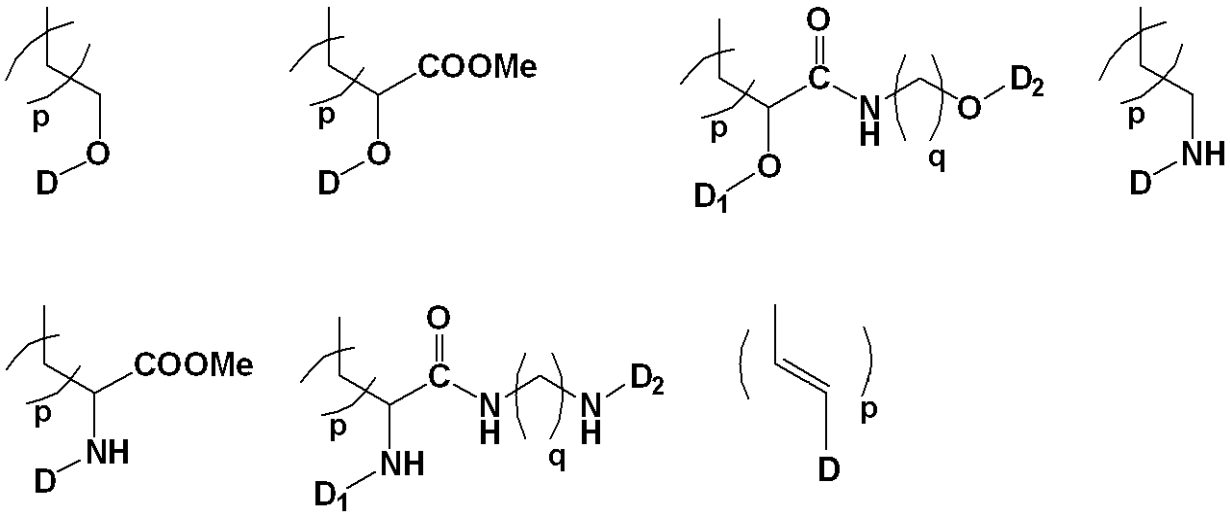
(1)

10

式中、

- X - (Z - D)_n が、以下

【化 1 1】

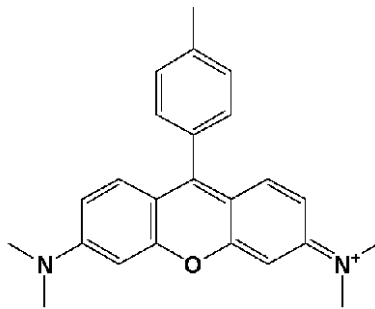
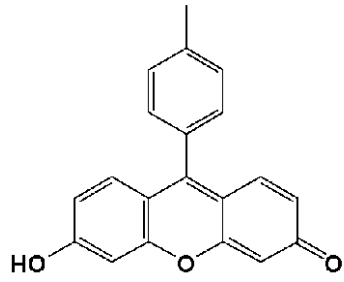
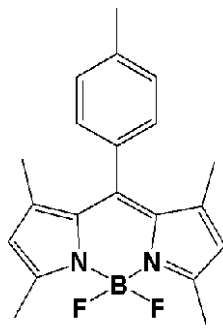
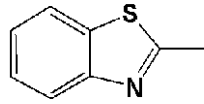
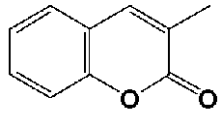
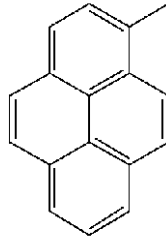
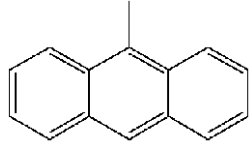
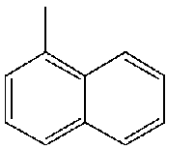


20

30

からなる群から選択され、
D が、

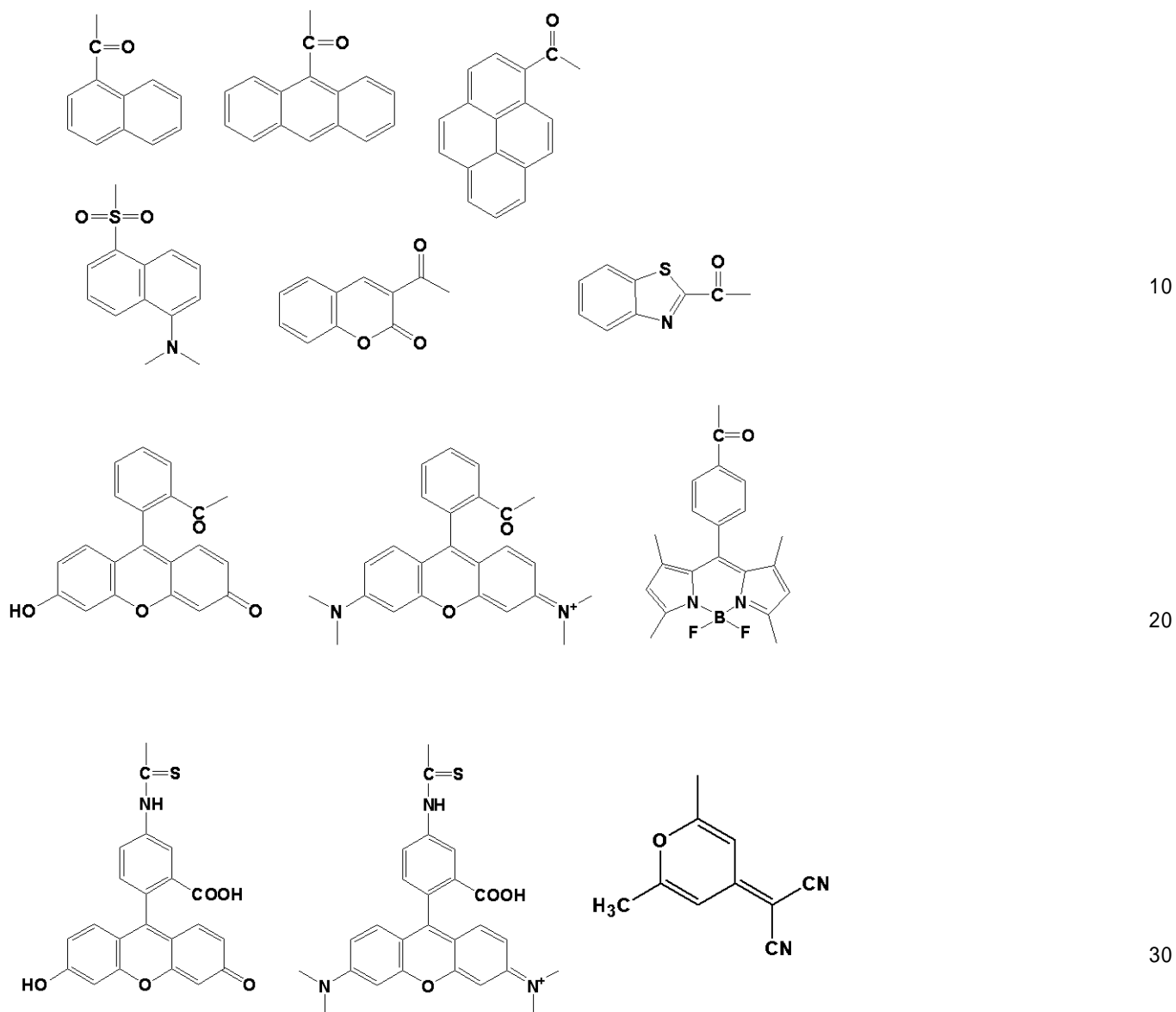
【化 1 2】



10

20

【化 1 3】



10

20

30

からなる群から選択され、

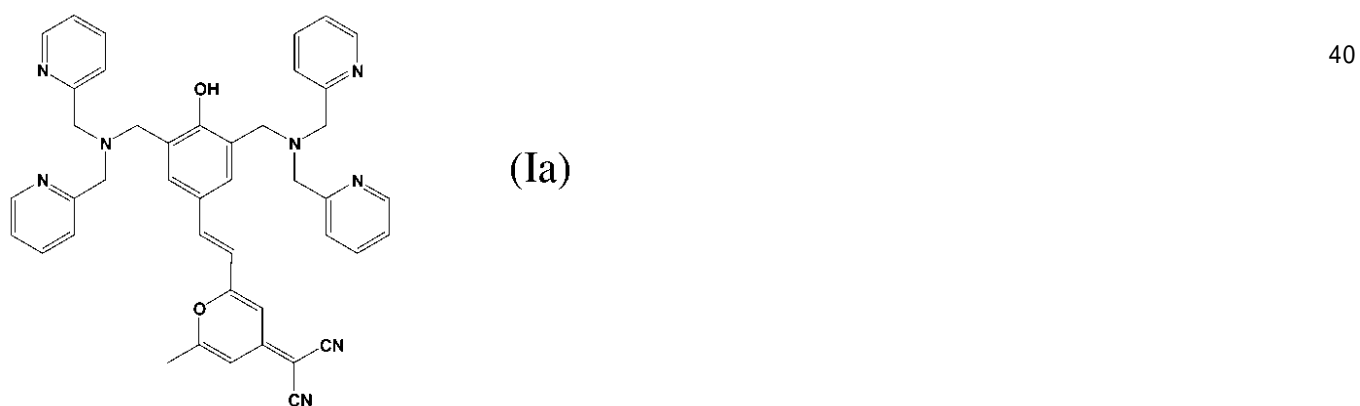
D_1 および D_2 は互いに独立して D と同一の意味を示し、

p および q は互いに独立して 1 ~ 10 の数である、で表される化合物、またはその塩。

【0016】

(8) 式 I a

【化 1 4】



40

(Ia)

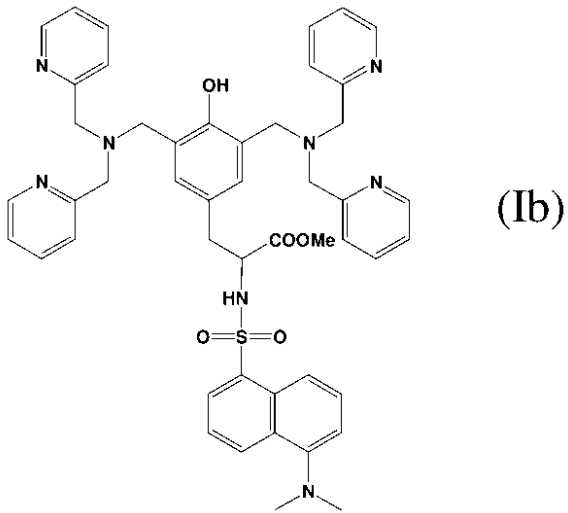
で表される、(7)に記載の化合物、またはその塩。

50

【 0 0 1 7 】

(9) 式 I b

【 化 1 5 】



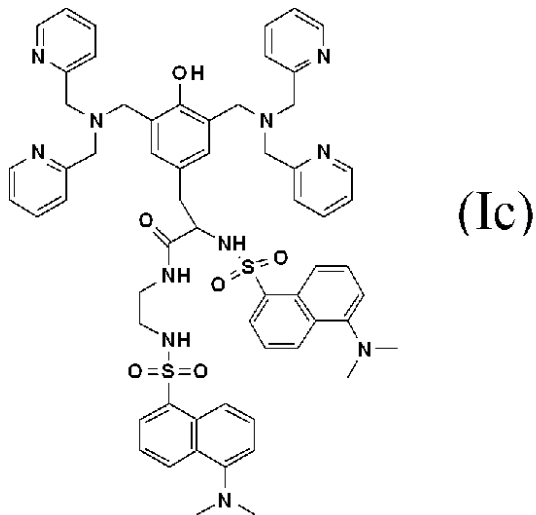
10

で表される、(7) に記載の化合物、またはその塩。

【 0 0 1 8 】

(1 0) 式 I c

【 化 1 6 】



30

で表される、(7) に記載の化合物、またはその塩。

【 発 明 の 効 果 】

40

【 0 0 1 9 】

本発明の組成物を用いることにより、電気泳動担体中のタンパク質を簡便、迅速、高感度に正確に検出することが可能である。したがって、本発明は、プロテオーム解析のように多数のサンプルの分析する場合においても、先行技術に比べ、煩雑な作業を必要とせず、短時間で高精度に分析することができる。また、Native-PAGE（界面活性剤であるSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）を用いることなく、タンパク質を変性させないでゲル電気泳動する方法）を行った担体（ゲルなど）も容易に染色することができ、応用範囲が広い。

【 図 面 の 簡 単 な 説 明 】

【 0 0 2 0 】

【 図 1 】 図 1 は、実施例 5 による電気泳動後の蛍光観察図である。（蛍光色素濃度：16 μ

50

g/mL蛍光物質 1 ; 染色液 : リン酸バッファー / 精製水 / メタノール ; 励起波長 525 nm ; カットフィルター R-60)

【図 2】図 2 は、実施例 6 による電気泳動後の蛍光観察図である。(蛍光色素濃度 : 16 μ g/mL 蛍光物質 2 ; 染色液 : グリシンバッファー / 精製水 / エタノール ; 励起波長 365 nm ; カットフィルター SCF515)

【図 3】図 3 は、実施例 7 による電気泳動後の蛍光観察図である。(蛍光色素濃度 : 16 μ g/mL 蛍光物質 3 ; 染色液 : グリシンバッファー / 精製水 / エタノール ; 励起波長 365 nm ; カットフィルター SCF515)

【図 4】図 4 は、実施例 8 による Native-PAGE 後の蛍光観察図である。(蛍光色素濃度 : 16 μ g/mL 蛍光物質 2 ; 染色液 : グリシンバッファー / 精製水 / エタノール ; 励起波長 312 nm ; カットフィルター SCF515)

10

【図 5】図 5 は、実施例 8 による Native-PAGE 後の蛍光観察図である。(蛍光色素濃度 : 16 μ g/mL 蛍光物質 2 ; 染色液 : グリシンバッファー / 精製水 / エタノール ; 励起波長 365 nm ; カットフィルター SCF515)

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明の一側面は、タンパク質の分析用試薬である組成物であって、前記式 (I) で表される化合物、またはその塩を含み、分離されたタンパク質を含む担体に適用されることによってタンパク質の染色および固定を行い、適用後に担体の脱色を必要としない、前記組成物に関する。

20

【0022】

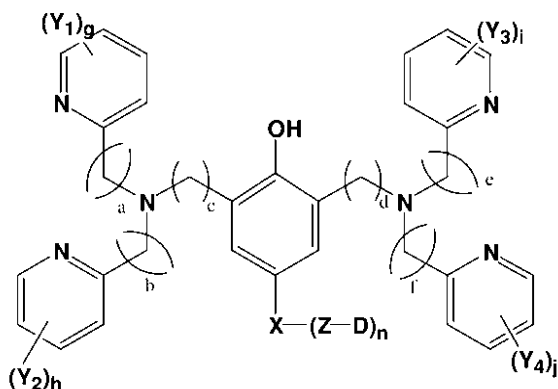
本発明において、「タンパク質の分析」とは、タンパク質を定性的かつ網羅的に検出すること、すなわちタンパク質の存在の有無を確認すること、タンパク質の分子量を測定すること、タンパク質の分布を決定すること、定量的に測定することなどを含む。

【0023】

本発明のタンパク質分析用組成物は式 (I) で表される化合物および / またはその塩を 1 種または 2 種以上含む。

式 (I)

【化 17】



30

(1)

40

式中、 a ~ f は互いに独立して 1 ~ 5 であり、好ましくは 1 ~ 3 であり、
 Y_1 は、 1 ~ 10 個の C 原子、好ましくは 1 ~ 3 個の C 原子を有する直鎖状または分枝状のアルキル基、カルボキシル基、水酸基、アミノ基、チオール基またはハロゲンであり、
 Y_1 が複数存在する場合には、互いに独立して同一でも異なっていてもよく、
 $Y_2 \sim Y_4$ は、互いに独立して Y_1 と同一の意味を示し、
g、h、i および j は、互いに独立して 0 ~ 4 であり、好ましくは 0 または 1 である。

【0024】

50

Xは、典型的には1～10個、好ましくは1～3個のC原子を有する直鎖の炭化水素基であって、1もしくは2以上の水素原子は、互いに独立して典型的には-COOH、-OH、-NH₂、-R₁、-OR₁、-COR₁、-COOR₁、-CONHR₁、-SH、ハロゲンで置換されていてもよく、炭化水素基の末端の炭素原子に結合する水素原子は少なくとも1つの-Z-Dで置換されている。

R₁は、1～5個のC原子を有するアルキル基であり、好ましくはメチル基(Me)またはエチル基(Et)である。

炭化水素は、典型的には1～10個、好ましくは1～3個のC原子を有するアルキル基、アルケニル基およびアルキニル基である。Xの具体例としては、これに限定するものではないが、例えば1～3個のC原子を有するアルキル基、1～3個のC原子を有するアルケニル基、1～3個のC原子を有するアルキニル基、1もしくは2以上の水素原子が-COOR₁、好ましくは-COOMeおよび/または-COOEtで置換された1～2個のC原子を有するアルキル基などが挙げられる。

10

【0025】

式(I)のnは、1～3である。

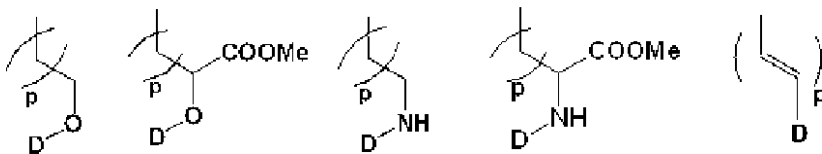
式(I)のZは、典型的には複数存在する場合には互いに独立して、単結合あるいはアルキレン基であって、該アルキレン基は好ましくは1～10個、とくに好ましくは1～3個のC原子を有し、1もしくは2以上の-CH₂-は、互いに独立して、-O-、-S-、-NH-、-NH-SO₂-、-SO₂-NH-、-CS-NH-、-NH-CS-、-CO-NH-、-NH-CO-、-CO-、-COO-、-OCO-、-OCO-O-、-S-CO-、-CO-S-、-SO₂-、-CH=CH-、-C=C-によって、置き換えられてもよい。Zは複数存在する場合には互いに同一でも異なってもよい。Zは好ましくは、酸性または塩基性条件下における結合の安定性の観点から、1もしくは2以上の-CH₂-が-CO-、-NH-、-CO-NH-、-NH-CO-、-NH-SO₂-および/または-SO₂-NH-によって置き換えられたアルキレン基である。

20

【0026】

n = 1の場合、-X-(Z-D)としては、これに限定するものではないが、例えば

【化18】



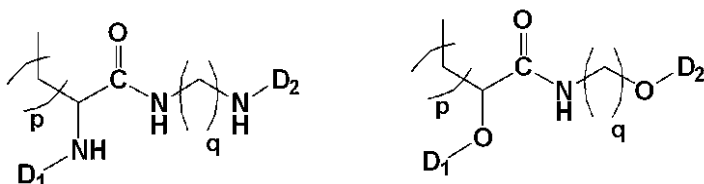
30

が挙げられる。

【0027】

n = 2の場合、-X-(Z-D)₂としては、これに限定するものではないが、例えば

【化19】



40

が挙げられる。

50

【0028】

式(I)のDは、複数存在する場合には互いに独立して、発色団である。Dは複数存在する場合には互いに同一でも異なってもよい。本発明の発色団は、典型的にはUV-VIS(紫外-可視)領域の電磁波(200~830nmが好ましい)を吸収する官能基である。本発明において、「UV」とは200~380nmの波長の紫外光または紫外線をいい、「可視光」とは380~830nmの波長の可視光または可視光線をいう。

【0029】

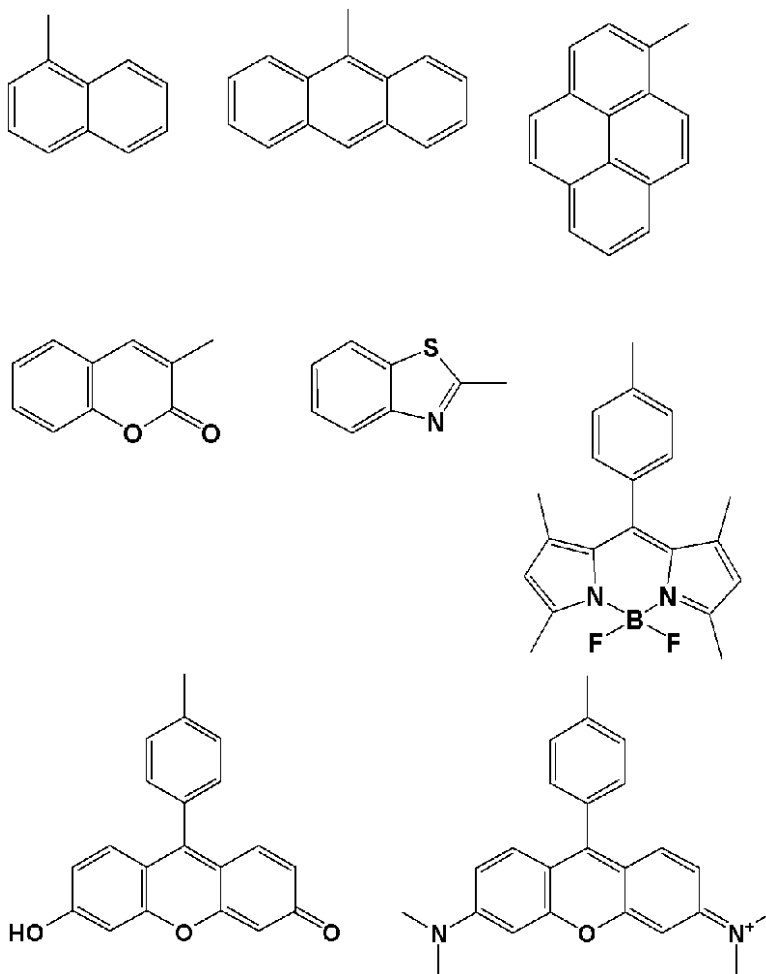
発色団の具体例としては、これに限定するものではないが、例えば、フルオレセイン基およびその誘導体、ダンシル基およびその誘導体、クマリン基およびその誘導体、ピレン基およびその誘導体、アントラセン基およびその誘導体、ローダミン基およびその誘導体、ベンゾチアゾール基およびその誘導体、ボロンジピロメテン基およびその誘導体などが挙げられる。誘導体とは、それぞれの官能基がさらに置換基によって置換されたものをいい、かかる置換基としては、これに限定するものではないが、例えば、1~5個のC原子を有するアルキル基、カルボニル基、カルボキシル基、-OH基、イソチオシアネート基、ハロゲン基、アミノ基、チオール基、エーテル基などが挙げられる。

10

【0030】

Dの具体例としては、これに限定するものではないが、例えば以下の官能基が挙げられる。

【化20】

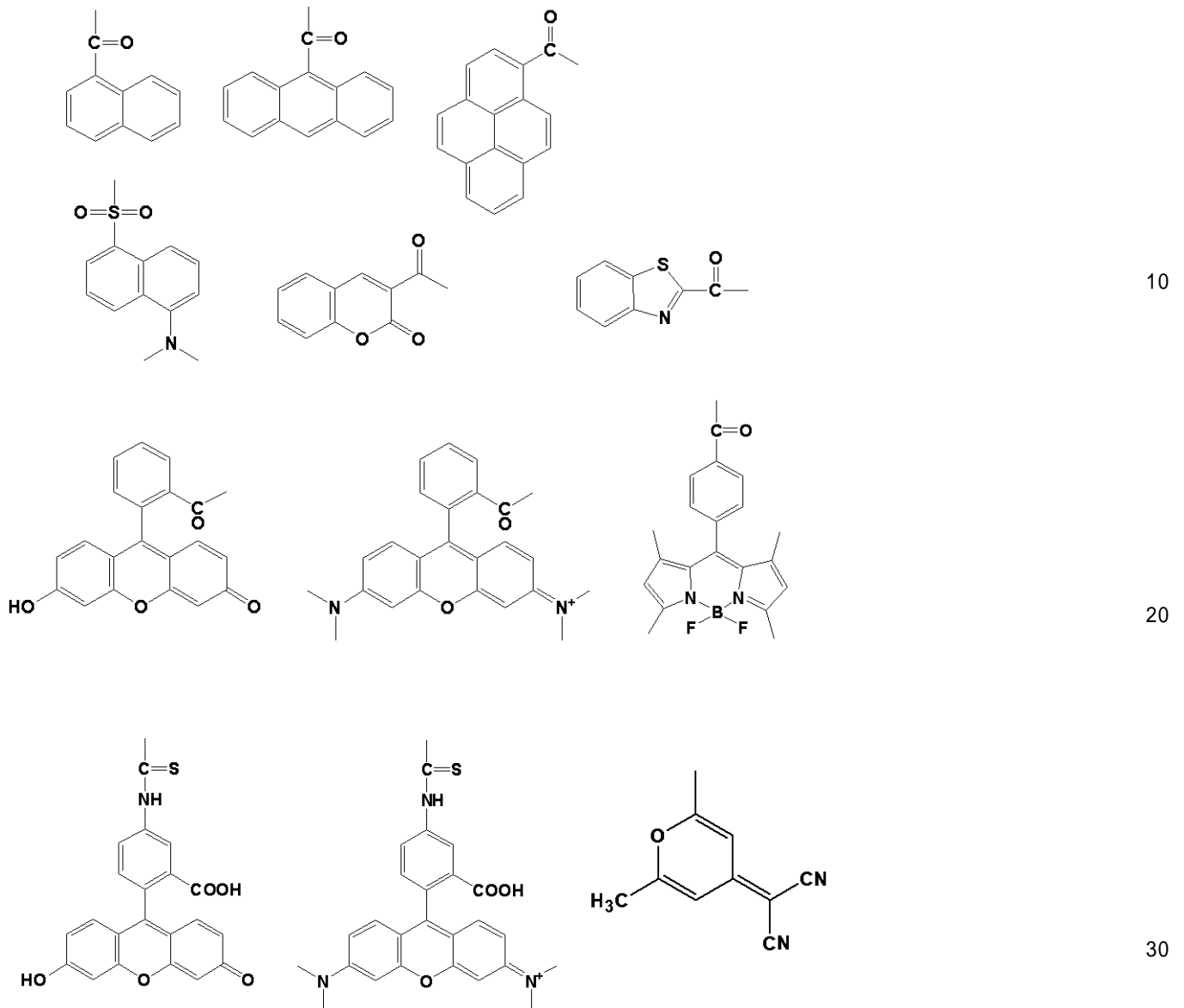


20

30

40

【化 2 1】

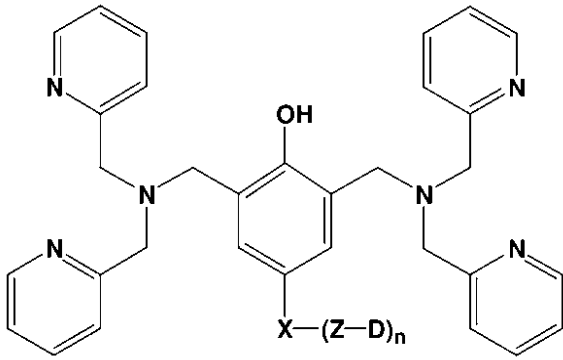


すなわち、1 - ナフチル基、9 - アントラセニル基、1 - ピレニル基、3 - クマリニル基、2 - ベンゾチアゾリル基、1 - ボロンジピロメタニル基、4 - フルオレセニル基、N, N, N', N' - テトラメチル - 4 - ローダミニル基、ナフタレン - 1 - カルボニル基、アントラセン - 9 - カルボニル基、ピレン - 1 - カルボニル基、ダンシル基、クマリン - 3 - カルボニル基、ベンゾチアゾール - 2 - カルボニル基、フルオレセイン - 2 - カルボニル基、N, N, N', N' - テトラメチル - ローダミン - 2 - カルボニル基、ボロンジピロメタン - 1 - カルボニル基、フルオレセイン - 2 - カルボン酸 - 4 - チオウレアニル基、N, N, N', N' - テトラメチル - ローダミン - 2 - カルボン酸 - 4 - チオウレアニル基、4 - (ジシアノメチレン) - 2 - メチル - 4 H - ピラニル基などであり得る。

【0031】

本発明の組成物の好ましい一態様において、本発明の組成物は、以下の式

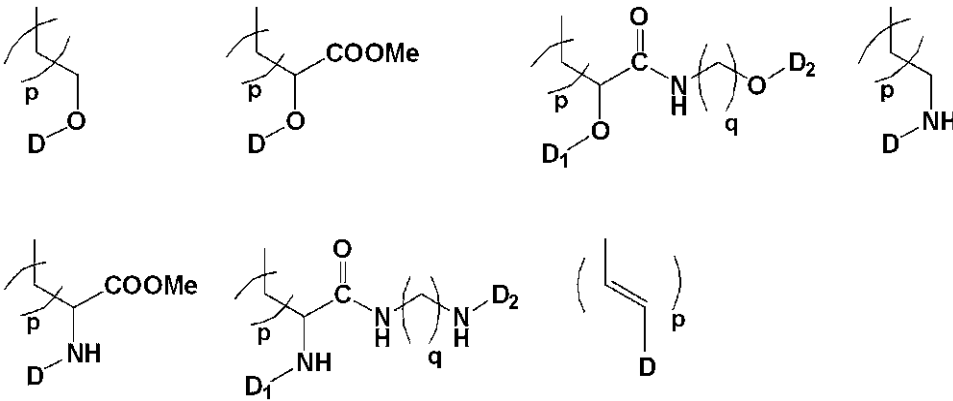
【化 2 2】



10

式中、- X - (Z - D)_n が、以下

【化 2 3】



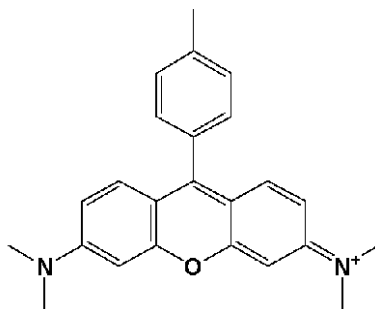
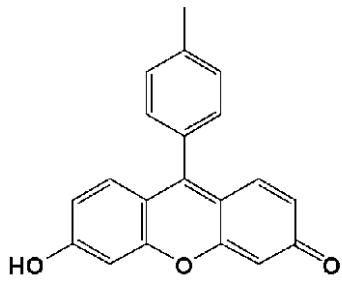
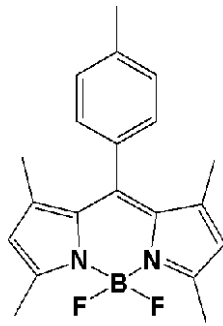
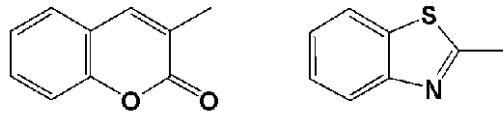
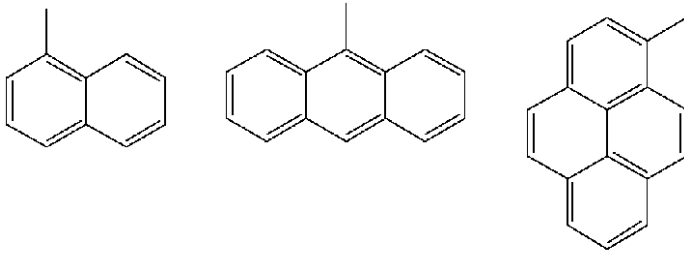
20

からなる群から選択され、

【 0 0 3 2 】

D が、

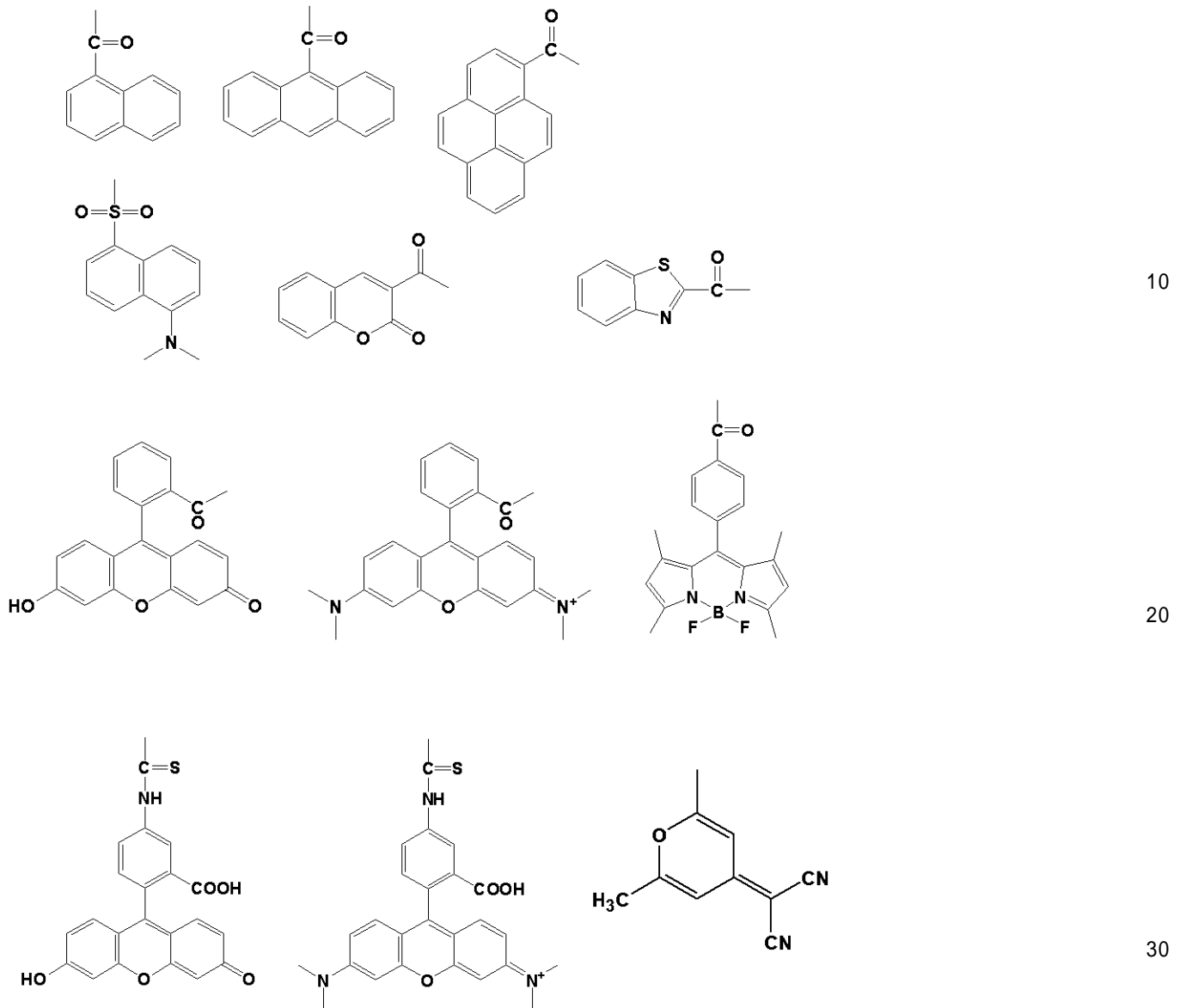
【化 2 4】



10

20

【化 2 5】



からなる群から選択され、

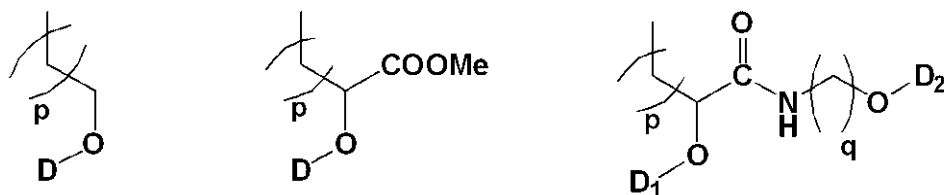
D_1 および D_2 は互いに独立して D と同一の意味を示し、

p および q は互いに独立して 1 ~ 10 である、で表される化合物および / またはその塩を 1 種または 2 種以上含む。好ましくは p および q は互いに独立して 1 ~ 3 である。

【0033】

本発明の組成物の好ましい一態様は、前記式 (I) で表される化合物であって、式中 - $X - (Z - D)_n$ が、

【化 2 6】



からなる群から選択され、

D が、

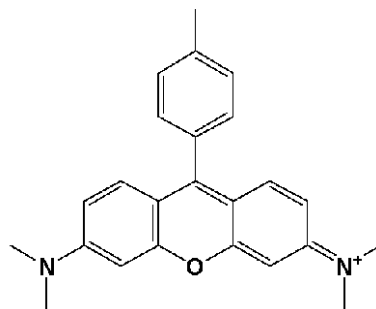
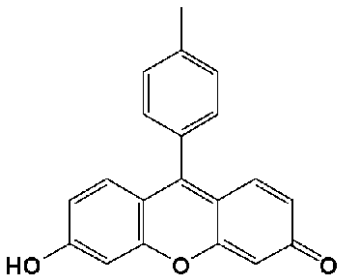
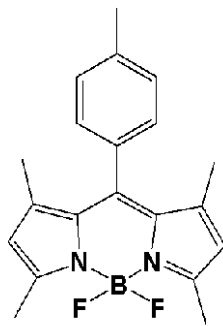
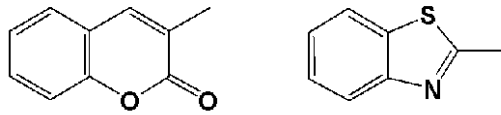
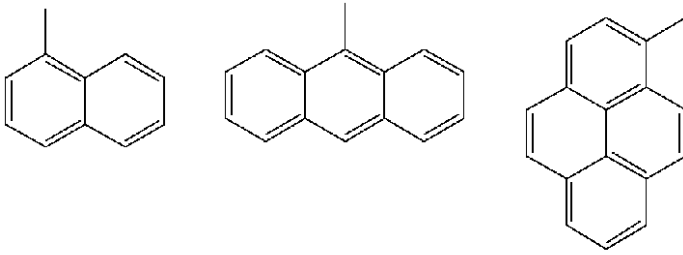
10

20

30

40

【化 2 7】

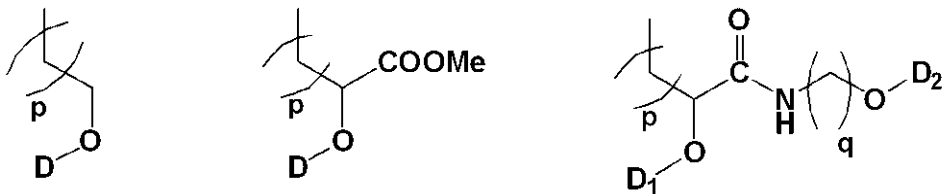


からなる群から選択される、前記化合物および/またはその塩を1種または2種以上含む。

【0034】

本発明の組成物の好ましい一態様は、前記式(I)で表される化合物であって、式中 -X-(Z-D)_nが、

【化 2 8】



からなる群から選択され、Dが、

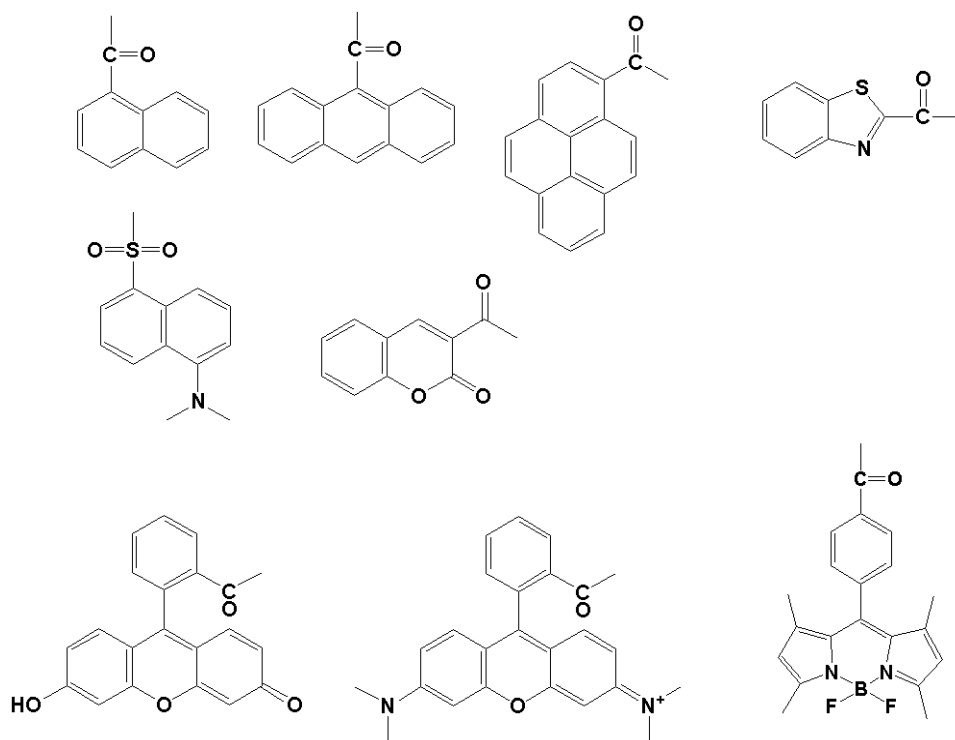
10

20

30

40

【化 2 9】



10

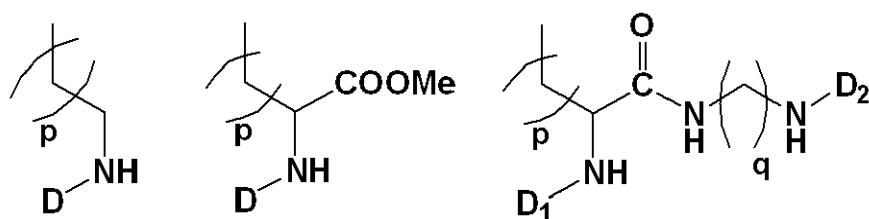
20

からなる群から選択される、前記化合物および / またはその塩を 1 種または 2 種以上含む。

【 0 0 3 5】

本発明の組成物の好ましい一態様は、前記式 (I) で表される化合物であって、式中 - X - (Z - D)_n が、

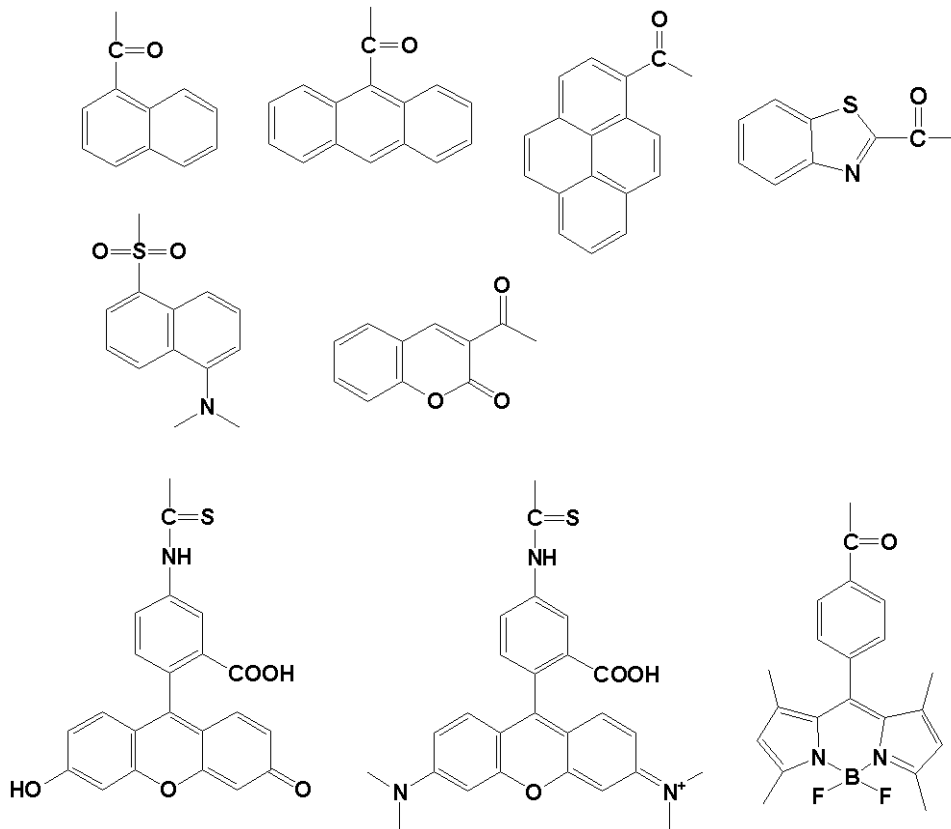
【化 3 0】



30

からなる群から選択され、
D が、

【化 3 1】



10

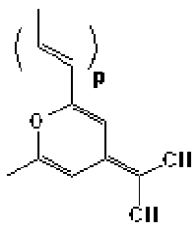
20

からなる群から選択される、前記化合物および / またはその塩を 1 種または 2 種以上含む。

【 0 0 3 6】

本発明の組成物の好ましい態様は、前記式 (I) で表される化合物であって、式中 - X - (Z - D)_n が、

【化 3 2】



30

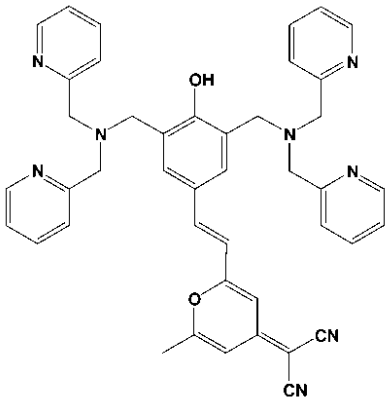
であり、p が 1 ~ 5 である、前記化合物および / またはその塩を 1 種または 2 種以上含む。

【 0 0 3 7】

本発明の組成物の好ましい態様において、本発明の組成物は少なくとも 1 種の式 I a ~ I c

40

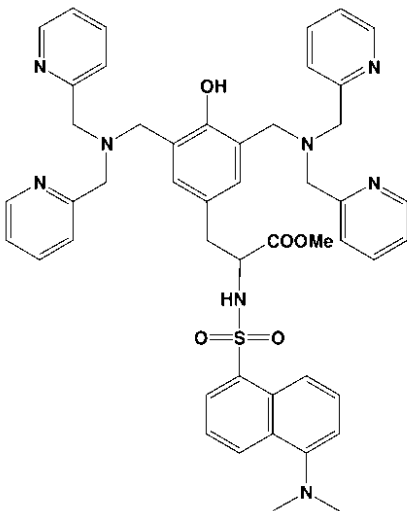
【化 3 3】



(Ia)

10

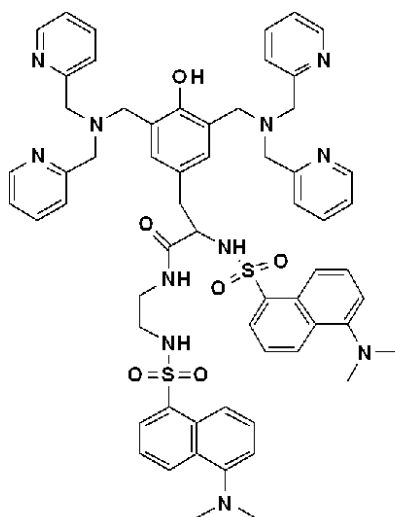
【化 3 4】



(Ib)

20

【化 3 5】



(Ic)

30

40

で表される化合物および/またはその塩を1種または2種以上含む。

【0038】

本発明の組成物は、式(I)で表される化合物および/またはその塩を含むが、1種または2種以上含んでもよい。塩としては、これに限定するものではないが、ピリジン環に遷移金属イオン(亜鉛、コバルト、ニッケル、銅、カドミウム、水銀、鉄、マンガン)が配位した錯体、フェノール性水酸基のHがNaまたはKに置換された塩などが挙げられる

50

。

【0039】

本発明の式(I)で表される化合物は蛍光化合物である。本発明において、「蛍光」とは、特定の波長の光(励起光)を照射したときに、典型的には照射した光よりも長波長の極大波長を有する光(蛍光)を生じる性質を意味する。本発明による化合物(蛍光化合物)の蛍光の極大波長は特に制限されないが、例えば450~600nmである。蛍光の測定は、種々の機器を用いて行うことができる。例えば、市販の蛍光イメージアナライザー(アトー、TECAN、GEヘルスケアなどから入手可能)などにより、測定を行うことができる。

【0040】

本発明の組成物は、分離されたタンパク質を含む担体に適用するだけでタンパク質の染色および固定を行うことができ、適用後の該担体の脱色を必要としない。また、タンパク質をゲルに固定化するための工程、すなわち染色前後の担体の固定化工程および洗浄工程も必要としない。例えばタンパク質を含むサンプルを電気泳動により分離した後、分離されたタンパク質を含む担体、例えばゲル等の電気泳動担体を本発明の組成物に浸漬するだけで、タンパク質の染色および固定を行うことができる。そして、従来のSYPRO Ruby法などで必須工程とされる、担体に残存する過剰な染色組成物を除去するための脱色工程を必要としない。したがって、担体を浸漬するだけで染色工程が終了し、そのまま目視またはUVもしくは可視光励起によるイメージング解析などにより、定性もしくは定量分析を行うことができる。このように、固定化工程、洗浄工程および脱色工程を必要とせずに、ワンステップで染色工程が完了することを、本明細書において「ワンショット染色」という。

【0041】

本発明の組成物がワンショット染色可能な理由は必ずしも明らかではないが、式(I)で表される化合物が、タンパク質と結合することにより、蛍光の強度が増すためと考えられる。式(I)中の-X-(Z-D)_nおよびピリジル基がタンパク質と特異的に強く結合することにより、タンパク質を固定化すると考えられる。また担体自体に残存する式(I)で表される化合物の蛍光強度はタンパク質と結合したものに比べ相対的に非常に小さいため、低いバックグラウンドを達成することができ、優れたS/N比で高感度にタンパク質を検出することが可能になると考えられる。本発明の組成物による染色において、極めて高い蛍光強度を達成できる理由は必ずしも明らかではないが、式(I)中の-X-Zの長さおよび/または立体構造が関与している可能性がある。

【0042】

本発明の組成物はまた、Native-PAGEを行ったゲルを染色することができる。これは、ワンショット染色可能なOriole法は使用することができない点からみても、本発明の格別な利点の1つである。

【0043】

本発明の別の側面は、タンパク質の分析方法であって、電気泳動により担体上でタンパク質を分離するステップ、該担体を本発明の組成物を含有する水溶液に浸漬することによって、タンパク質の染色および固定を行うステップ、を含み、浸漬後に担体を脱色するステップを含まない、前記方法に関する。

【0044】

本発明の方法の典型的な実施形態は、例えば、電気泳動によりタンパク質を含むサンプルを分離した後、ゲル等の電気泳動担体を式(I)で表される蛍光化合物を含有する水溶液に浸漬し、これにより担体上のタンパク質に式(I)で表される蛍光化合物を作用させる。

【0045】

本発明の組成物は水溶液(以下、単に「染色液」と呼ぶ場合がある。)であり、典型的にはバッファーであり、好ましくはpH1~4、より好ましくはpH2~3に調整される。該水溶液は、アルコールを含有してもよい。アルコールは、水又はバッファーに対して溶解性の

10

20

30

40

50

高いものであれば制限されないが、好ましくは炭素数が1~4個のアルコール、さらに好ましくは炭素数が1~3のアルコールである。バッファーは、リン酸バッファー、クエン酸バッファー、グリシンバッファー、トリス-グリシンバッファー、トリスバッファー、MOPSバッファーなど、当該技術分野で通常用いられるいずれのバッファーでもよい。

【0046】

本発明の組成物による浸漬時間は、例えば10~120分間、好ましくは90分間以下、より好ましくは30~60分間である。

【0047】

本発明の方法の一態様において、本発明の方法は、電気泳動後に上記蛍光化合物水溶液に電気泳動担体を浸漬する代わりに、電気泳動用バッファーに本発明の化合物を添加することにより、電気泳動中に本発明の化合物とタンパク質との相互作用を同時に行うことによっても実施することができる。これは、より正確な分析結果を与えるという意味でも非常に有利である。

10

【0048】

本発明において、「担体」または「電気泳動担体」は、電気泳動に通常用いられる担体であれば特に制限されないが、例えば、メンブレン（例えば、セルロースアセテートメンブレン、ニトロセルロースメンブレン、ポリビニリデンジフルオリド（PVDF）メンブレン等）、及びゲル（ポリアクリルアミドゲル、アガロースゲル等）が挙げられる。好ましくは、担体はゲルであり、とりわけポリアクリルアミドゲル、もしくは、SDS-ポリアクリルアミドゲルである。

20

【0049】

本発明の方法の別の態様において、本発明の方法は、サンプル中のタンパク質を本発明の化合物に接触させ、その後、電気泳動を行うことによって実施することもできる。

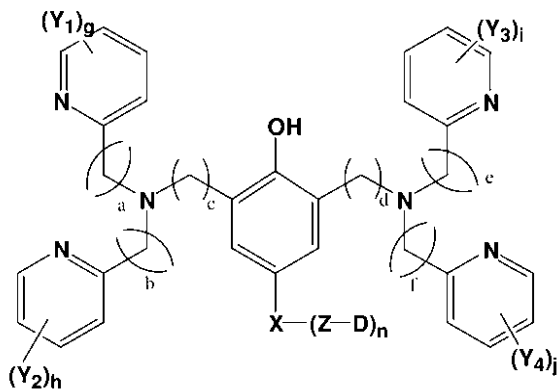
【0050】

本発明の方法のさらに別の態様において、本発明の方法は、免疫沈降法、ドットプロット法など、電気泳動を用いないタンパク質の解析法においても利用することができる。

【0051】

本発明のさらなる別の側面は、式 I

【化36】



30

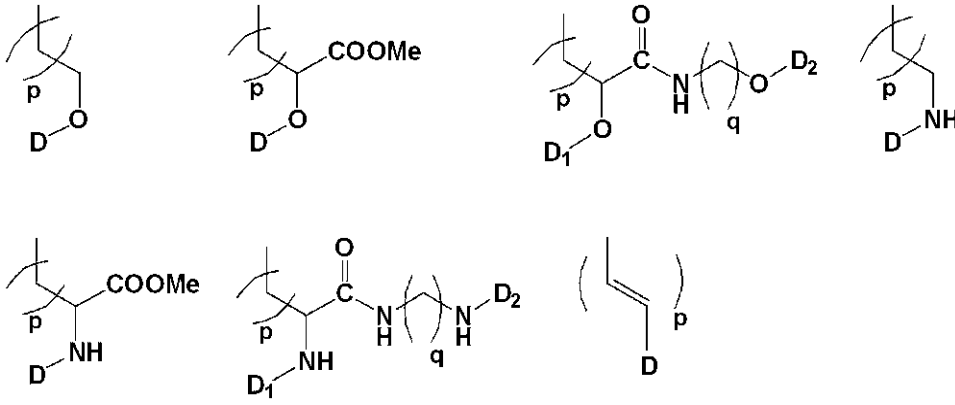
(1)

式中、

- X - (Z - D)_n が、以下

40

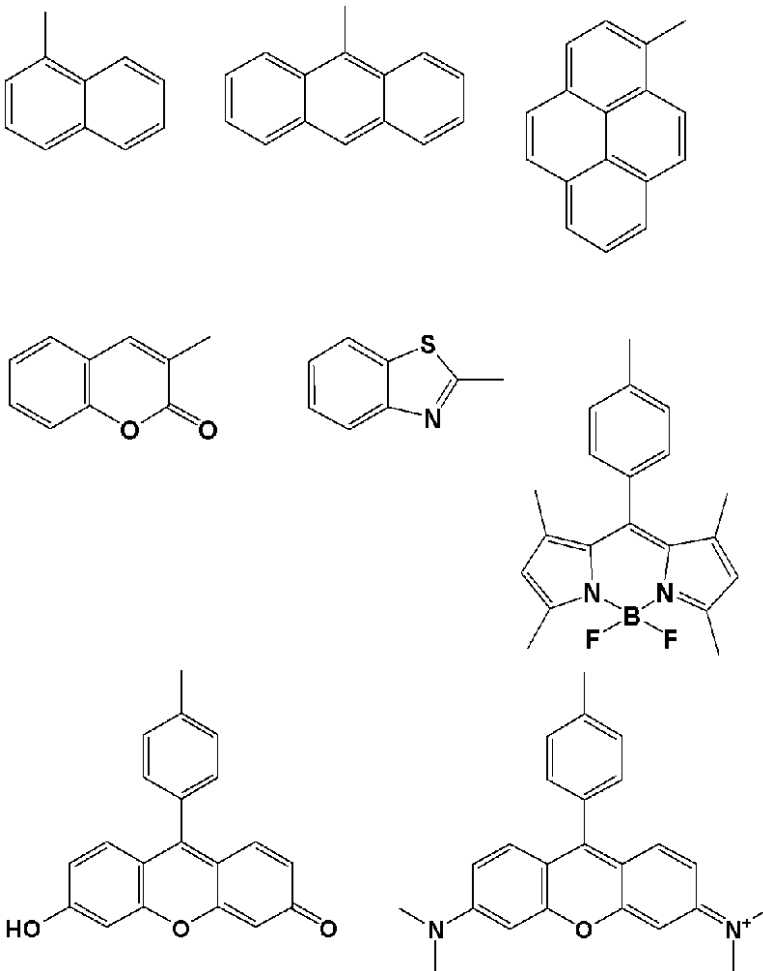
【化 3 7】



10

からなる群から選択され、
Dが、

【化 3 8】

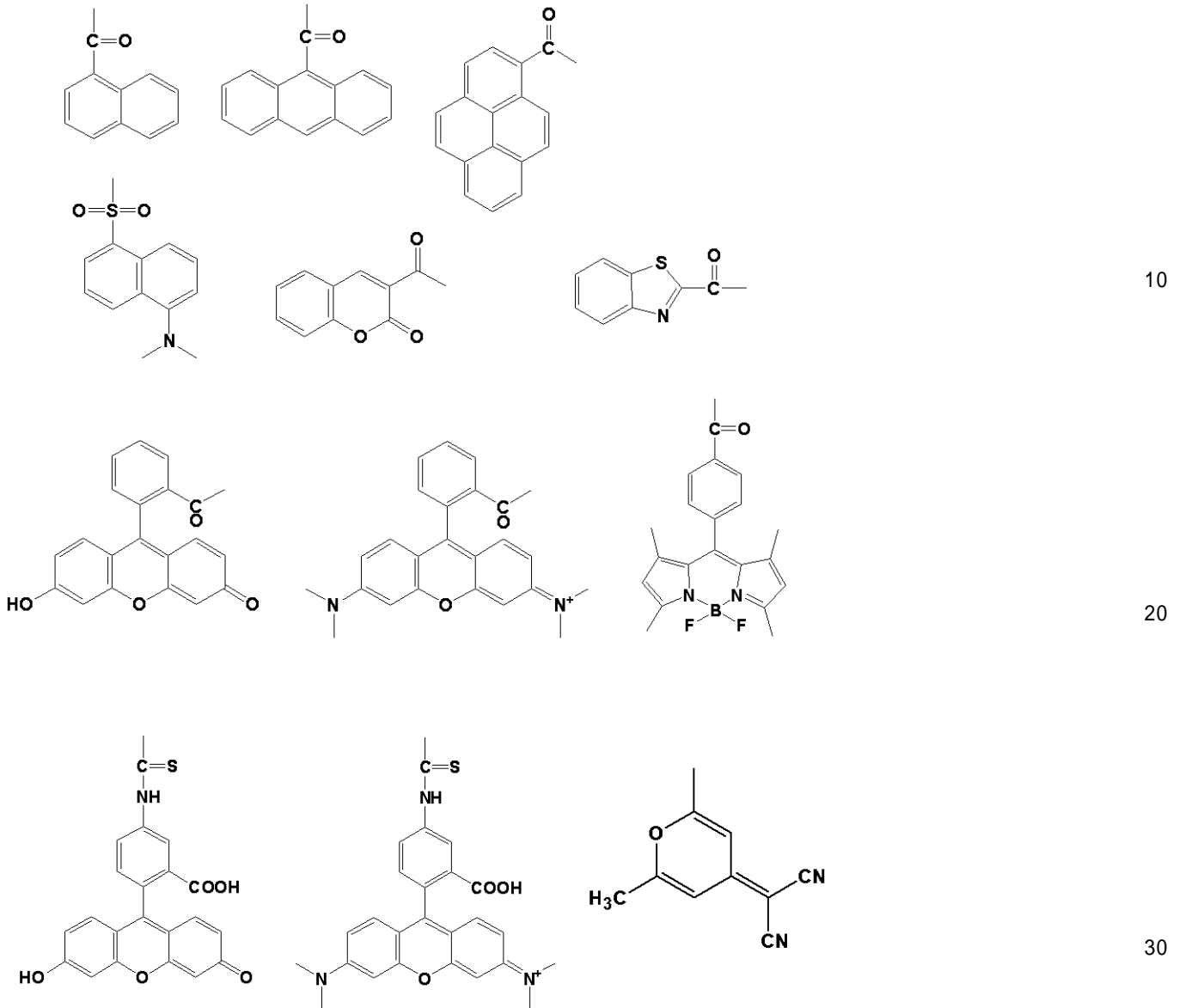


20

30

40

【化 3 9】



からなる群から選択され、

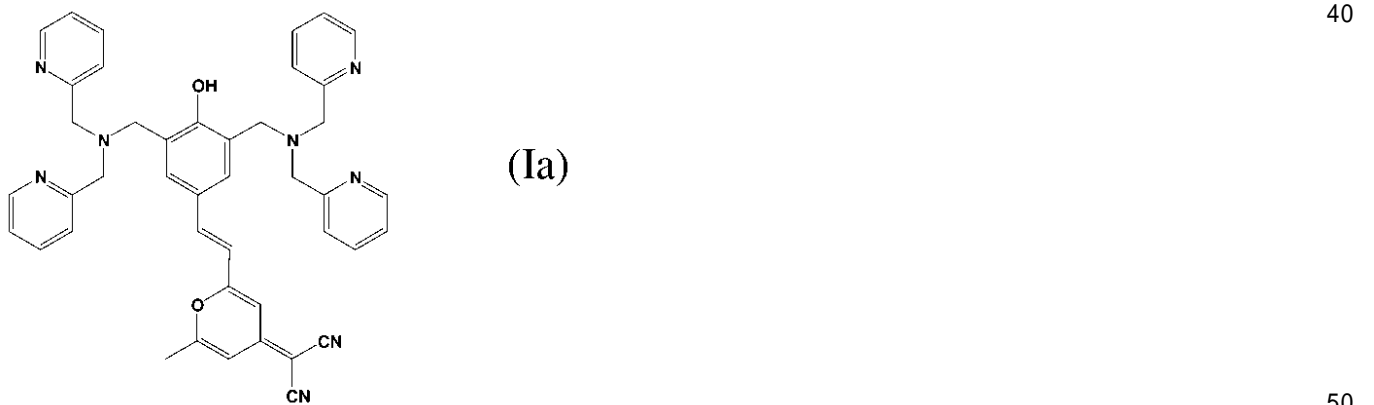
D₁ および D₂ は互いに独立して D と同一の意味を示し、

p および q は互いに独立して 1 ~ 10 の数である、で表される化合物、またはその塩に関する。

【 0 0 5 2】

本発明の化合物は、好ましくは式 I a ~ I c で表される構造を有する。

【化 4 0】



(Ia)

10

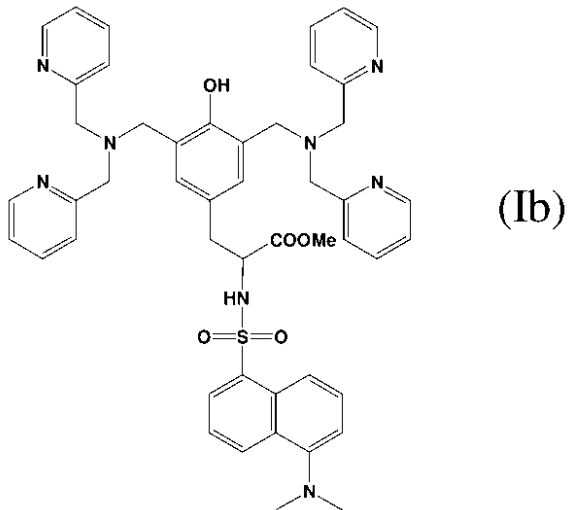
20

30

40

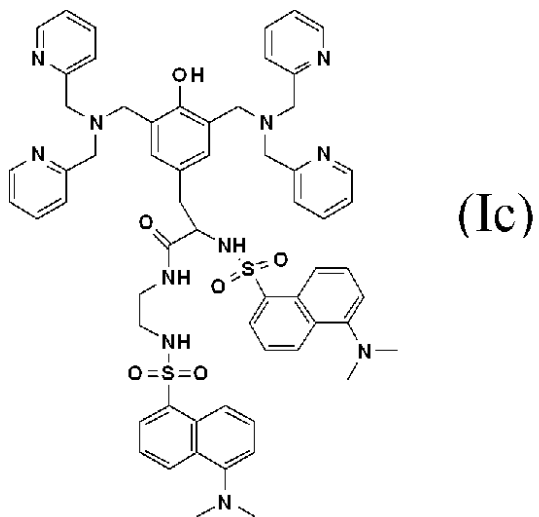
50

【化 4 1】



10

【化 4 2】



20

30

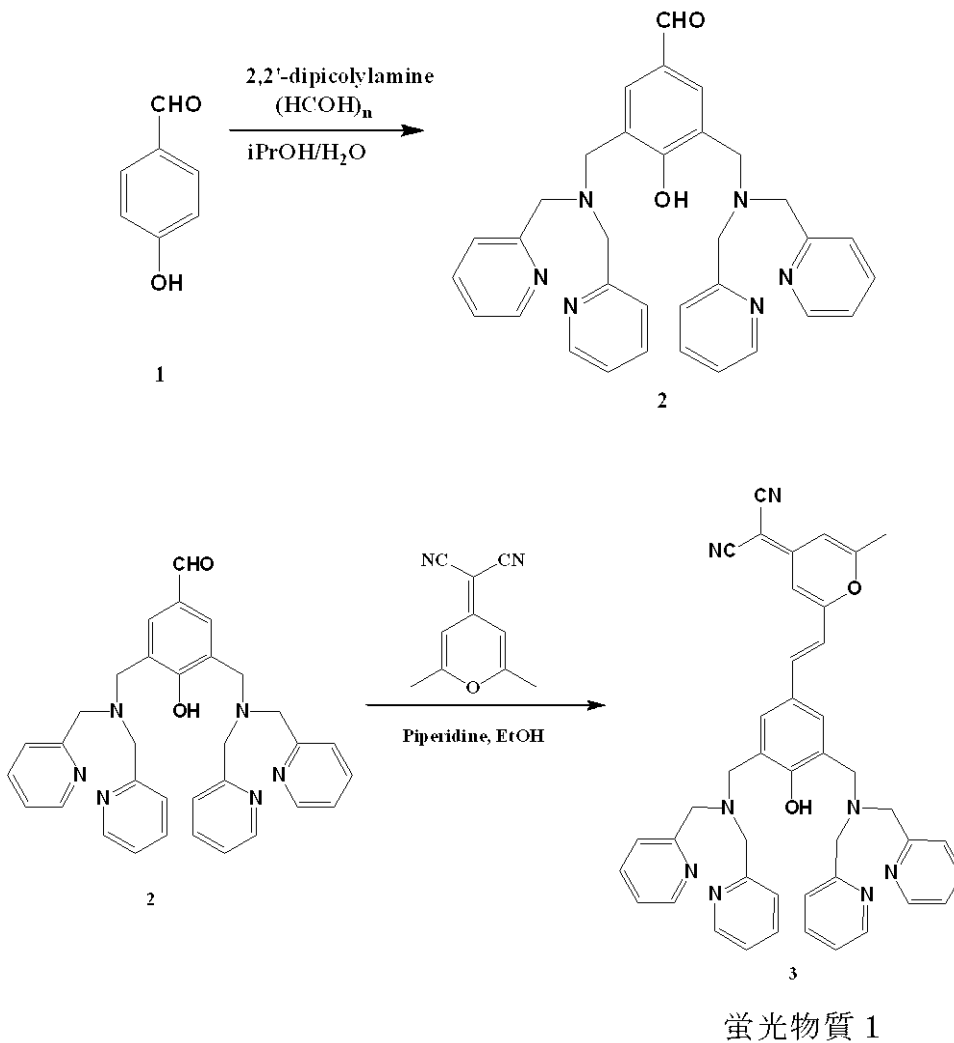
【実施例】

【0053】

以下、本発明を実施例に基づき説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例 1) 蛍光物質 1 (I a) の合成方法

【化 4 3】



100mL三口フラスコに2,2'-dipicolylamine 5.0 g (25.3 mmol), paraformaldehyde 1.2 g (40.4 mmol), 水/i-PrOH = 5:3 v/v 72 mLを加え、1N HClを加えpH 8に調製した。80 °Cで30分間加熱後、4-hydroxy benzaldehyde 3.0 g (10.1 mmol)を加え、12時間還流した。溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチルに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を減圧留去し、カラムクロマトグラフィー (Al₂O₃, CH₂Cl₂ : MeOH = 300 : 10 v/v)で精製し、合成中間体を得た。

さらに、100mLなす型フラスコに3,5-bis((bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)-4-hydroxyl benzaldehyde 0.5 g (0.9 mmol), 4-(Dicyanomethylene)-2,6-dimethyl-4H-pyran 0.15 g (0.9 mmol), Piperidine 0.07 g (0.9 mmol), EtOH 50mLを加え、12時間還流した。溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチルに溶解し、水で洗浄した。Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を減圧留去し、カラムクロマトグラフィー (Al₂O₃, CH₂Cl₂ : MeOH = 200 : 10 v/v)で精製し、蛍光物質 1 (I a)を得た。

【 0 0 5 4】

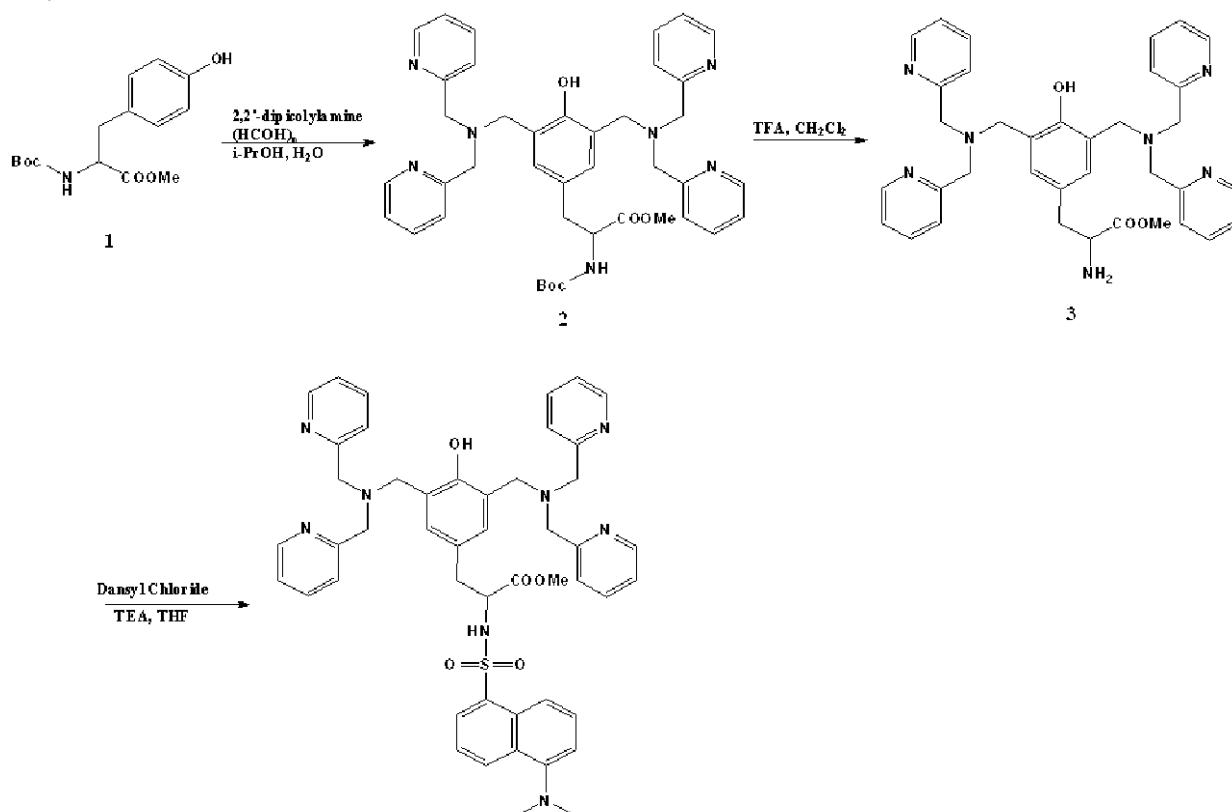
【表 1】

¹H-NMR(CDC₃, 400MHz, r.t., TMS, δ/ppm) 2.24 (s, 3H), 3.66 (s, 4H), 3.94 (s, 8H), 5.27 (s, 2H), 6.79 ~ 6.84 (m, 2H), 6.89 (s, 2H), 7.33 (d, 8H), 7.76 (t, 4H), 8.48 (d, 4H), 9.86 (s, 1H)

【 0 0 5 5】

(実施例 2) 蛍光物質 2 (I b) の合成方法

【化 4 4】



蛍光物質 2

300mL三口フラスコに、2,2'-dipicolylamine 5.03 g (25.3 mmol)、paraformaldehyde 1.21 g (40.4 mmol)、水62.5mL、i-PrOH 37.5mL、2N HCl 2.0mLを加え、80 °Cで30分間加熱した。Boc-L-tyrosine-OMe 3.0 g (10.1 mmol)を加え、24時間還流した。i-PrOHを減圧留去後、0 °Cに冷却し、析出したオイル状物質を分取した。酢酸エチルに溶解後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、カラムクロマトグラフィー(Al_2O_3 , クロロホルム:メタノール = 10 : 1 v/v)で精製し、茶色のオイル状化合物を得た。

30

さらに、50mL三口フラスコに、化合物2 3.6 g (5.1 mmol)、ジクロロメタン25mLを加え、氷浴につけた。トリフルオロ酢酸15mLを15分間かけて加え、室温に戻して2時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、水を加え、アンモニア水を用いて塩基性にした後、ジクロロメタンで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、合成中間体を得た。

さらに、100mL三口フラスコに化合物3 0.24 g(0.38mmol)、TEA 0.04g (0.45mmol)、THF 20mLを加え、アルゴン気流下、氷浴につけた。Dansylchloride 0.12g (0.45mmol)をTHF10mLに溶解後、滴下ロートを用いて30分間かけて加えた。氷浴中で30分間攪拌後、室温に戻し12時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、残渣をクロロホルムに溶解し、水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、カラムクロマトグラフィー(Al_2O_3 , $CHCl_3$: MeOH = 10 : 0.5 v/v)で精製し、蛍光物質 2 を得た。

40

【 0 0 5 6】

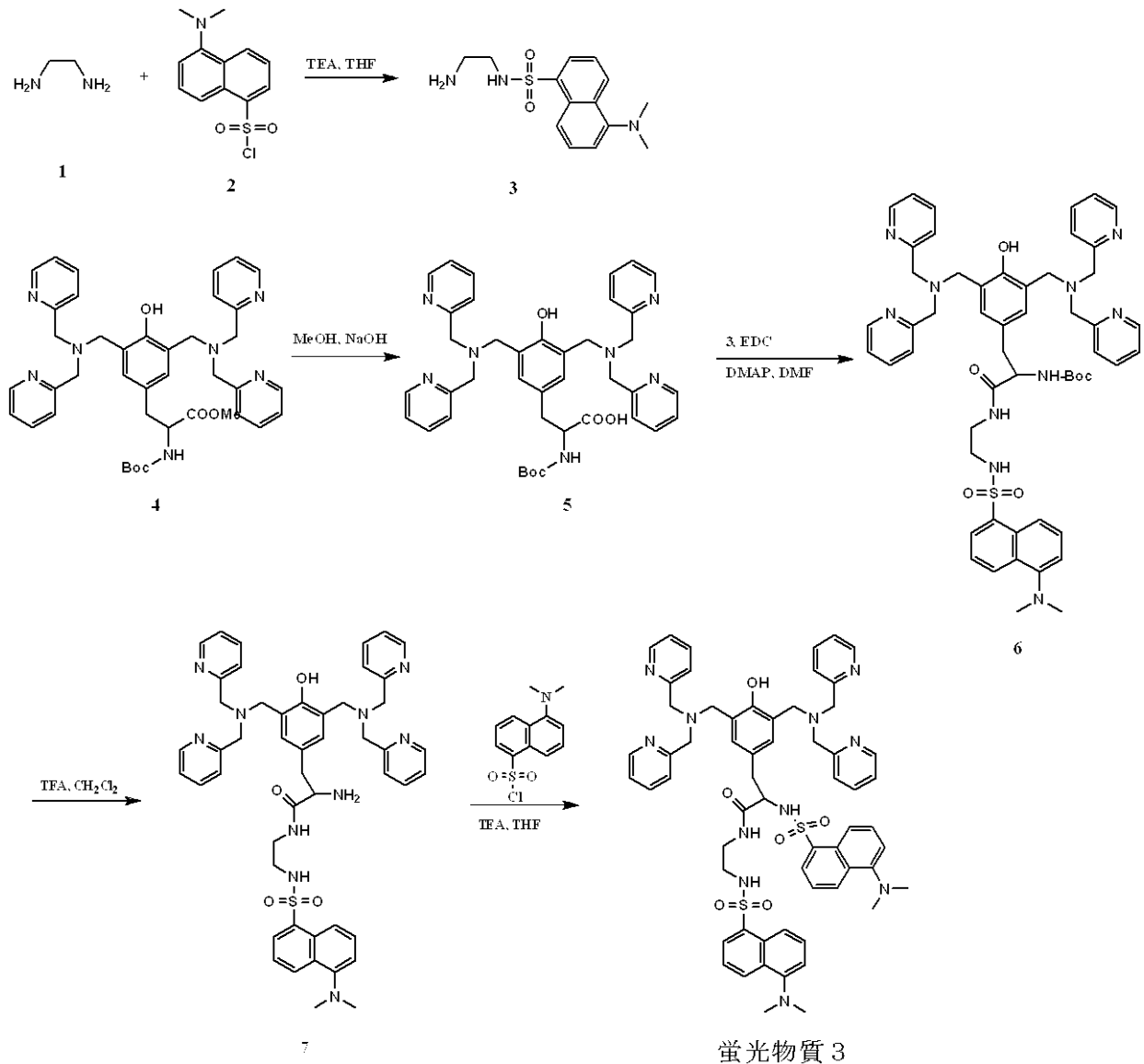
【表 2】

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz, r.t., TMS, δ /ppm) 2.79 (6H, s), 3.01 (2H, d), 3.62 (3H, s), 3.78 (4H, s), 3.85 (8H, s), 4.21 – 4.25 (1H, m), 6.92 (2H, s), 7.05 (1H, d), 7.15 (4H, d), 7.30~7.40 (2H, m), 7.49 (4H, t) 7.61 (4H, t), 8.24~8.27 (2H, m), 8.41 (1H, d), 8.56 (4H, d), 11.00 (1H, br s)

【0057】

(実施例3) 蛍光物質3 (Ic) の合成方法

【化45】



【0058】

500mL三口フラスコに、化合物1 1.95g (31.5mmol)、トリエチルアミン 3.18g (31.5mmol)、THF 150mLを加え、氷浴につけた。化合物2 5.43g(20.1mmol)をTHF50mLに溶解後、滴化ロートを用いて、1時間かけて加えた。氷浴中で30分間攪拌後、室温に戻して12時間攪拌した。水を加えて反応を停止後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチルに溶解後、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、カラムクロマトグラフィー(SiO_2 , CHCl_3 : MeOH = 10 : 1v/v アセトン:トリエチルアミン= 200 : 5v/v)で精製し、合成中間体を得た。

さらに、300mL三口フラスコに化合物4 6.0g(8.88mmol)、1M NaOH水溶液18mL、メタノール100mLを加え、室温で15時間攪拌した。1N HClを用いてpH7~8に調製後、溶媒を減圧留

去した。水で希釈後、ジエチルエーテルで洗浄し、pH4に調製した。ジクロロメタンで抽出後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去後、ヘキサン、エーテルの順に洗浄し、合成中間体を得た。

【 0 0 5 9 】

さらに、50mL三口フラスコに化合物3 0.13g(0.45mmol)、化合物5 0.34g(0.50mmol)、DMAP 0.24g(2.0mmol)、DMF 15mLを加え、氷浴につけた。EDC 0.14g(0.75mmol)を加え、氷浴中で30分間攪拌後、室温に戻して24時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、残渣をクロロホルムに溶解し、水で洗浄した。溶媒を減圧留去後、カラムクロマトグラフィー(Al₂O₃, クロロホルム：メタノール = 10:1 v/v)で精製し、合成中間体を得た。

さらに、50mL三口フラスコに、化合物6 0.5 g (0.51mmol)、ジクロロメタン10mLを加え、氷浴につけた。トリフルオロ酢酸1.5mLを15分間かけて加え、室温に戻して2時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、水を加え、アンモニア水を用いて塩基性にした後、ジクロロメタンで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、目的化合物を得た。

さらに、100mL三口フラスコに、化合物7 0.45 g (0.51mmol)、TEA 0.06g (0.61mmol)、THF 20mLを加え、氷浴につけた。ダンシルクロリド0.16g (0.61mmol)をTHF10mLに溶解後、滴下ポートを用いて10分間かけて加えた。氷浴中で30分間攪拌後、室温に戻して12時間攪拌した。水を加えて反応を停止後、溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルムに溶解し、水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、カラムクロマトグラフィー(Al₂O₃, CHCl₃ : MeOH = 100 : 1 v/v)で精製し、蛍光物質3を得た。

【表3】

¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz, r.t., TMS, δ/ppm) 2.87 (6H, s), 2.90 (6H, s), 3.01 (2H, d), 3.06~3.08 (2H, m), 3.17~3.22 (2H, m), 3.79 (4H, s), 3.85 (8H, s), 4.51 – 4.53 (1H, m) 5.22 (1H, d), 5.38 (1H, t), 5.65 (1H, t), 7.03 (2H, s) 7.15 ~ 7.19 (7H, m) 7.46~7.58 (7H m) 7.61 (4H, t), 7.63 (1H, d), 8.26~8.32 (4H, m), 8.54~8.59 (5H, m), 11.09 (1H, br s)

【 0 0 6 0 】

(実施例4) 極大吸収波長及び極大蛍光波長の測定

蛍光物質1を50 μg/mL、蛍光物質2を100 μg/mLとなるよう、それぞれ50mM MES-NaOH pH5.9、50mM HEPES-NaOH pH7.2に溶解し、吸収スペクトルを測定した。測定装置にはU-3210(日立ハイテクノロジーズ)を使用した。また、蛍光物質1を50 μg/mL、蛍光物質2を5 μg/mLとなるよう、それぞれ50mM MES-NaOH pH5.9、50mM HEPES-NaOH pH7.2に溶解し、蛍光スペクトルを測定した。測定装置には、RF-1500(島津製作所)を使用した。結果を表4に示す。蛍光物質1は可視光のゲルイメージャー、蛍光物質2はUVトランスイルミネーターに適した光学特性を有していることが確認された。

【 0 0 6 1 】

【表4】

蛍光物質1、2の光学的特性

	極大吸収波長	極大蛍光波長
蛍光物質1	260, 324, 434 nm	566 nm (励起波長: 418 nm)
蛍光物質2	304 nm	516 nm (励起波長: 304 nm)

【 0 0 6 2 】

(実施例5) 電気泳動ゲルの染色(蛍光物質1)

(1) サンプル調製

市販の分子量マーカー(Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis; GEヘルスケア)を添付文書に記載の方法で再構成し、変性処理を行った後、使用時まで-80 で凍結保存した。解凍した分子量マーカーにサンプル希釈液(精製水3.8mL、0.5Mトリス 塩酸バッファー(pH6.8)1.0mL、グリセロール0.8mL、100g/L ドデシル硫酸ナトリウム1.6 mL、5g/Lプロモフェノールブルー0.8 mLの混合液)を添加して、2倍希釈系

列を10管目まで作製した。このマーカ－には、Phosphorylase B (97kDa)、Albumin (66kDa)、Ovalbumin (45kDa)、Carbonic anhydrase (30kDa)が含まれる。

【0063】

(2) 電気泳動によるタンパク質の分離

電気泳動の条件は以下の通りである：

電気泳動装置：ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽AE6450 (アトー)

ポリアクリルアミドゲル：マルチゲルI Eミニ10/20 (13W) (コスモバイオ)

電気泳動用バッファー：25 mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、192 mMグリシン、3.5 mMドデシル硫酸ナトリウム (pH8.3)

上記(1)で調製した希釈系列の各サンプルをそれぞれ5 μ L/ウェルでゲルにアプライし、30 mAの定電流で45分間電気泳動を行った。ゲルにアプライしたタンパク質量は、Phosphorylase Bが0.7~355ng/ウェル、Albuminが0.8~415ng/ウェル、Ovalbuminが1.4~35ng/ウェル、Carbonic anhydraseが0.8~415ng/ウェルとした。

10

【0064】

(3) タンパク質の検出

電気泳動後のゲルを直ちに染色液 (16 μ g/mLの化合物1を溶解させたバッファー (25 mMリン酸バッファー (pH2.5)) / 精製水/メタノール = 9/9/2 (v/v)) に30分間、浸漬した。ゲル撮影装置を使用し、可視光を照射しながら撮影した。

ゲル撮影装置：ライトキャプチャーII (アトー)

光源：緑色LED (525 nm)

20

カットフィルター：R-60

結果を表5、図1に示す。タンパク質の染色に要した時間はわずか30分間、操作はゲルを染色液に浸すだけの1工程のみでありながら、銀染色と同等の感度で検出された。

【表5】

蛍光物質1によるタンパク質の検出結果

(染色液：リン酸バッファー/精製水/メタノール)

タンパク質	検出感度 (ng)
Phosphorylase B	1.3
Albumin	3.2
Ovalbumin	5.7
Carbonic anhydrase	3.2

30

【0065】

(実施例6) 電気泳動ゲルの染色 (蛍光物質2)

(1) サンプル調製

実施例5に記載の分析条件に従って、サンプル調製を行った。

【0066】

(2) 電気泳動によるタンパク質の分離

実施例5に記載の分析条件に従って、電気泳動によるタンパク質の分離を行った。

40

【0067】

(3) タンパク質の検出

電気泳動後のゲルを直ちに染色液 (16 μ g/mLの蛍光物質2を溶解させたバッファー (25 mMグリシンバッファー (pH2.5)) / 精製水/エタノール = 9/9/2 (v/v)) に30分間、浸漬した。ゲル撮影装置を使用し、UVを照射しながら撮影した。

ゲル撮影装置：プリントグラフ (アトー)

光源：UV (365 nm)

カットフィルター：SCF515

結果を表6、図2に示す。タンパク質の染色に要した時間はわずか30分間、操作はゲルを染色液に浸すだけの1工程のみでありながら、銀染色と同等の感度で検出された。

50

【 0 0 6 8 】

【表 6】

蛍光物質 2 によるタンパク質の検出結果

(染色液：グリシンバッファー／精製水／エタノール)

タンパク質	検出感度 (ng)
Phosphorylase B	1.3
Albumin	1.6
Ovalbumin	2.9
Carbonic anhydrase	1.6

10

【 0 0 6 9 】

(実施例 7) 電気泳動ゲルの染色 (蛍光物質 3)

実施例 5 に記載の分析条件に従って、サンプル調製、電気泳動によるタンパク質の分離を行った。電気泳動後のゲルを直ちに、蛍光物質 3 (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を溶解させた染色液 (25 mM グリシンバッファー (pH2.5) / 精製水 / エタノール = 9/9/2 (v/v)) に 30 分間、浸漬した。ゲル撮影装置を使用し、UV を照射しながら撮影した。

ゲル撮影装置：プリントグラフ (アトー)

光源：UV (365 nm)

カットフィルター：SCF515

20

結果を表 7、図 3 に示す。タンパク質の染色に要した時間はわずか 30 分間、操作はゲルを染色液に浸すだけの 1 工程のみでありながら、銀染色と同等の感度で検出された。しかし、バックグラウンドは高かった。

【 0 0 7 0 】

【表 7】

蛍光物質 3 によるタンパク質の検出結果

(染色液：グリシンバッファー／精製水／エタノール)

タンパク質	検出感度 (ng)
Phosphorylase B	2.6
Albumin	3.2
Ovalbumin	5.7
Carbonic anhydrase	1.6

30

【 0 0 7 1 】

(実施例 8) Native-PAGEゲルの染色 (蛍光物質 2)

Bovine Serum Albumin (以下 BSA) を検体とした Native-PAGE のゲルをワンショットタンパク質染色試薬 (蛍光物質 2) で染色し、ゲル撮影装置で撮影した。比較対照として Oriole を用いて同様にゲルを染色した。

40

【 0 0 7 2 】

(1) サンプル調製

BSA (Proliant 社) を 1x Native-PAGE 用サンプルローディングバッファー {62.5mM Tris-HCl pH6.8、20% (v/v) グリセリン、0.01% (w/v) プロモフェノールブルー} で 1mg/mL の濃度に溶解し、これを 1 管目とした。2 管目以降は 1x サンプルローディングバッファーによる 2 倍希釈系列とし、13 管目まで調製した。

(2) Native-PAGE

マルチゲル I I ミニ 10/20 (13W) (コスモ・バイオ) の 1~13 レーン目にサンプルの 1~13 管目をそれぞれ 5 μL アプライし、Native-PAGE (ゲル 1 枚あたり 15mA、90 分間) によりタンパク質を分離した。

50

(3) タンパク質の検出

ゲルを直ちにワンショットタンパク質染色試薬またはOrioleに浸漬し、30分おきにゲル撮影を行った。

【0073】

図4および5のとおり、ワンショットタンパク質染色試薬の場合は、ラダー状のバンドが検出された。単一のバンドにならなかったのは、BSAの多量体形成や高次構造に起因すると考えられる。一方、Orioleの場合はバンドが検出されなかった。

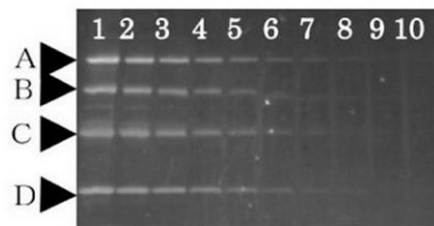
【産業上の利用可能性】

【0074】

本発明のタンパク質の分析方法により多種多様なタンパク質を等しく分析することが可能となり、本発明の方法を用いることで、例えば、生化学、医療、食品、分析化学等の分野において迅速、高感度かつ簡便なタンパク質の分析に有用である。

10

【図1】

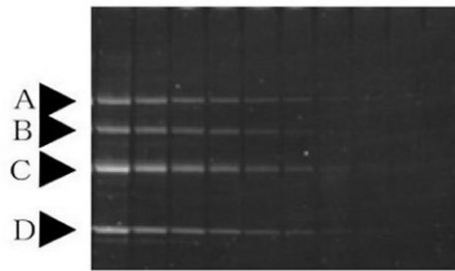


(A) Phosphorylase B、(B) Albumin、(C) Ovalbumin、(D) Carbonic anhydrase

各レーンにおけるタンパク質量 (ng)

レーン	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	335	168	83.8	41.9	20.9	10.5	5.2	2.6	1.3	0.7
B	415	208	104	51.9	25.9	13.0	6.5	3.2	1.6	0.8
C	735	368	184	91.9	45.9	23.0	11.5	5.7	2.9	1.4
D	415	208	104	51.9	25.9	13.0	6.5	3.2	1.6	0.8

【図 2】

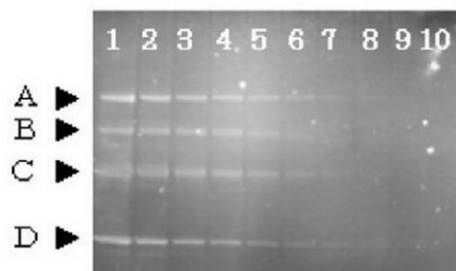


(A) Phosphorylase B、(B) Albumin、(C) Ovalbumin、(D) Carbonic anhydrase

各レーンにおけるタンパク質量 (ng)

レーン	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	335	168	83.8	41.9	20.9	10.5	5.2	2.6	1.3	0.7
B	415	208	104	51.9	25.9	13.0	6.5	3.2	1.6	0.8
C	735	368	184	91.9	45.9	23.0	11.5	5.7	2.9	1.4
D	415	208	104	51.9	25.9	13.0	6.5	3.2	1.6	0.8

【図 3】

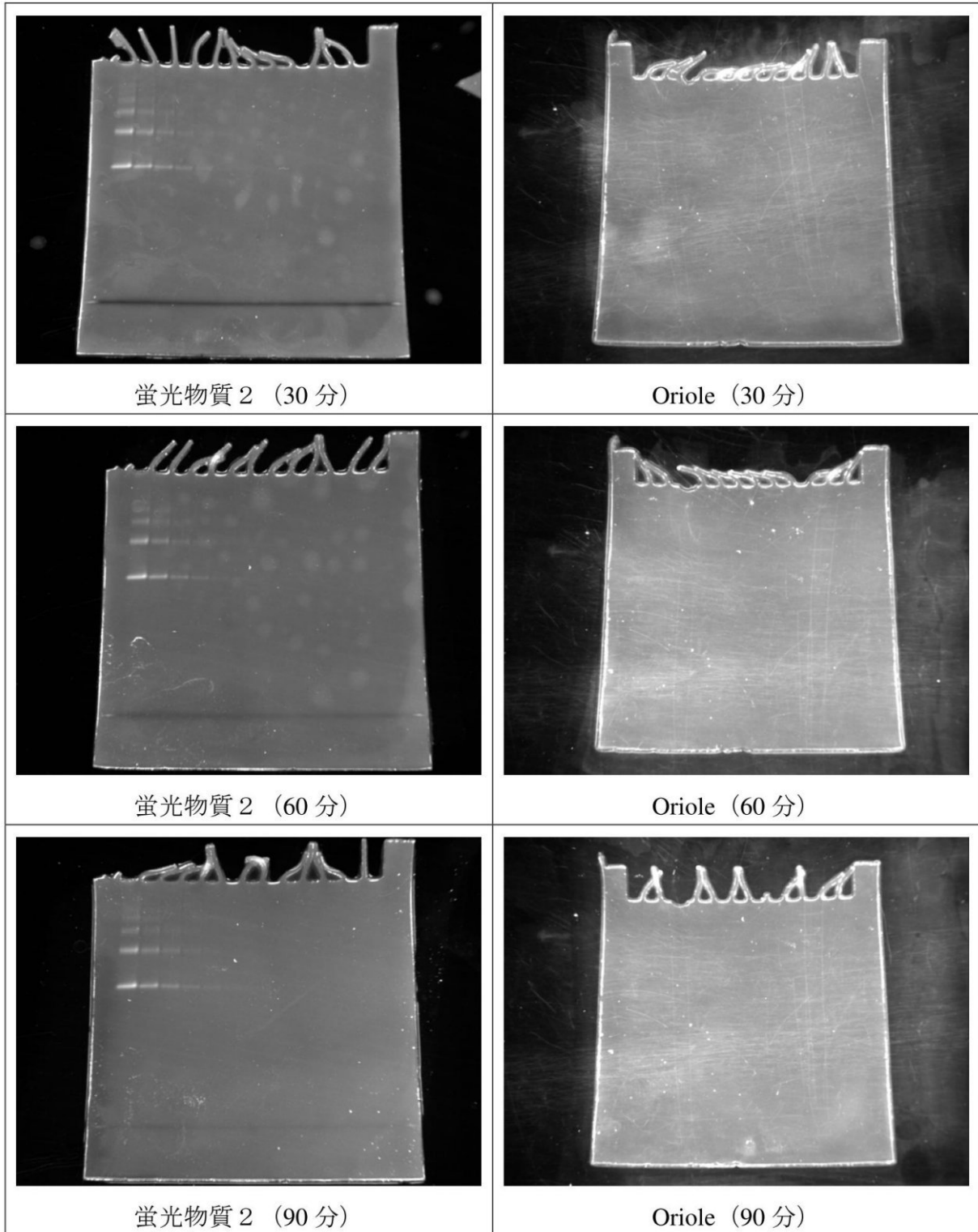


(A) Phosphorylase B、(B) Albumin、(C) Ovalbumin、(D) Carbonic anhydrase

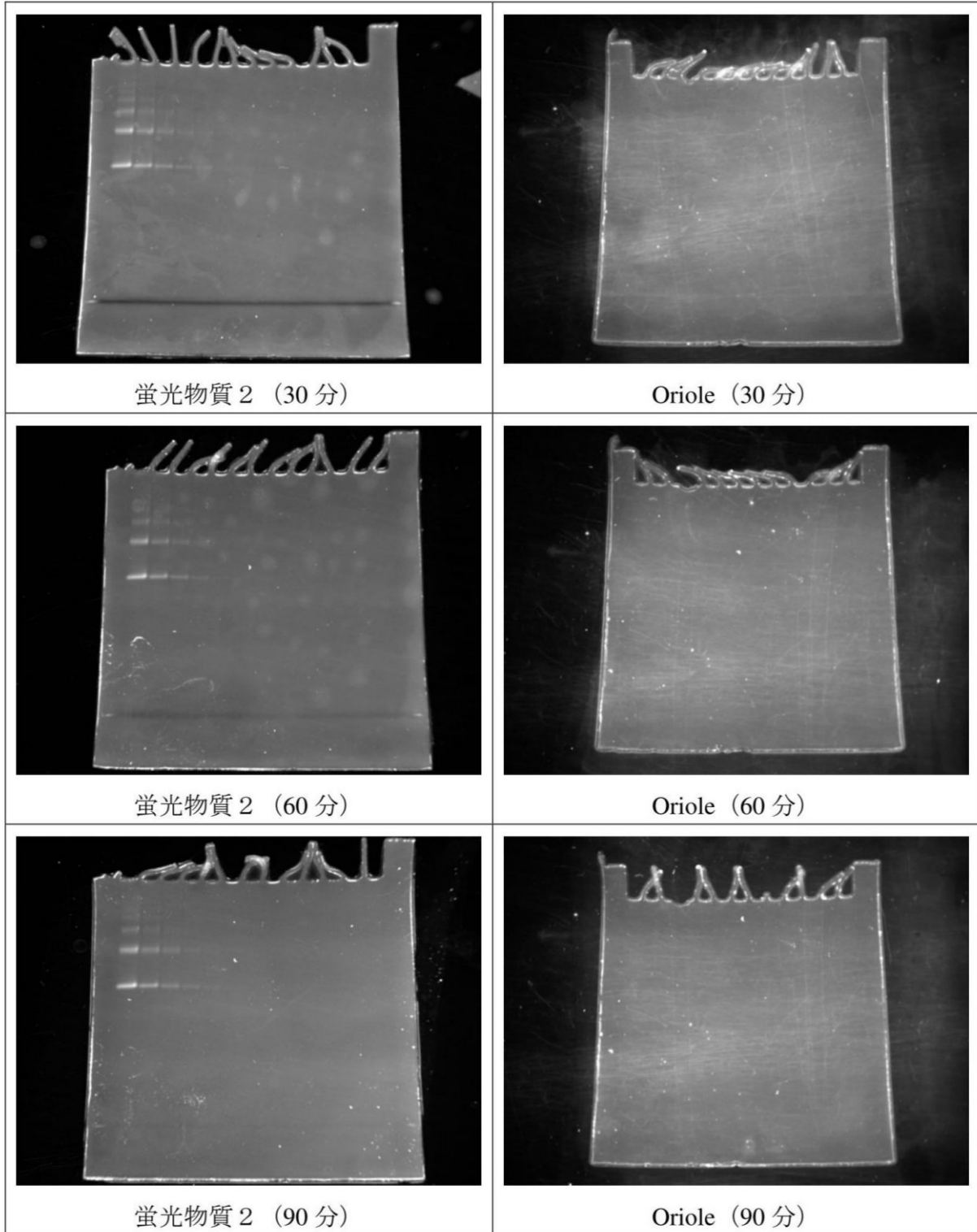
各レーンにおけるタンパク質量 (ng)

レーン	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	335	168	83.8	41.9	20.9	10.5	5.2	2.6	1.3	0.7
B	415	208	104	51.9	25.9	13.0	6.5	3.2	1.6	0.8
C	735	368	184	91.9	45.9	23.0	11.5	5.7	2.9	1.4
D	415	208	104	51.9	25.9	13.0	6.5	3.2	1.6	0.8

【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(72)発明者 千室 智之

神奈川県伊勢原市鈴川 2 1 番地 関東化学株式会社伊勢原研究所内

(72)発明者 佐野 卓磨

神奈川県伊勢原市鈴川 2 1 番地 関東化学株式会社伊勢原研究所内

Fターム(参考) 2G043 AA03 AA04 BA16 CA03 EA01 FA01 KA02 KA03

2G045 BB25 DA36 FB05 FB12 GC15