

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4822409号  
(P4822409)

(45) 発行日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(24) 登録日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(51) Int.Cl. F 1  
**GO 1 N 27/447 (2006.01)**  
 GO 1 N 27/26 3 1 5 F  
 GO 1 N 27/26 3 1 5 G

請求項の数 3 (全 13 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2005-304478 (P2005-304478)                  (22) 出願日 平成17年10月19日(2005.10.19)                  (65) 公開番号 特開2007-114009 (P2007-114009A)                  (43) 公開日 平成19年5月10日(2007.5.10)                  審査請求日 平成20年3月19日(2008.3.19)</p> <p>(出願人による申告)平成15年度、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託研究「タンパク質分離のためのプロテインシステムチップの開発」、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受ける特許出願</p>	<p>(73) 特許権者 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                  (73) 特許権者 000005049                  シャープ株式会社                  大阪府大阪市阿倍野区長池町2番2号                  (73) 特許権者 000003193                  凸版印刷株式会社                  東京都台東区台東1丁目5番1号                  (73) 特許権者 501218566                  学校法人片柳学園                  東京都八王子市片倉町1404番1号                  (74) 代理人 100091096                  弁理士 平木 祐輔</p>
--	---

最終頁に続く

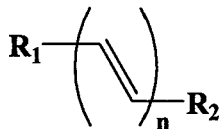
(54) 【発明の名称】 タンパク質の分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料を電気泳動用担体にセットし、式I：

【化1】



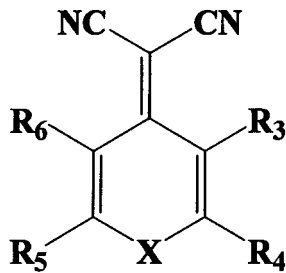
[ 式中、R<sub>1</sub> は置換されていてもよいアリール基又はヘテロアリール基であり、R<sub>2</sub> は置換されていてもよい複素環式基であり、n は 1 ~ 5 の整数である。 ]

の標識化合物を溶解させた電気泳動用緩衝液を用いて試料の電気泳動を行ない、次いで式Iの化合物とタンパク質との複合体を分光学的測定により検出することを含む、試料中のタンパク質の分析方法。

【請求項2】

R<sub>2</sub> が、式II：

## 【化2】



【式中、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、互いに独立して、水素原子、炭素数1～10のアルキル基、炭素数1～10のアルコキシ基、フェニル基（該フェニル基はアミノ基、ハロゲン及びニトロ基から選択される1つ以上の基により置換されていてもよい）、アミノ基、シアノ基、ニトロ基、カルボキシ基（若しくはその塩、エステル、アミド）、スルホン酸（若しくはその塩、エステル、アミド）、チオール基、水酸基（若しくはその塩）、炭素数1～10のアシル基、ハロゲン及び糖からなる群より選択され、Xは窒素原子、酸素原子又は硫黄原子であり、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>のいずれかは結合である。】  
 で表される基である請求項1記載の方法。

10

## 【請求項3】

R<sub>1</sub>が、置換されていてもよい、フェニル基、ナフチル基、ピリジル基又はフリル基である請求項1又は2記載の方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、電気泳動によりタンパク質を効率的に検出、定性分析又は定量分析する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

体内のタンパク質を網羅的に調べて病気の状態や原因を探るプロテオーム研究が進められており、例えば、ガンマーマーカータンパク質のように疾患の目印となるタンパク質を決定しようとする研究が進んでいる。

30

## 【0003】

また、近年ではDNAチップ技術の向上によりRNAの発現を網羅的に解析するトランスクリプトーム解析も盛んに行われている。しかしながら、このRNA発現プロファイルとタンパク質の発現プロファイルとは必ずしも一致するわけではなく、その相関は50%以下であると言われている。そのためには、RNAの網羅的解析に加えて、タンパク質の網羅的解析が重要であり、最近では著しく発達している二次元電気泳動法や質量分析さらにはプロテインチップのようなゲノム解析に匹敵するハイスループット分析を駆使して、タンパク質の機能を明らかにする試みがなされている。

## 【0004】

このように、タンパク質の研究の発展とともに、より効率的にタンパク質を分析する方法が求められており、多種多様なタンパク質を簡便かつ迅速に分析する技術の確立が重要となっている。

40

## 【0005】

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。プロテオーム研究において電気泳動法は、例えば、正常組織及び疾患組織に含まれるタンパク質成分を互いに比較するために用いられたり（ディファレンシャルディスプレイ）、タンパク質同定に用いるタンパク質を調製するために用いられたりしている。

## 【0006】

電気泳動法では検出のためにタンパク質を染色（標識）する必要があるが、染色方法と

50

しては大きく分けて2つに分類される。

【0007】

1つは電気泳動を行う前にタンパク質を標識する前染色法であり、もう1つは電気泳動を行った後に標識する後染色法である。前者に使用される方法として、Ettan DIGE法、後者に使用される方法としてBio-Safe CBB染色法、及びSypro Ruby染色法が挙げられる。それぞれの方法の特徴を以下の表に示す。

【0008】

【表1】

染色方法	タンパク質との結合様式	前染色 or 後染色	操作工程 (所要時間;分)	全操作 時間 (分)	検出 方法	欠点
Ettan DIGE	共有結合	前染色	反応(30)→ 停止(10)	40+ $\alpha$	蛍光	電気泳動後、質量分析計を用いた解析を行うことができない。
Bio-Safe CBB	非共有結合(SDSを介さない結合)	後染色	固定(30)→ 染色(60)→ 洗浄(30)	120+ $\alpha$	可視	検出感度が悪い。
Sypro Ruby	非共有結合(SDSを介さない結合)	後染色	固定(30)→ 染色(180)→ 洗浄(30)	240+ $\alpha$	蛍光	検出感度は良好であるが、染色・洗浄過程に長時間(場合によっては半日~1日)かかる。

10

【0009】

Ettan DIGE法では、電気泳動を行う前に試料中のタンパク質は共有結合により蛍光試薬で予め標識される。この方法は全操作時間が短く、汎用性も高いが、1つのタンパク質分子に複数の蛍光試薬が結合し、しかもタンパク質ごとに蛍光試薬の結合数が異なるため、プロテオーム解析において、電気泳動により分離されたタンパク質の質量分析ができない。

【0010】

後染色法であるBio-Safe CBB法及びSypro Ruby法の場合、電気泳動終了後に、

- a. タンパク質のゲルへの固定化とSDSの除去
- b. 蛍光試薬によるタンパク質の染色
- c. 余分な蛍光試薬の洗浄
- d. 検出

30

といった一連の複雑な工程を経なければならない。特に、aとcの操作を省いたり、あるいは操作時間を短くしたりすると、タンパク質が蛍光試薬によって十分に染色されなかったり、バックグラウンドの蛍光が高くなってしまったりするために、タンパク質のスポットを検出することが困難になるという問題が生じる。

【0011】

本発明者らは、タンパク質と錯体を形成してその蛍光や発光が変化することにより、タンパク質を迅速且つ簡便に分析できる試薬を報告している(特願2005-167613号)。

40

【0012】

【特許文献1】特願2005-167613

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、タンパク質の分析に用いられる電気泳動法に関連する問題点、即ち：

- ・操作工程数が多く、また時間がかかる
- ・検出感度が悪い
- ・分離後のタンパク質を質量分析することができない

などの問題を解決し、多種多様なタンパク質を迅速、簡便に且つ高感度で分析することを

50

可能とする、電気泳動法を用いるタンパク質の分析方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、試料を電気泳動用ゲルにセットし、特定の標識化合物を溶解させた電気泳動用緩衝液を用いて試料の電気泳動を行ない、次いで標識化合物とタンパク質との複合体を分光学的測定により検出することにより、タンパク質を迅速、簡便に且つ高感度で分析することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0015】

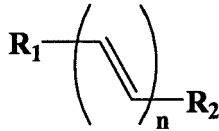
即ち、本発明は以下の発明を包含する。

10

【0016】

(1) 試料を電気泳動用担体にセットし、式 I :

【化 1】



[式中、 $R_1$  は置換されていてもよいアリール基又はヘテロアリール基であり、 $R_2$  は置換されていてもよい複素環式基であり、 $n$  は 1 ~ 5 の整数である。]

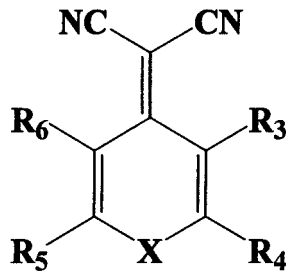
20

の標識化合物を溶解させた電気泳動用緩衝液を用いて試料の電気泳動を行ない、次いで式 I の化合物とタンパク質との複合体を分光学的測定により検出することを含む、試料中のタンパク質の分析方法。

【0017】

(2)  $R_2$  が、式 II :

【化 2】



30

[式中、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$  及び  $R_6$  は、互いに独立して、水素原子、炭素数 1 ~ 10 のアルキル基、炭素数 1 ~ 10 のアルコキシ基、フェニル基 (該フェニル基はアミノ基、ハロゲン及びニトロ基から選択される 1 つ以上の基により置換されていてもよい)、アミノ基、シアノ基、ニトロ基、カルボキシル基 (若しくはその塩、エステル、アミド)、スルホン酸 (若しくはその塩、エステル、アミド)、チオール基、水酸基 (若しくはその塩)、炭素数 1 ~ 10 のアシル基、ハロゲン及び糖からなる群より選択され、 $X$  は窒素原子、酸素原子又は硫黄原子であり、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$  及び  $R_6$  のいずれかは結合である。]

40

で表される基である前記 (1) 記載の方法。

【0018】

(3)  $R_1$  が、置換されていてもよい、フェニル基、ナフチル基、ピリジル基又はフリル基である前記 (1) 又は (2) 記載の方法。

【発明の効果】

【0019】

従来の電気泳動法によるタンパク質の分析方法では、感度・精度が低かったり、操作が煩雑であったり、時間がかかる等の欠点があったが、本発明の方法は以下の特徴、

50

- ・ 標識試薬とタンパク質とは非共有結合による複合体であるので、電気泳動により分離されたタンパク質をさらに質量分析により解析することが可能となる；
- ・ 工程及び操作が簡略化されるとともに、時間を大幅に短縮化（特に染色及び洗浄時間）することができる；
- ・ 検出感度が良い；

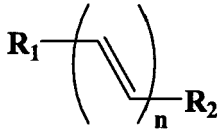
を有し、試料中のタンパク質を電気泳動法を用いて短時間で正確に且つ簡便に検出、定性分析及び定量分析することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本発明は、試料を電気泳動用ゲルにセットし、式 I :

【化 3】



[ 式中、R<sub>1</sub> は置換されていてもよいアリール基又はヘテロアリール基であり、R<sub>2</sub> は置換されていてもよい複素環式基であり、n は 1 ~ 5 の整数である。 ]

の標識化合物を溶解させた電気泳動用緩衝液を用いて試料の電気泳動を行ない、次いで式 I の化合物とタンパク質との複合体を分光学的測定により検出することを含む、タンパク質の分析方法である。なお、本発明において言う「タンパク質」とは、アミノ酸残基が数十残基程度である「ペプチド」も含む概念である。

【0021】

本発明の方法では、先の出願（特願 2005-167613 号）に記載されているタンパク質分析用標識試薬を用いて電気泳動を行うことにより、タンパク質の染色（標識）と分離とが同時に行われる。そのため、ゲル電気泳動を行うための緩衝液中に予め標識試薬を混ぜておく。電気泳動が開始されると、標識試薬は電気浸透流に乗ってゲル中に染み込み、ゲルにセットされた試料中に存在するタンパク質と複合体（CT錯体）を形成する。複合体を形成することにより標識試薬の蛍光や発光等が変化するので、これを分光学的手段（目視による確認も含む）を用いて測定することにより、タンパク質を分析する。

【0022】

本発明で用いられる電気泳動用担体としては、電気泳動の担体として通常使用されるものであれば特に制限されるものではなく、例えば、膜（セルロースアセテート膜、ニトロセルロース膜又はポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜等）及びゲル（ポリアクリルアミドゲル又はアガロースゲル等）等が挙げられる。本発明においては、担体としてゲルを用いることが好ましく、とりわけ SDS - ポリアクリルアミドゲルを用いることが特に好ましい。

【0023】

式 I で表される化合物は分析試料中に含まれるタンパク質を標識（染色）するためのものであり、タンパク質と複合体を形成することによりその蛍光、発光、発色、吸収波長（紫外部、可視部、赤外部の吸収等）等が変化し又は生じ、それを分光学的手段（目視による確認も含む）により検知することが可能な化合物がこのましい。

【0024】

式 I において、R<sub>1</sub> は置換されていてもよいアリール基又はヘテロアリール基であり、R<sub>2</sub> は置換されていてもよい複素環式基であり、n は 1 ~ 5 の整数である。

【0025】

アリール基としては、例えば、フェニル、2 ~ 4 個のベンゼン環が縮合した多環芳香族基（例えば、ナフチル、アントリル、ピレニル）等が挙げられる。また、ヘテロアリール基とは、N、O 及び S からなる群より選択される少なくとも 1 個のヘテロ原子をその環原

10

20

30

40

50

子として含有するアリール基をいう。これらのアリール基又はヘテロアリール基はさらに別の芳香環又は複素芳香環と縮合したものであってもよい。アリール基及びヘテロアリール基の具体例としては、例えば、ピリジル基、フリル基、ダンシル基、クマリン、ベンゾチアゾール、フルオレセイン、ローダミン、アゾベンゼン等が挙げられる。

【0026】

前記アリール基又はヘテロアリール基は、炭素数1～10（好ましくは炭素数1～6）のアルキル基、炭素数1～10（好ましくは炭素数1～6）のアルコキシ基、フェニル基（該フェニル基はアミノ基、ハロゲン及びニトロ基から選択される1つ以上の基により置換されていてもよい）、アミノ基、シアノ基、ニトロ基、カルボキシル基（若しくはその塩、エステル、アミド）、スルホン酸（若しくはその塩、エステル、アミド）、チオール基、水酸基（若しくはその塩）、炭素数1～10（好ましくは炭素数1～6）のアシル基、ハロゲン及び糖からなる群より選択される1つ以上の基により置換されていてもよい。前記アリール基又はヘテロアリール基は、水溶性及び電子供与性の付与のために水酸基で置換されていることが好ましい。

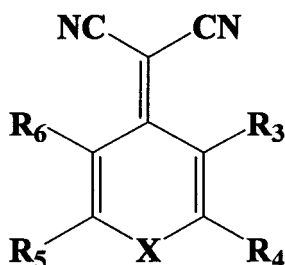
10

【0027】

複素環式基としては、蛍光基又は発色基（紫外部、可視部、赤外部の吸収、蛍光の測定が可能なもの）であって、少なくとも1つのヘテロ原子を環原子として有し、式Iのオレフィン部分-(CH=CH)<sub>n</sub>-と共役系を形成するものが好ましく、そのようなものとしては、例えば、クマリン、ベンゾチアゾール、フルオレセイン、ローダミン等が挙げられる。本発明では、式I I :

20

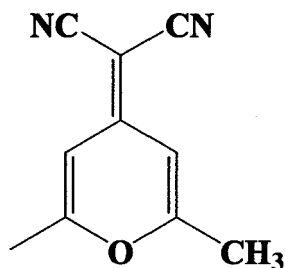
【化4】



30

[式中、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は、互いに独立して、水素原子、炭素数1～10のアルキル基、炭素数1～10のアルコキシ基、フェニル基（該フェニル基はアミノ基、ハロゲン及びニトロ基から選択される1つ以上の基により置換されていてもよい）、アミノ基、シアノ基、ニトロ基、カルボキシル基（若しくはその塩、エステル、アミド）、スルホン酸（若しくはその塩、エステル、アミド）、チオール基、水酸基（若しくはその塩）、炭素数1～10のアシル基、ハロゲン及び糖からなる群より選択され、Xは窒素原子、酸素原子又は硫黄原子であり、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>のいずれかは結合である。]で表される基が好ましく、さらには、下記式：

【化5】



40

で表される基が好ましい。

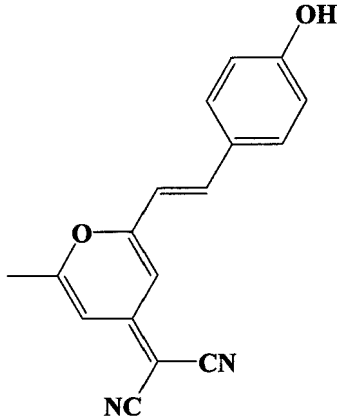
【0028】

50

蛍光基又は発色基である R<sub>2</sub> に、アルケニル基及び芳香族基を接続することにより共役系が伸長し、蛍光・発色波長の長波長化が促される。

【0029】

式 I の化合物は公知の方法により容易に合成することができる。例えば、下記式：  
【化6】



10

の化合物は、4-ヒドロキシベンズアルデヒドと4-(ジシアノメチレン)-2,6-ジメチル-4H-ピランとをエタノール中、塩基（例えばピペリジン等のアミン）の存在下で反応させることにより製造することができる。

20

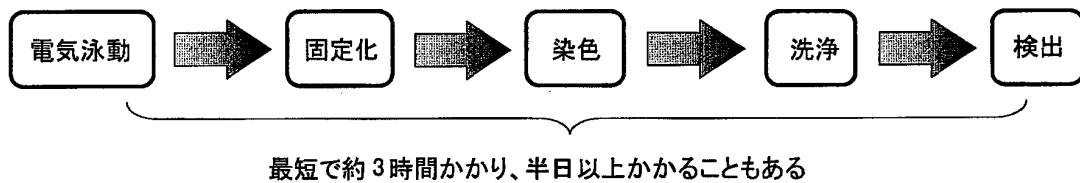
【0030】

次に、本発明の方法の手順について説明する。本発明の方法は、従来の方法と比較して電気泳動法を用いる点では同じだが、標識に用いる化合物及び工程が簡略化されている点で異なる。本発明と従来法との比較を以下のスキームに示す。

【0031】

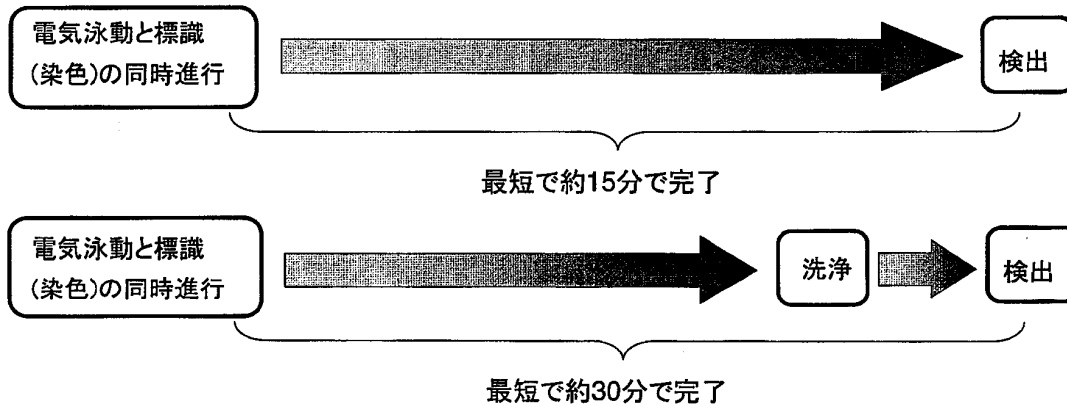
【表2】

従来の方法



30

本発明



40

【0032】

50

即ち、従来の方法では、電気泳動終了後にタンパク質を検出するまでに、電気泳動 - タンパク質の固定化 - 染色 - 洗浄 - 検出、という一連の工程が必要であったが、本発明の方法では式 I の化合物を標識試薬として用いることにより、電気泳動を行いながらタンパク質を染色 - 検出、という短い工程で行うことができ、分析に要する時間を大幅に短縮することができる。

【 0 0 3 3 】

本発明の方法では、まず、タンパク質が含まれている試料を電気泳動担体にアプライする。電気泳動用緩衝液としては通常用いられるものでよいが、本発明ではこれに式 I の化合物を溶解させたものを用いる。そして、通常の方法と同様にして電気泳動を行って試料中のタンパク質を分画する。

10

【 0 0 3 4 】

電気泳動を行っている間に、式 I の化合物を含む緩衝液は電気浸透流により移動しながら、それと同時に疎水性相互作用及び電荷移動相互作用により試料中のタンパク質と複合体（電荷移動錯体）を形成する（即ち、タンパク質が標識される）。複合体を形成することにより、式 I の化合物に固有の吸収波長や吸収強度又は蛍光波長や蛍光強度等に変化が生じる。この変化は色調の変化として目視で観察できる場合もある。

【 0 0 3 5 】

電気泳動終了後、担体（ゲル）を取り出す。担体は所望により洗浄液で洗浄してもよい。取り出した担体は、蛍光、発光、発色、吸収波長（紫外部、可視部、赤外部の吸収等）等を検知できる分光学的手段（例えば、蛍光光度計・吸光光度計。また目視による確認も含む）により観察する。蛍光を生じる試薬を用いた場合には蛍光検出器で、可視部に吸収波長を生じる試薬を用いた場合には目視で観察することにより容易にタンパク質のスポットを検出することができる。このようにして、試料中のタンパク質を検出又は定性分析することができる。また、蛍光、発光又は発色等の強度を測定することにより定量分析することも可能である。

20

【 0 0 3 6 】

本発明の方法は、1次元電気泳動だけでなく2次元電気泳動にも応用することができる。

【実施例】

【 0 0 3 7 】

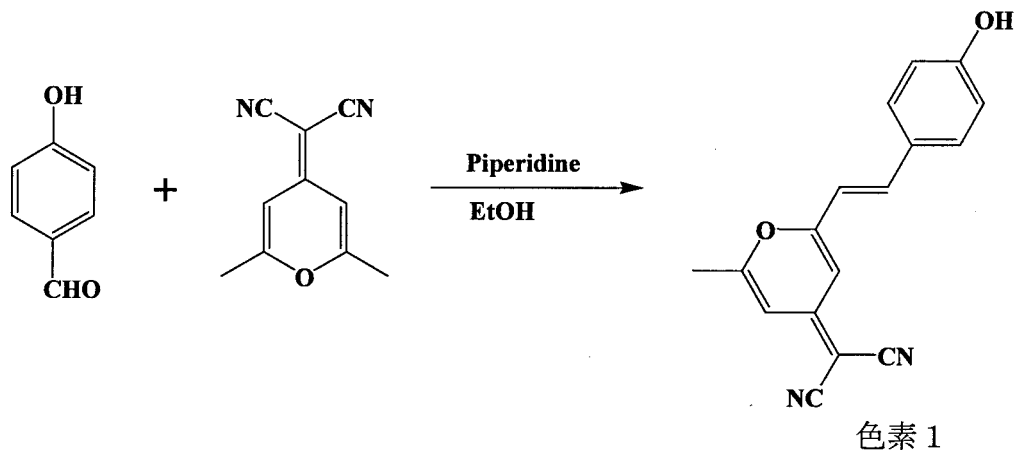
以下に、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

30

【 0 0 3 8 】

実施例 1：色素 1 の合成

【化 7】



40

【 0 0 3 9 】

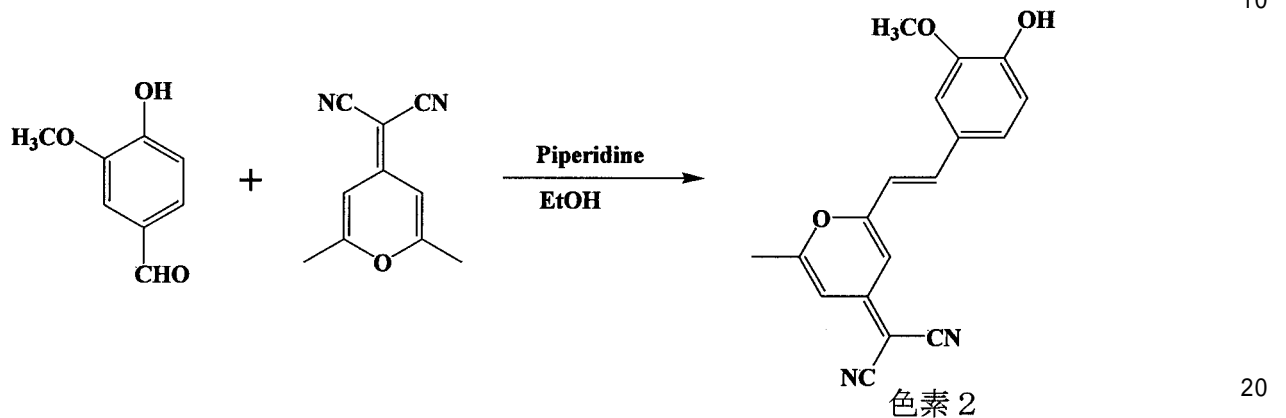
50

50ml三口フラスコに、4-ヒドロキシベンズアルデヒド0.70g(5.81mmol)、4-(ジシアノメチレン)-2,6-ジメチル-4H-ピラン1.0g(5.81mmol)、ピペリジン0.50g(5.81mmol)、エタノール50mlを加え、Ar気流下、12時間加熱還流した。溶媒を減圧留去した後、カラムクロマトグラフィー( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{MeOH}$  = 10 : 1 v/v)で精製し、目的化合物を得た。収率 30%。

【0040】

実施例2：色素2の合成

【化8】



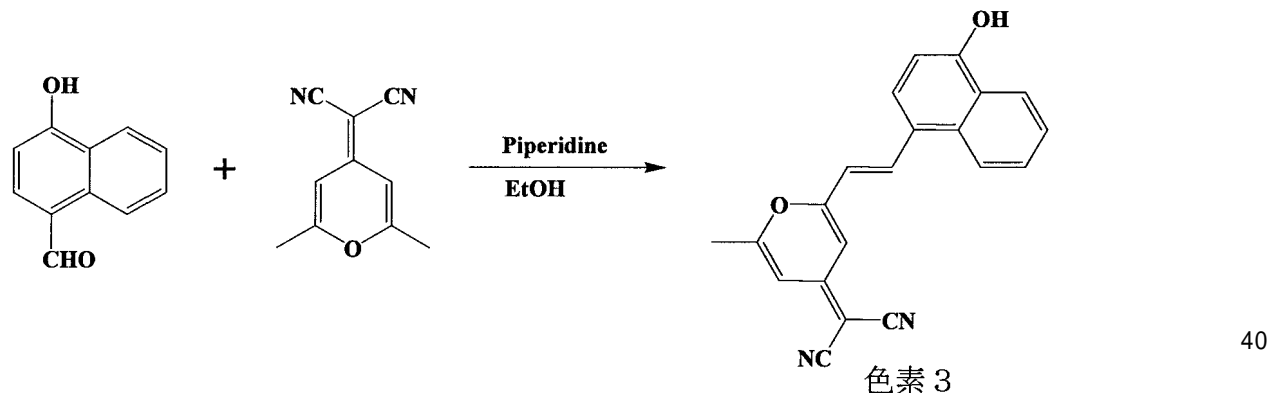
【0041】

50ml三口フラスコに、バニリン0.70g(5.81mmol)、4-(ジシアノメチレン)-2,6-ジメチル-4H-ピラン1.0g(5.81mmol)、ピペリジン0.50g(5.81mmol)、エタノール50mlを加え、Ar気流下、12時間加熱還流した。溶媒を減圧留去した後、カラムクロマトグラフィー( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{MeOH}$  = 10 : 1 v/v)で精製し、目的化合物を得た。収率 20%。

【0042】

実施例3：色素3の合成

【化9】



【0043】

50ml三口フラスコに、4-ヒドロキシ-1-ナフトアルデヒド0.70g(5.81mmol)、4-(ジシアノメチレン)-2,6-ジメチル-4H-ピラン1.0g(5.81mmol)、ピペリジン0.50g(5.81mmol)、エタノール50mlを加え、Ar気流下、12時間加熱還流した。溶媒を減圧留去した後、カラムクロマトグラフィー( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{MeOH}$  = 10 : 1 v/v)で精製し、目的化合物を得た。収率 25%。

## 【 0 0 4 4 】

## 実施例 4 : 1 次元電気泳動によるタンパク質の分析

標識試薬として実施例 3 で調製した色素 3 を用いた。電気泳動は担体として SDS- ポリアクリルアミドゲルを用いる 1 次元電気泳動であり、その測定条件は以下のとおりである。

< 電気泳動装置 >

Sure Blot F1 Gel system : アステラス製薬株式会社製

< 電気泳動用緩衝液 >

色素 3 のストック溶液 ( 500mg/mL 濃度の DMSO 溶液 ) を Sure Blot F1 Gel system 付属の電気泳動緩衝液で希釈し、0.5mg/mL、0.1mg/mL、0.05mg/mL とした溶液を用いた

< 試料中のタンパク質濃度 >

[BSA] = 0.08 ~ 20  $\mu$ g/well 及び [Sheep IgG] = 0.21 ~ 50  $\mu$ g/well

< 洗浄液の組成 >

AcOH : MeOH : H<sub>2</sub>O = 3 : 10 : 87v/v

< 蛍光検出装置 >

ProXpress imaging system (Perkin-Elmer 社製) 及び LS400 scanner (Tecan 社製)

## 【 0 0 4 5 】

上部バッファー ( 陰極側 ) に電気泳動緩衝液 ( 色素 3 の濃度 0.5mg/mL ) を加え、試料 ( BSA 及び IgG ) をアプライした SDS-PAGE をセットして電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを取り出して蛍光検出器を用いて観察した ( 図 1 A ) 。その後、洗浄液を用いてゲルの洗浄を 30 分間行い、蛍光検出器を用いてタンパク質のスポットを観察した ( 図 1 B ) 。

## 【 0 0 4 6 】

また、色素 3 の濃度を 0.1mg/mL とした電気泳動緩衝液を用いて同様にして電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを取り出して蛍光検出器を用いて観察した ( 図 2 A ) 。その後、洗浄液を用いてゲルの洗浄を 30 分間行い、蛍光検出器を用いてタンパク質のスポットを観察した ( 図 2 B ) 。

## 【 0 0 4 7 】

いずれの場合においてもタンパク質のスポットが明瞭に確認され、タンパク質が電気泳動中に標識試薬と複合体を形成して、蛍光を発するように変化したことがわかる。また、図 1 B 及び図 2 B に示されるように、ゲルを洗浄することによりバックグラウンドが低減して、より明瞭にタンパク質のスポットを検出することができた。さらに、図 2 A 及び図 2 B に示されるように、電気泳動緩衝液中の標識試薬の濃度を 0.1mg/mL にすることによってもタンパク質のスポットを明瞭に観察することができた。

## 【 0 0 4 8 】

## 実施例 5 : 2 次元電気泳動によるタンパク質の分析

標識試薬として実施例 3 で調製した色素 3 を用いた。2 次元目の電気泳動に SDS- ポリアクリルアミドゲル担体を用いた。測定条件は以下のとおりである。

< 電気泳動装置 >

1 次元目 : 等電点電気泳動 (Isoelectric focusing); ZOOM IPG runner system (Invitrogen 社製)

2 次元目 : SDS-PAGE Sure Blot F1 Gel system (アステラス製薬株式会社製)

< 電気泳動用緩衝液 >

色素 3 のストック溶液 ( 500mg/mL 濃度の DMSO 溶液 ) を Sure Blot F1 Gel system 付属の電気泳動緩衝液で希釈し、0.5mg/mL、0.1mg/mL、0.05mg/mL とした溶液を用いた

< 試料中のタンパク質濃度 >

[Mouse Brain Lysate] = 40  $\mu$ g/strip

< 洗浄液の組成 >

AcOH : MeOH : H<sub>2</sub>O = 3 : 10 : 87v/v

< 蛍光検出装置 >

ProXpress imaging system (Perkin-Elmer 社製) 及び LS400 scanner (Tecan 社製)

## 【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

50

試料を等電点電気泳動(Isoelectric focusing)にかけて1次元目の電気泳動を行った。次いで、上部バッファー(陰極側)に電気泳動緩衝液(色素3の濃度0.5mg/mL)を加え、試料をアプライしたSDS-PAGEをセットして2次元目の電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを取り出して蛍光検出器を用いて観察した(図3A)。その後、洗浄液を用いてゲルの洗浄を30分間行い、蛍光検出器を用いてタンパク質のスポットを観察した(図3B)。いずれの場合においてもタンパク質のスポットが明瞭に確認され、タンパク質が電気泳動中に標識試薬と複合体を形成して、蛍光を発するように変化したことがわかる。また、図3Bに示されるように、ゲルを洗浄することによりバックグラウンドが低減して、より明瞭にタンパク質のスポットを検出することができた。

【産業上の利用可能性】

10

【0050】

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のハイスループット解析が可能となり、本発明の方法は、例えば、生化学、医療、分析化学、プロテオーム研究等の分野において、高感度、網羅的かつ簡便なタンパク質の分析に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】実施例4による電気泳動後の蛍光観察図である(標識試薬濃度0.5mg/mL; A: 洗浄前、B: 洗浄後; 励起波長 480nm; 検出波長530nm)

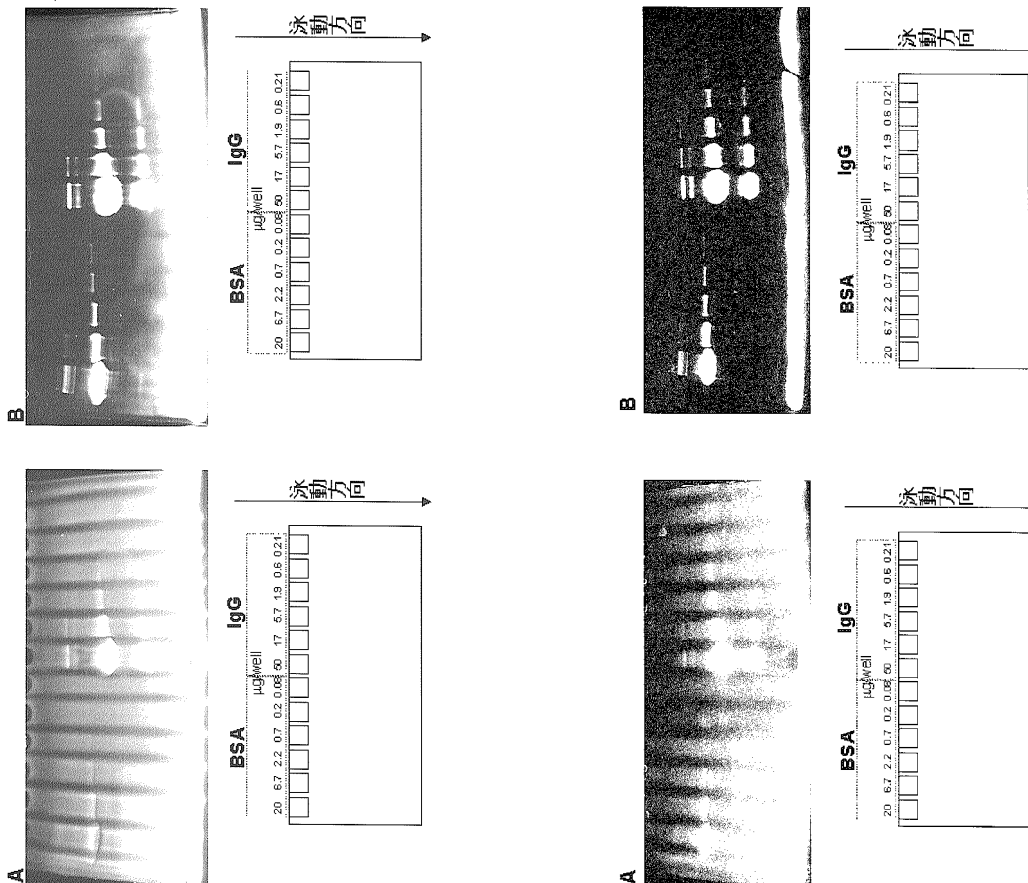
【図2】実施例4による電気泳動後の蛍光観察図である(標識試薬濃度0.1mg/mL; A: 洗浄前、B: 洗浄後; 励起波長 480nm; 検出波長530nm)

20

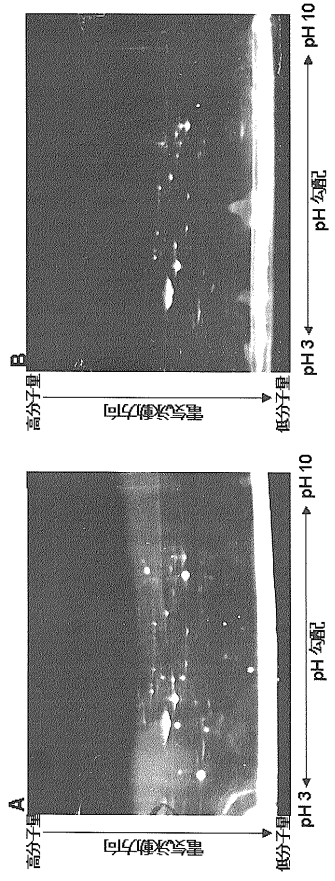
【図3】実施例5による2次元電気泳動後の蛍光観察図である(標識試薬濃度0.1mg/mL; A: 洗浄前、B: 洗浄後; 励起波長 480nm; 検出波長530nm)

【図1】

【図2】



【 図 3 】



## フロントページの続き

- (74)代理人 100096183  
弁理士 石井 貞次
- (74)代理人 100118773  
弁理士 藤田 節
- (72)発明者 鈴木 祥夫  
茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内
- (72)発明者 横山 憲二  
茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内
- (72)発明者 生田目 一寿  
東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号 アステラス製薬株式会社内

審査官 河野 隆一郎

- (56)参考文献 特開2004-317297(JP,A)  
特表昭62-502548(JP,A)  
特開平11-335661(JP,A)  
国際公開第2006/062222(WO,A1)  
特表平10-504108(JP,A)  
米国特許第4886774(US,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 27/447  
JSTPlus(JDreamII)  
JST7580(JDreamII)  
CAplus(STN)