

# CyDye DIGE Fluor minimal dyes for specific labelling of cell surface proteins

## CyDye DIGE Fluor minimal dyesによる細胞表面タンパク質の特異的標識

Rita Marouga, Stephanie Bourin, Masoud Rafiyan Nejad, Åsa Hagner-McWhirter  
GE Healthcare, Discovery Systems, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden

### はじめに

細胞表面タンパク質は、タンパク質-タンパク質相互作用(シグナル伝達、環境適応、薬剤処理への応答など)の多くに関連していますが、疎水性であることや、発現量自体が少ないこと、高分子量であるという性質から、2Dゲル上ではしばしば検出が困難といわれてきました。

最新の研究により、われわれは無傷の生細胞の細胞表面タンパク質を選択的に標識する簡便で迅速な方法を開発しました。CyDye DIGE Fluor minimal dyesによるミニマルラベリング法(最小標識法)と二次元ディファレンスゲル電気泳動システム(Ettan DIGE)を用いたアプローチにより、チャイニーズハムスター卵巣由来の細胞株(CHO-K1)の細胞表面タンパク質を視覚化し、検出することができました。図1は、細胞表面標識プロトコールと標準的なEttan DIGEシステムのプロトコールの比較を示しています。

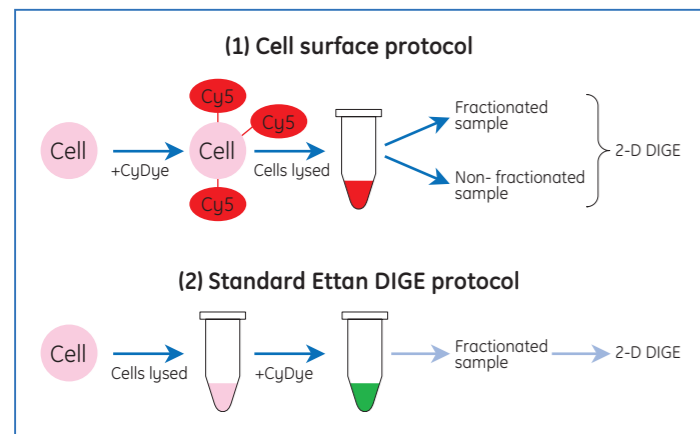


図1. 細胞表面標識(1)と標準的な2D DIGE(2)の実験ワークフロー概要

### 方法

付着性のCHO-K1細胞は非酵素的に分離、洗浄後、CyDye DIGE Fluor minimal dyesで標識しました。600 pmol CyDyeを添加した総量200 µlのバッファー(HBSS pH 8.5, 1M urea)中で約8×10<sup>6</sup> Cellsの無傷細胞を氷上にて20分間インキュベートしました。標識された無傷細胞は、そのまま溶解したもの、あるいは溶解後分画したもの(membrane fractionation kitを使用)二次元電気泳動に使用しました。細胞膜画分と細胞質画分および非分画サンプルのスポットマップはTyphoon 9410パリアブルイメージアナライザーを用いて画像化し、DeCyder 2D Differential Analysis Software v 6.0にて比較解析しました。また、血清飢餓処理を行ったCHO-K1細胞の血清を用いた2D DIGE実験も行いました。培地を無血清培地に交換し、異なるタイムポイントで細胞表面タンパク質をCy3またはCy5で標識しました。すべてのゲルにCy2標識した細胞表面タンパク質の内部標準を添加しました。

### 結果

細胞質画分では標識タンパク質が検出されていないことから、細胞表面が特異的に標識されていることがわかります。DeCyder 2D Softwareによる解析の結果、非分画サンプルと分画サンプルの間でスポットマップに特に大きな差異は認められませんでした(図2)。標準的な2D DIGEの手順で標識した細胞溶解液と比較して、細胞表面標識画分では10倍以上(のシグナル強度)の比で80以上の新規スポットが検出されました(図3)。3T3線維芽細胞とEL4リンパ芽球でも同様の結果が得られました。Cy5、Cy3、Cy2による細胞表面タンパク質の標識効率に差異は認められませんでした。DeCyder 2D Softwareを用いて血清飢餓による多くの細胞表面タンパク質の発現の変化を解析しました(図4)。

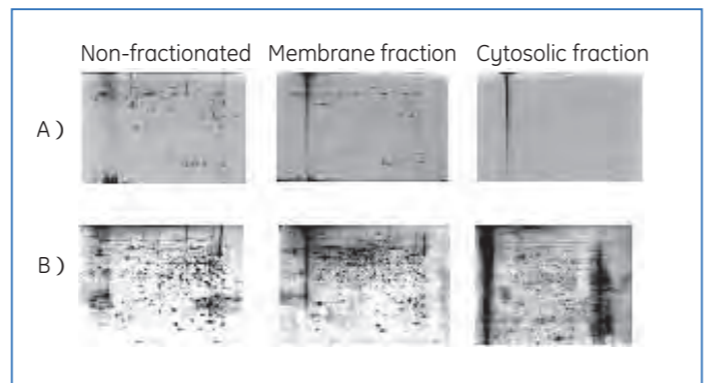


図2. 細胞表面標識の特異性  
CHO-K1細胞は、まずCy3で細胞表面タンパク質を標識し、分画しました。二次元電気泳動により異なる画分を分離しCy3蛍光を検出しました(A)。蛍光検出後、同一ゲルを銀染色しました(B)。

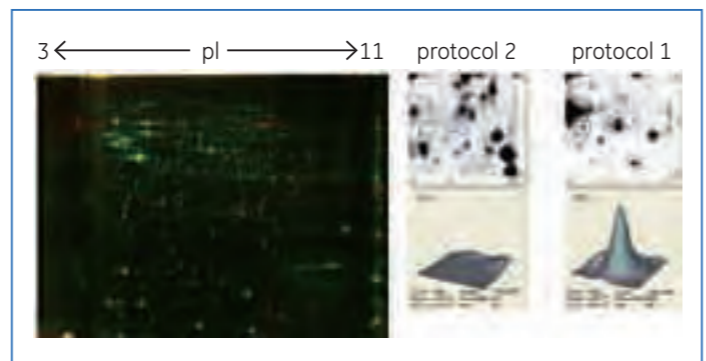


図3. Cy5標識したCHO-K1細胞表面標識サンプル(赤スポット、プロトコール1、図1(1)参照)と、標準的なEttan DIGEシステムプロトコールによりCy3標識した細胞膜画分サンプル(緑スポット、プロトコール2、図1(2)参照)を同一の二次元電気泳動ゲルにより分離  
右側の図は二次元電気泳動ゲルのDeCyder 2D Softwareの解析画面で、標準的なEttan DIGEシステムプロトコールで標識したサンプルからは検出されなかった細胞表面標識タンパク質を示しています。

### まとめ

- 迅速かつシンプルな細胞表面タンパク質特異的な標識方法
- 標準的なEttan DIGEシステムプロトコールでは不可能だった新規な細胞表面タンパク質を検出
- 3種類のCyDye DIGE Fluor minimal dyesを用いた多重検出が可能
- 標準的な2D DIGE手順と同様、正確な統計解析が可能

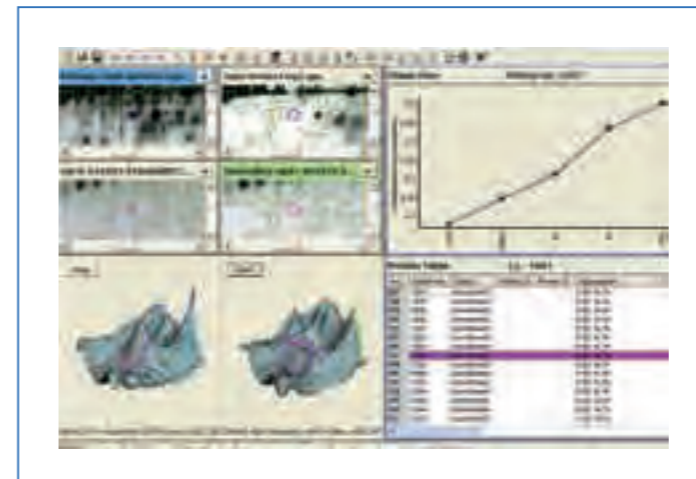


図4. DeCyder 2D Differential Analysis software v 6.0.を用いて飢餓状態のCHO-K1細胞における細胞表面タンパク質の経時的な発現変化を検出