

Simple Westernでマルチプレックス

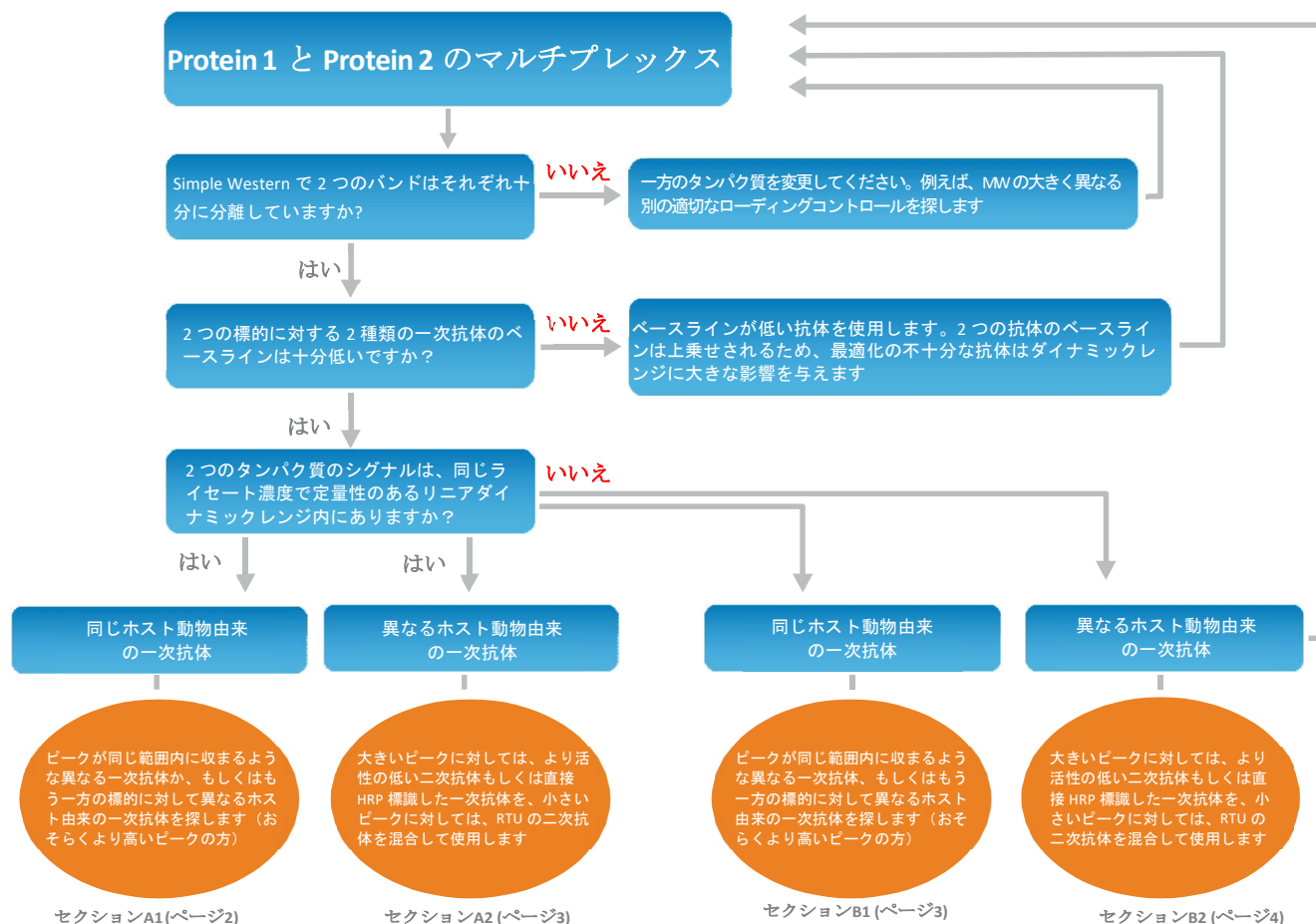
イントロダクション

Simple Westernは、約1時間の手作業の後に専用プレートとキャピラリーを機器にセットすると、わずか3時間で高品質のサイズベース(分子量)のデータが得られます。さらにマルチプレックスも可能で、1つのキャピラリーで2つの標的を同時測定すると、サンプル当たりのデータポイント数が2倍になります。すなわち貴重なサンプルからより多くの情報を得られるだけでなく時間の節約にもなります。例えば標的と、ローディングコントロールあるいはシステムコントロールを同時に測定(マルチプレックス)してシグナルを標準化することで、より正確な定量データが得られます。



この「how to」ガイドでは、簡単なセットアップでSimple Westernのマルチプレックスアッセイ²を行う方法を説明し、高発現と低発現のタンパク質を同時測定する方法についていくつかの注意点とコツを紹介します。

ワークフロー概要



Simple Westernでマルチプレックスアッセイを行う際に考慮すべきこと

分子量(MW)

マルチプレックスに用いるタンパク質の分子量が十分に離れていて、同じところに泳動しないことを確認してください。両方のタンパク質を別々に分析し、Compass for Simple Westernで結果を重ね合わせることで簡単に確認することができます。

一次抗体
ベースラインによる影響

Simple Westernアッセイを行う複数タンパク質のマルチプレックスでは、必要な一次抗体を混合します。他のイムノアッセイと同様、一次抗体を混合すると、ベースラインの増加は少なくとも加算的で、通常はそれ以上に増加します。そのためマルチプレックスの際は優れた抗体を選択することがより重要になります。

一次抗体の混合方法

マルチプレックスの準備が整ったら、通常使用する量と濃度で一次抗体を混合し、抗原抗体の結合がすべて飽和状態になるようにします。表1は、同じキャピラリーで2つのタンパク質をマルチプレックスする場合、どのように一次抗体を混合するかの例を示しています。このようにサンプル3~5 µL 当り2つのデータポイントが得られます。

シグナル強度

同一のキャピラリーで2つの異なるタンパク質のシグナルを検出するには、同じライセート濃度から両方のタンパク質を検出する必要があります。理想的には、この時タンパク質のシグナルはほぼ同じリニアダイナミックレンジ内にあります。マルチプレックスアッセイに進む前に、検出するタンパク質が同じ濃度で定量性のあるリニアダイナミックレンジ内にあることを確認するために、初めに

滴定実験を行うことをお勧めします。発現レベルの大きく異なるタンパク質のマルチプレックスは、セクションB1およびB2をご覧ください。

一次抗体のホスト動物

マルチプレックスするかどうかにかかわらず、どのアッセイでも、一次抗体と二次抗体の両方の濃度が飽和していることを確認する必要があります。次のセクションでは、さまざまなシグナル強度と一次抗体のホスト動物⁴の組み合わせについて説明し、それらのアッセイをマルチプレックスする例を示します。

A: マルチプレックスするアッセイでは同程度のシグナル強度が必要です

A1. 同一ホスト動物由来の一次抗体の場合

多重プロットする一次抗体のホスト動物が同一の場合、通常は単一の標的を検出する場合と同様に、すべてのシグナルに対して、ready-to-use(RTU¹)の共通のHRP標識二次抗体を使用できます(図1)。

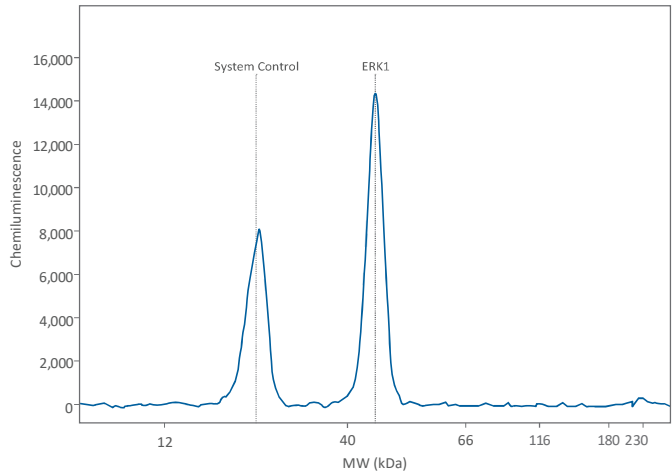


図1. 同じホスト動物由来の一次抗体でタンパク質のマルチプレックス。ERK1とシステムコントロール抗体を混合し、RTUの抗ラビット二次抗体で検出した。

試薬	PROTEIN 1 のみ検出	PROTEIN 2 のみ検出	PROTEIN 1と2の マルチプレックス
Protein 1に対する一次抗体	1 µL (1:50)	N/A	1 µL (1:50)
Protein 2に対する一次抗体	N/A	2 µL (1:25)	2 µL (1:25)
Antibody Diluent 2	49 µL	48 µL	47 µL

表1. Simple Westernで2つのタンパク質をマルチプレックスするときの一次抗体混合例。

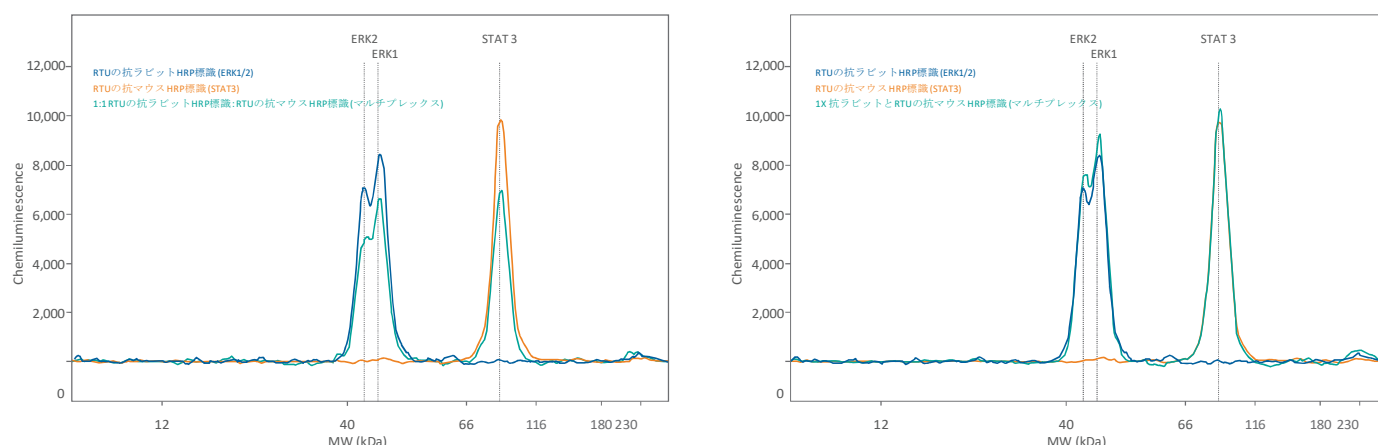


図2. 異なるホスト動物由来の一次抗体でマルチプレックス。ERK1 (rabbit anti-ERK1 RTU, PN 042-206) とSTAT3 (mouse anti-Stat3, CST, 9139, 1:50) 検出に RTUの抗マウスとRTUの抗ラビット二次抗体を1:1で混合した場合、著しいシグナル低下を観察した(左)。一方、RTUの抗マウス二次抗体と20X anti-rabbit二次抗体を混合した場合は、二次抗体の飽和状態の変化なしに別々に測定した時と同じような結果が得られた(右)。

しかし稀なケースですが、シングルプレックスからマルチプレックスに移行するときに、一次抗体同志が相互作用しシグナルがわずかに変化する可能性があることに注意してください。

A2. 異なるホスト動物由来の一次抗体の場合

一次抗体が異なるホスト動物由来の場合は、二次抗体も混合する必要があります。最も安定したアッセイを行うには、一次抗体だけでなく二次抗体も飽和状態にあることを確認する必要があります。そうすることでシグナルや再現性が維持されます。

A. 一次抗体混合液		
試薬	WES	SUE
Protein 1に対する一次抗体 (1:50 希釈)	5 μ L	4 μ L
Protein 2に対する一次抗体 (1:25 希釈)	10 μ L	8 μ L
一次抗体混合液の総容量	250 μ L	200 μ L

B. 二次抗体混合液 (20X 抗ラビット HRP 標識を使用)		
試薬	WES	SUE
RTUの抗マウス HRP 標識	237.5 μ L	190 μ L
20X anti-rabbit HRP	12.5 μ L	10 μ L
二次抗体混合液の総容量	250 μ L	200 μ L

表2. マルチプレックスアッセイのセットアップ例。(A) Wes と Peggy Sue/ Sally Sue でマルチプレックスを行うための一次抗体の準備例。この例ではProtein 1と2に対する一次抗体が50倍、25倍で希釈された時、抗原との結合が飽和すると仮定している。(B) WesもしくはSally Sue/Peggy Sue使用時の20Xの抗ラビットHRP標識をRTUの抗マウスHRP標識で混合する混合二次抗体の準備例。

二次抗体の飽和状態を維持するために、20倍希釈で使用する抗ラビットHRP標識二次抗体(PN 043-426)を提供しています。これにより、両方の二次抗体濃度を飽和状態にすることができます。**図2(左)**では、この推奨方法と、単純に2つのRTUの二次抗体を混ぜて実際の濃度を半分にした場合の比較を示しています。二次抗体が飽和していないマルチプレックスではシグナル強度は約30~40%低下しました。**図2(右)**では、同じセットアップで20xの抗ラビットHRP標識二次抗体とRTU抗マウスHRP標識二次抗体を混合したとき、両方の標識二次抗体の濃度は飽和したままで、個々に測定した際のシグナルとマルチプレックスで得られたシグナルは同等です。

B. 著しく異なるシグナル強度をもつ標的のマルチプレックスアッセイ

これは、ハウスキーピングタンパク質が、ローディングコントロールとして内因性標的タンパク質とマルチプレックスする場合に最も一般的に見られます。

B1: 同一ホスト動物由来の一次抗体の場合

有意に異なる発現レベルおよびシグナル強度を対処する最善の方法は、片方のタンパク質に対する抗体で、異なるホスト動物由来の別の抗体(おそらく高シグナルの方で、ローディングコントロールであることが多い)を見つけることです。それでもこれらのシグナルが大きく異なる場合、セクションB2の対処法のいくつかを検討します。

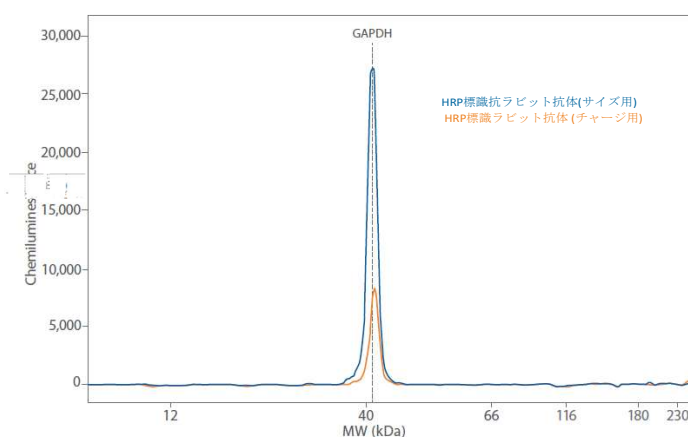
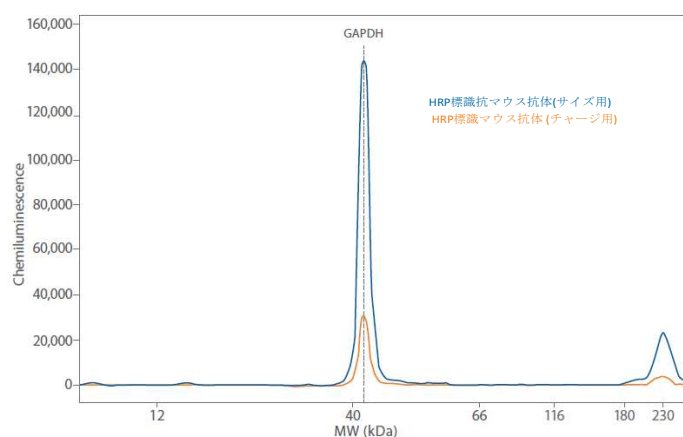


図3. WesでSimple Westernのサイズ用二次抗体とチャージ用二次抗体の比較。GAPDHを抗ウサギGAPDH一次抗体で検出し、RTUの抗ラビットHRP標識 (PN 042-206 (サイズ用)、青) もしくは抗ラビットHRP標識チャージ用二次抗体(PN 040-656、橙)のいずれかで視覚化した。右に示したように、RTUの抗マウスHRP標識(PN 042-205 (サイズ用)、青)とチャージ用二次抗体(PN 040-655、橙)でも検証した。

B2: 異なる宿主動物由来の一次抗体の場合

一般的に、推奨されるアプローチは、一次抗体および二次抗体の両方について安定して平衡状態を維持しながら、高発現している標的のシグナル強度を低下させることです。

Option 1：より少ないHRP標識量のHRP標識二次抗体を使用

RTUのHRP標識二次抗体は最大の感度を示すように設計しています。これはHRPの標識量(二次抗体上のHRPの量)を最大にすることによって達成されています。Simple Westernアッセイの感度を下げる最も簡単な方法は(一般的にはマルチプレックスの状況で)、HRP活性のより低い二次抗体を使用することです。最初のステップとして、Simple Western charge secondary antibodies(Anti-Rabbit HRP PN 040-656、Anti-Mouse HRP PN 040-655)を使用することをお勧めします。ほとんどの場合、これでシグナルレベルは著しく低下します(図3)。この場合、低発現レベルのタンパク質用のRTUの二次抗体に、HRP活性のより低い二次抗体の1つを(1:100で希釈して)混合します。

Option 2：非標識二次抗体をHRP標識二次抗体に混ぜてさらにシグナルを低下

Option 1で高発現タンパク質のシグナルが十分に減少しない場合は、対応する標識二次抗体を未標識の二次抗体と混合することで、比活性をさらに下げることができます。これによりこの抗体の反応速度と飽和レベルは一定に保たれますが、比活性は低下します。

二次抗体の比 (標識無し:HRP標識)	AFFINIPURE SECONDARY ANTIBODY (標識無し)	HRP低活性 20X SECONDARY ANTIBODY (HRP標識)
1:1	20 µL	20 µL
3:1	28 µL	14 µL
5:1	32 µL	8 µL
10:1	36 µL	4 µL
20:1	38 µL	2 µL
40:1	39 µL	1 µL
80:1	79 µL	1 µL
160:1	159 µL	1 µL
320:1	319 µL	1 µL
640:1	639 µL	1 µL

二次抗体混合液の作成手順:

1. HRP低活性のHRP標識二次抗体をAntibody Diluent 2で20Xに希釈する。氷上保存。
2. AffiniPure非標識二次抗体をAntibody Diluent 2で400 µg/mLに希釈する。氷上保存。
3. 一連の20X 非標識:HRP標識二次抗体混合液を表のよう異なる比率で混合し、氷上で保存する。
4. 20X 非標識:HRP標識二次抗体混合液をマルチプレックスする標的タンパク質のRTUの抗ラビットもしくは抗マウスに次抗体で希釈する。
5. 調製した20X非標識:HRP標識二次抗体混合液は4°Cで一ヶ月間安定。

表3. さらにシグナルを低くするための非標識二次抗体とHRP標識二次抗体の推奨混合滴定スキーム。

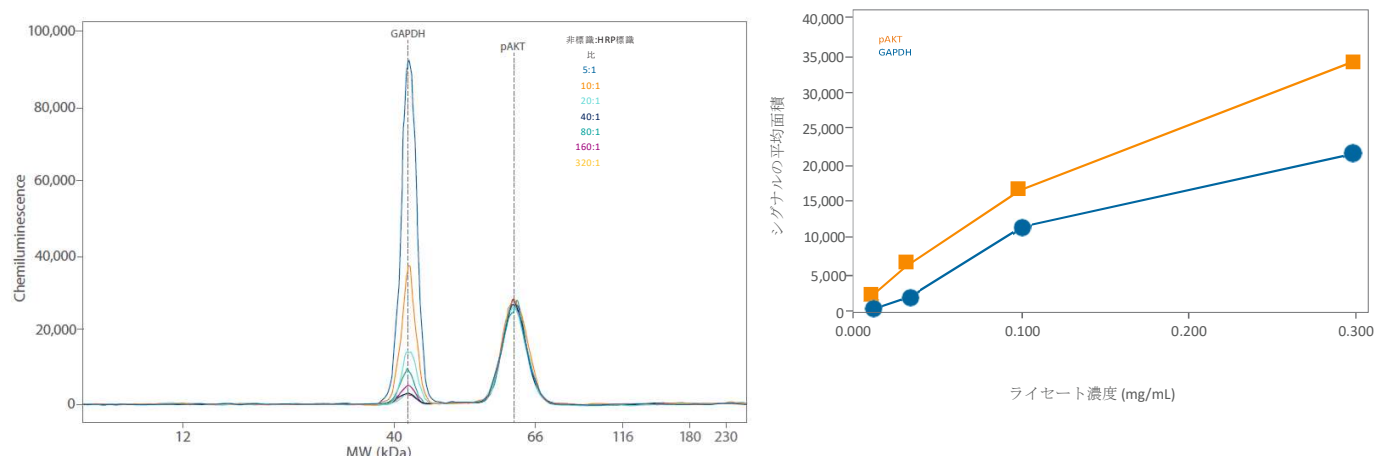


図4.抗マウス非標識二次抗体とHRP標識二次抗体の滴定比は、10:1の時GAPDHのシグナルがpAKTのシグナルに最も近いことを示しました(左)。混合するとシグナル強度が減少するので、同時測定する2種のタンパク質のピーク面積が同じようになる比率を選択できた。抗マウス非標識二次抗体と抗マウス標識二次抗体を混合したときのGAPDHおよびpAKTのアッセイの直線性を決定するためにJurkatライセートも滴定した(右)。GAPDHとpAKT滴定曲線は同程度の直線性および勾配になり、10:1の非標識および抗マウス標識二次抗体の比率が最適であることを示している。

まず初めにフリーの(非HRP標識)二次抗体とHRP標識二次抗体を異なる比率で混合し(抗体の総濃度を一定に保ちながら)、マルチプレックスで同時に検出する標的タンパク質に近いシグナル強度を得る比率を決定します。前にCalyculinで処理した0.05 mg/mLのJurkatライセートを用いて、1:25のpAkt(CST、9271)と1:50のGAPDH(Novus、NBP2-27193)でマルチプレックスしたのと同じモデルを用いてこれを試験しました。AffiniPure抗マウス非標識二次抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratory、115-005-062)と抗マウスHRP標識二次抗体(ProteinSimple Anti-Mouse HRP、PN 040-655)を5:1~640:1の比で混合しました(推奨する混合比に関しては表3参照)。10:1の比率の時、pAKTと同様の強さのシグナルが得られました(図4、左)。抗マウス非標識二次抗体を混合してGAPDHシグナルを調整しても、マルチプレックスしたpAKTシグナルには影響しませんでした。両方の二次抗体を混合するとGAPDHシグナルが減少したため、それぞれの標的シグナルは定量性のある同じリニアダイナミックレンジ内に収まりました(図4、右)。この方法では、必要に応じて任意のシグナルを柔軟に調整できますが、HRP標識と非標識の最適比はターゲット毎に異なるので、アッセイ毎に最適比を決定しなければならないことに注意してください。

同様に、抗ウサギ二次抗体についても非標識のanti-rabbit IgG(Jackson ImmunoResearch、111-005-045)およびAnti-Rabbit HUX HRP Secondary Antibody(ProteinSimple、PN 041-081)を用いて同じことができます。

また、実験を簡素化するために、混合した二次抗体カクテルの安定性を検討したところ、二次抗体を毎回準備する必要がないことがわかりました。上記のサプライヤーからの二次抗体の場合、この試験では20Xで調製した非標識と抗マウスHRP標識二次抗体の混合保存溶液は4°Cで少なくとも1ヶ月間安定であることを示しました。他社からの二次抗体混合溶液の安定性はそれぞれ各自で確立してください。

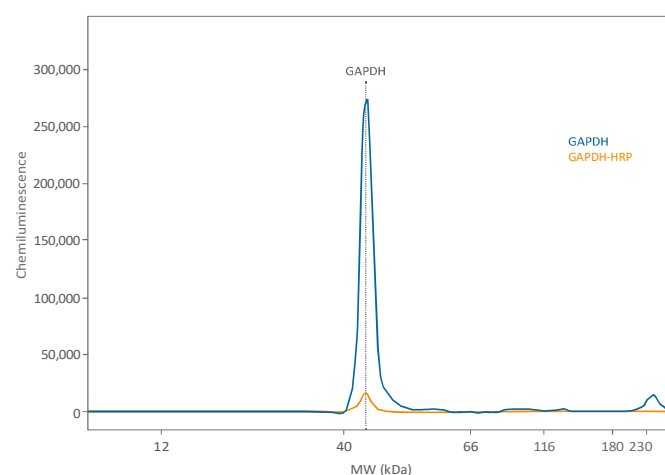


図5. Calyculin Aで処理した0.05 mg/mLのJurkatライセート中のGAPDHの直接および間接検出。直接的な検出ではシグナル強度が弱まり、非常に高発現のタンパク質のシグナル強度が下がった。

Simple Westernでマルチプレックス

how to guide

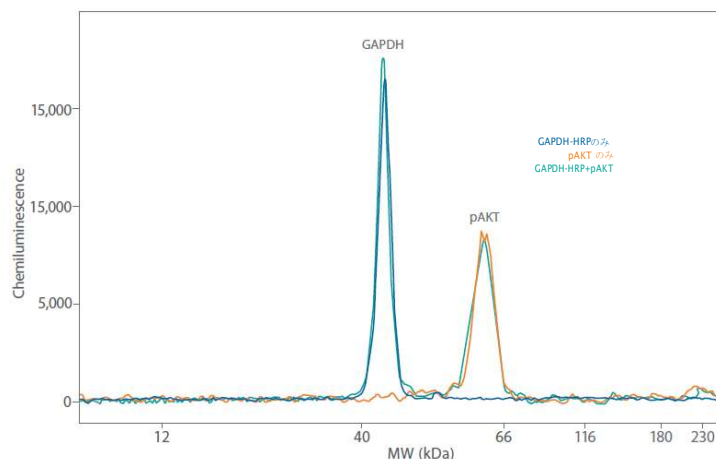
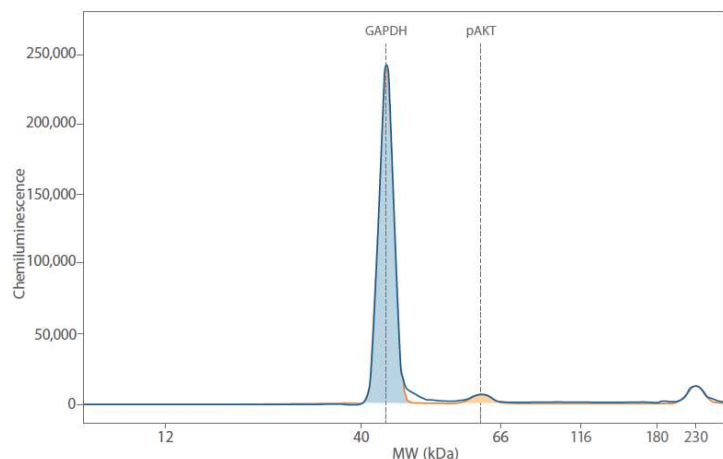


図6. pAKTを検出するために必要なライセート濃度でマルチプレックスした場合(左)、GAPDHのシグナルは非常に高く、シグナル飽和の可能性が高い。HRP標識抗GAPDH抗体でのGAPDHの直接検出(右)では、その化学発光シグナル強度はpAKTシグナルにより近く、pAKTシグナルに影響を及ぼさない。

Option 3: HRP標識一次抗体によるシグナル低下でマルチプレックスを可能に

シグナルを減らすもう1つの方法は、HRP標識一次抗体を直接使用することです。ここでのシグナル減少には2つの要因が絡んできます：(1) 標識酵素の比活性が低いことと(2) 二次抗体を使わないので増幅がないこと。この方法は便利ですが、Option 2のようなシグナル強度調節の柔軟性はありません。

このアプローチの妥当性を検証するために、最初にCalyculin A(CST、9273)で処理した0.05 mg/mLのJurkatライセート中のマウスGAPDHを間接もしくは直接的に検出して比較しました。ここでは、同じ結合速度および親和性をもつ抗体で比較するために、両方の抗体は同じ抗体クローン由来のものを使用し比較しました。抗体をAntibody Diluent 2で1:50に希釈し、サンプルプレートの一次抗体の列にプレーティングした後、間接検出用にProteinSimpleのRTUの抗マウスHRP標識、もしくは直接検出用にAntibody Diluent 2でインキュベートしました。

HRP標識抗GAPDHを用いて直接検出したGAPDHの化学発光シグナルは、間接的に検出したシグナルと比較して1/30小さいものでした(図5)。非標識一次抗体をHRP標識一次抗体で置き換えることで、結合する一次抗体の飽和を維持し、最適な線形範囲にあるので、ターゲットシグナルを減少させ、簡単に正確で再現可能な定量を行うことができます(詳細については、表4を参照)。

試薬	WES	PEGGY SUE/ SALLY SUE
Protein 1に対する一次抗体(Rabbit)	5 μ L	4 μ L
Protein 2に対するHRP標識一次抗体	10 μ L	8 μ L
Antibody Diluent	235 μ L	188 μ L
一次抗体混合液の総容量	250 μ L	200 μ L
仮定条件: 1. Protein 1と2に対する一次抗体の飽和濃度は抗原に対してそれぞれ1:50と1:25。 2. Protein 2のシグナルはProtein 1のシグナルよりはるかに高い。		

表4. HRP標識一次抗体を含むマルチプレックスのセットアップ例。

次に、0.05 mg/mLの同じJurkatライセート中のGAPDHとpAKTを同時に検出しました。1:50のマウス抗GAPDH抗体(Novus、NBP2-27103)、1:25のラビット抗pAKT(CST、9271)抗体および20Xの抗ラビットHRP標識二次抗体をRTUの抗マウスHRP標識二次抗体に20倍希釈で混合した間接検出ではpAKTシグナルと比較して、5秒間の露光時間で極めて高いGAPDHの化学発光シグナルを示しました(図6、左)。図6の右パネルでは、pAKT抗体は同じですが、GAPDHはHRP標識抗GAPDH抗体(Novus、NBP2-27103H、1:50希釈で使用)で検出しました。HRP標識一次抗体を用いて直接検出したGAPDHのシグナルは、pAKTのシグナルに対して格段に同等になりました。今回のすべての実験においてpAKTのシグナルは同等であったため、pAKTのシグナルはGAPDHの影響を受けていないと確信しています。

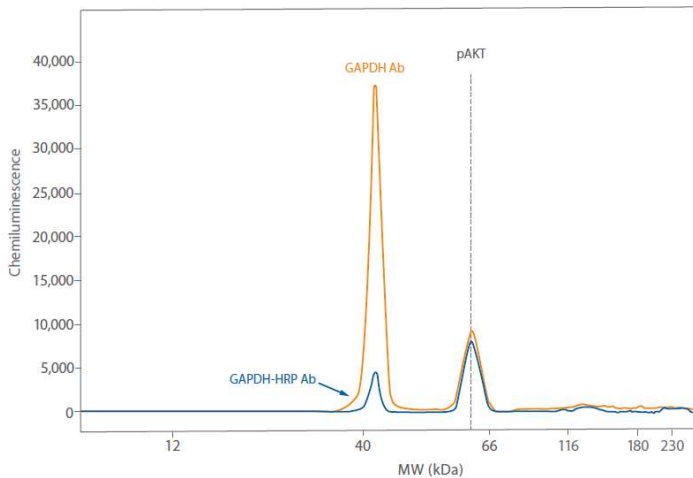


図7. HRP標識一次抗体を用いたGAPDHの直接検出では、GAPDHシグナルがpAKTシグナルにより近くなるという結果が得られた。

異なる抗体ペアでも同じことが観察できるか確認するために、1:50のラビット抗GAPDH(Novus、NB300-325もしくはNovus、NB300-326H)と1:25のマウスpAKT(R&D Systems、MAB887)で再度Calyculin A処理したJurkatライセート(0.05 mg/mL)を調べました。この場合も、直接検出されたシグナルはpAKTシグナルに近く、両方のターゲットからのシグナルがリニア(線形)になる範囲も広がりました(図7)。

これらのことから異なる抗体ペアを使用してマルチプレックスで直接検出するのは有用です。

まとめ

Simple Westernでマルチプレックスをすると、多くのメリットが得られます。実験ごとに得られるデータポイントは2倍になり、スループットが向上します。しかし、定量的にマルチプレックスするには、標的が同じリニア範囲内に収まる必要があります、慎重な最適化が必要ですが、その後は、2つの一次抗体を1つのウェルに混ぜ合わせて、実験を開始するだけです。異なる宿主動物で作った一次抗体でマルチプレックスする場合は、RTUの二次抗体を混合するだけで、シグナルは約40%減ります。20Xの抗ウサギ二次抗体をRTUの抗マウス二次抗体と混合すると、シグナルが回復するだけでなく、マルチプレックスで使用する抗体を選択する際の柔軟性も向上しました。

用語説明

¹RTU: Ready-to-use。通常、希釈せずにそのまま使用する試薬。

²マルチプレックスアッセイ: 複数抗体で複数分子を同時に検出。

³リニアダイナミックレンジ: 定量性のあるデータの範囲を示し、理想的には濃度が2倍になればシグナルも2倍になります。

⁴宿主動物: 抗体の産生に用いられた免疫動物