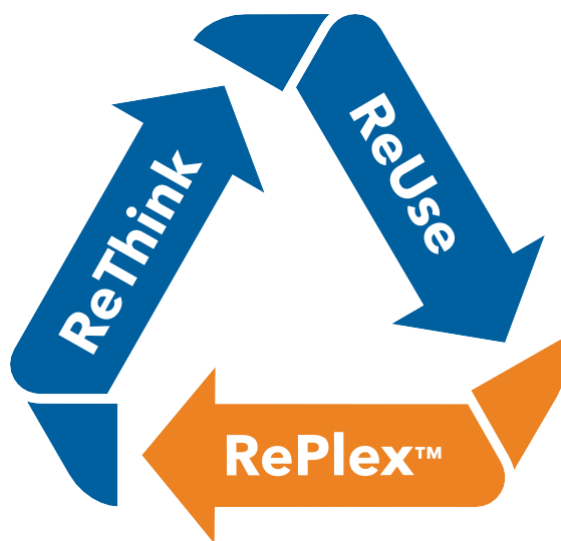


# RePlex™メソッド開発ガイド



## イントロダクション

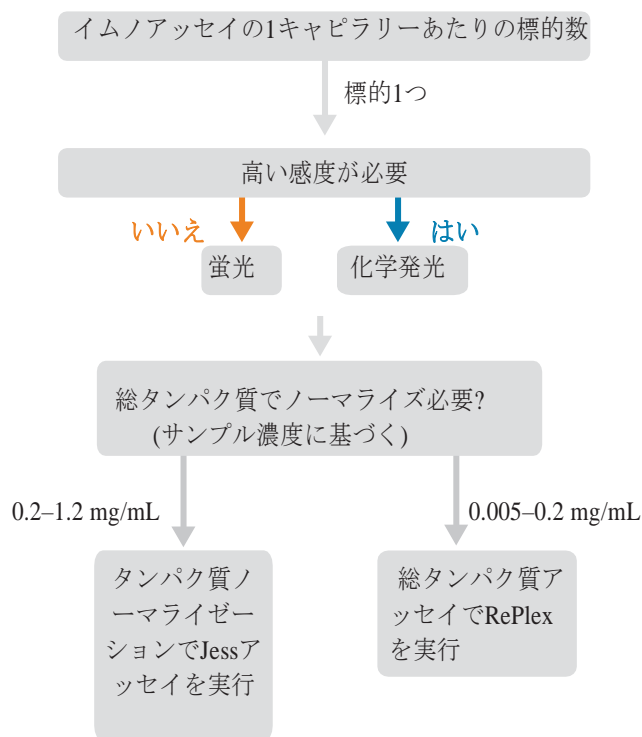
Jess™は、蛍光と化学発光でタンパク質を検出することができるだけでなく、さらに2つの異なるタンパク質ノーマライゼーション方法も提供します。Abby™は、化学発光検出や総タンパク質ノーマライゼーションにより、実験の柔軟性も提供します。メソッドを最適化することで、より信頼性の高い定量性のあるデータを得ることができます。このガイドでは、RePlex™アッセイのメソッド開発に焦点を当てています。このRePlex™アッセイにより1回の測定で2つの連続イムアッセイもしくはイムアッセイに続いて総タンパク質アッセイを行うことができます。これは、一度の測定操作で、2サイクル（プローブ1とプローブ2）のプロービングを行います。このガ

イドは、すでにJessもしくはAbbyで標的タンパク質の検出条件を最適化したことを前提としています。最適化の詳細については、“[Simple Western Size Assay Development Flowchart](#)”を参照してください。

Jessは、複数の標的タンパク質を検出するための複数の選択肢と、総タンパク質ノーマライゼーションを行うための2つの異なる方法を提供します。Abbyも、RePlexで化学発光を使用して複数のターゲットを検出することができます。このガイドではRePlexアッセイの開発に焦点を当てますが、他のアッセイと比較して、JessとAbbyでRePlex™アッセイをどのような場合に使用するかについてのフローチャートを以下に示します：

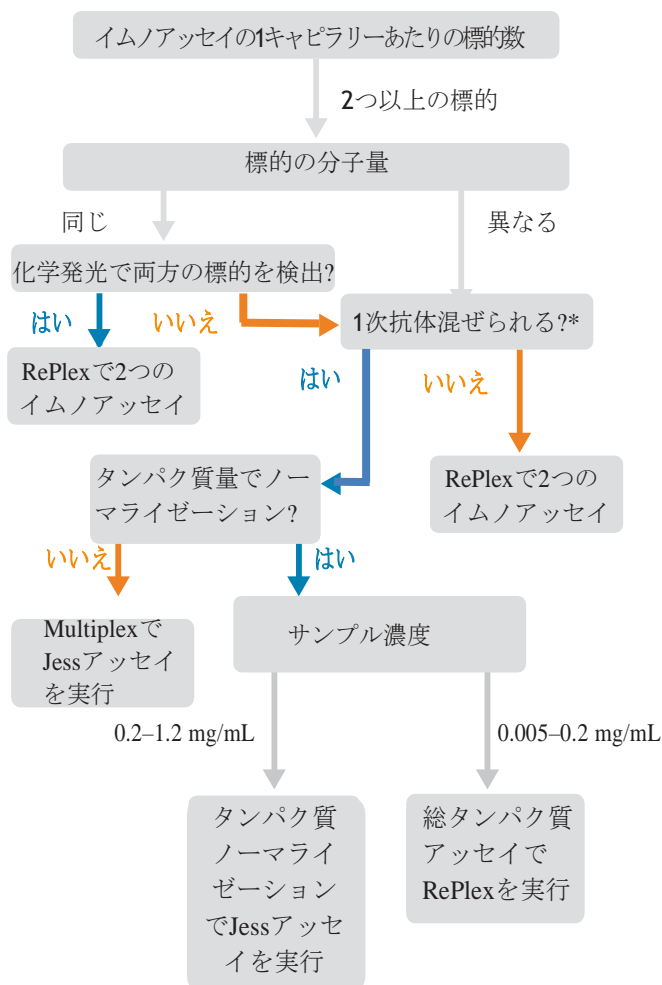
### アッセイ選択の概要 -

#### 1つの標的タンパク質の場合



### アッセイ選択の概要 -

#### 2つ以上の標的タンパク質の場合



**RePlex:** プローブ2で化学発光検出する場合は、プローブ1で、標的タンパク質をより弱い化学発光シグナルで検出、もしくは蛍光検出(Jessのみ)することを推奨。

マルチプレックス: 複数の一次抗体を混合するアッセイや、該当する場合、複数の二次抗体を混合するアッセイ。

\*混合する各抗体の抗体交差反応性、ダイナミックレンジ、バックグラウンドレベルを確認してください。

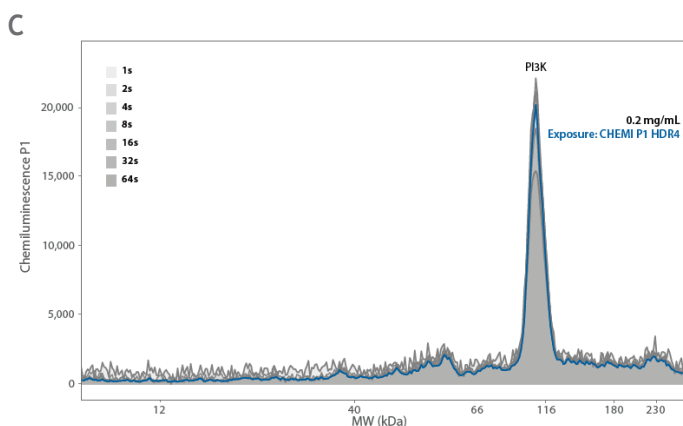
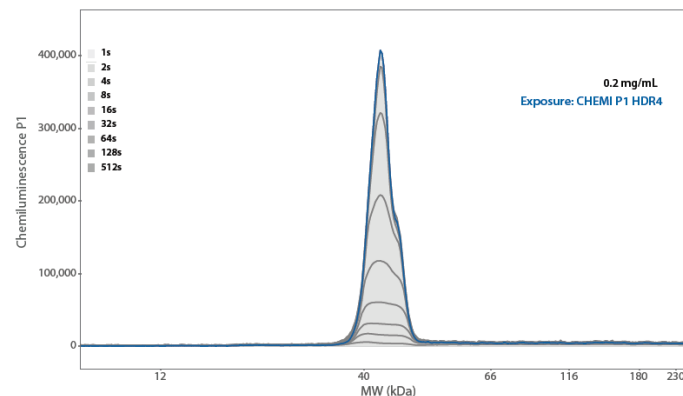
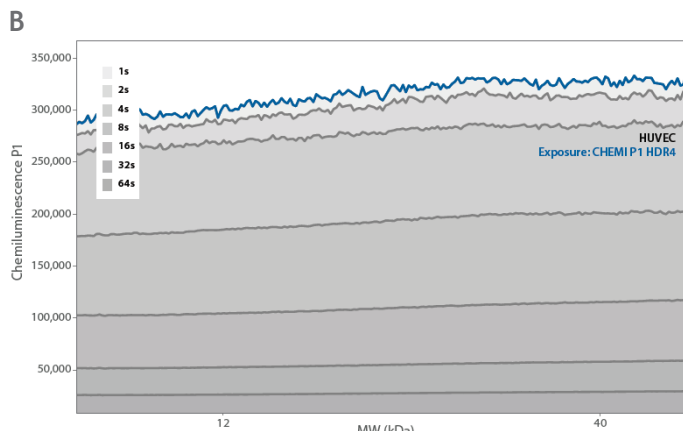
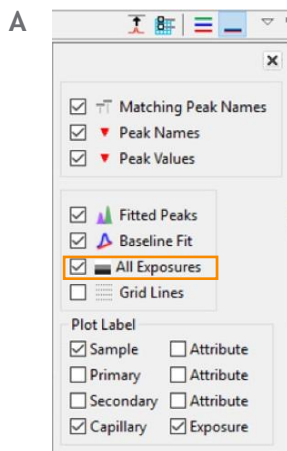
## 2つの免疫アッセイ

プロービングを2サイクル行うRePlex™アッセイを行い、複数抗体で2つの標的タンパク質を検出、もしくは2つの抗体で1つの標的タンパク質を検出する場合、プローブ1により発現量の少ないタンパク質またはより不安定な翻訳後修飾された分子をプロービングすることをお勧めします。

RePlexアッセイを行う場合、個別に最適化し決定した各抗体の条件を使用する必要があります。定量性のある結果を得るには、アッセイで使用するライセート濃度は、各抗体においてシグナルがライセート濃度と直線性を示す同じ濃度範囲で行う必要があります。Jess™の化学発光と蛍光のダイナミックレンジの詳細については、アプリケーションノート“[Multiplexed Western Blotting Redefined: Superplexing on Jess](#)”(PL7-0047)を参照してください。Abbyにおける化学発光のダイナミックレンジは、アプリケーションノートに記載されている値と同様であると予想されます。さらに、化学発光で検出する場合、使用する抗体で得られるシグナルは、すべての露光時間で安定している必要があります。Compass for Simple WesternのAll Exposuresオプションでグラフを表示すると、シグナルの減衰を簡単かつ迅速に調べることができます(図1A)。プローブ1で使用する抗体は、ベースラインが極端に高くなるものや、露光時間の増加に伴って有意なシグナル減衰を示すようなものではないけません(図1B)。シグナル減衰のない理想的な標的タンパク質のシグナル例を図1Cに示します。シグナルピークは、一連の露光時間全体にわたって十分に重なっていることに注意してください。

2つの最適化された抗体で初めてRePlexアッセイをセットアップする場合、図2に示すように、プレートレイアウトの一部として、アッセイにコントロールを含めることをお勧めします。これらのコントロールを含めることで、最適なプロービング順序と抗体除去率を決めることができます。両方のプロービングステップで化学発光を使用して、同じ分子量(MW)の2つの標的タンパク質を検出する場合は、図4で示す新たに追加されたコントロールを参照してください。

図1.Compass for Simple WesternのグラフオプションのAll Exposuresにチェックを入れると (A)、シグナルの減衰を識別するのに役立ちます。ベースラインが高い(上)またはシグナルピークが高い(下)抗体は、ベースラインまたはシグナルピークを露光時間全体と比較すると、シグナル減衰(B)を示すことがあります。一連の露光時間で安定したシグナルを示す抗体を使用すると、複数の露光時間によるシグナルは重なります(C)。



キャピラリー/プレートのウェル

		1	2	3	4	5	6	7
プレート行	A	Biot. Ladder	サンプル1					
	B	Antibody Diluent						
	C	ブロッキング	一次抗体A	一次抗体B	Antibody Diluent		一次抗体A	一次抗体B
	D	Streptavidin	二次抗体A	二次抗体B	Antibody Diluent		二次抗体A	二次抗体B
	E	ブロッキング	一次抗体B	一次抗体A		一次抗体B	Antibody Diluent	
	F	ブロッキング	二次抗体B	二次抗体A		二次抗体B	二次抗体A	二次抗体B
目的		抗体のプローピングの順序を決定します		プローブ1のプローブ2への影響を見るためのコントロール; 一次抗体の安定性を決定します			抗体除去率を決定します	

図2. 2つの標的タンパク質を検出する条件を最適化するときの初回のRePlexアッセイのレイアウトの概要。このレイアウトは、1枚のプレート内で3回繰り返すことができ、3つの標的タンパク質/抗体ペアを最適化することができます。

### プローピングの順序の決定と一次抗体の安定性のチェック

図2のアッセイを実行した後、プローピングに使用する抗体の順序を、以下のようにデータを確認して決定します:

- 2番目と4番目のキャピラリーの一次抗体Aによるシグナルを比較します。4番目のキャピラリーのシグナルの方が低い場合は、その抗体をプローブ1で使用する必要があります。この抗体によるシグナルが両方のキャピラリーで似ている場合は、プローブ1またはプローブ2のどちらでも使用できます。
- 3番目と5番目のキャピラリーの一次抗体Bによるシグナルを比較します。5番目のキャピラリーのシグナルの方が低い場合は、その抗体をプローブ1で使用する必要があります。この抗体によるシグナルが両方のキャピラリーで似ている場合は、プローブ1またはプローブ2のどちらでも使用できます。

**注:** 場合によっては、プローブ2でより高いシグナルが観察されます。RePlex™アッセイでは、異なるサンプルを比較する場合、いずれかのプローピングステップ (プローブ1または2) で比較することを常にお勧めします。異なるプローピングステップ間で、同一抗体によるシグナルを定量または比較しないでください!

### プローブ1のプローブ2への影響を特定

図2のアッセイを実行した後、プローブ1で実行したイムノアッセイにより生じるプローブ2への影響を、以下のようにデータを確認することで識別します:

- 3番目と4番目のキャピラリーの一次抗体Aによるシグナルを比較します。3番目のキャピラリーのシグナルの方が低い場合は、その抗体をプローブ1で使用する必要があります。この抗体によるシグナルが両方のキャピラリーで似ている場合は、プローブ1またはプローブ2のどちらでも使用できます。
- 2番目と5番目のキャピラリーの一次抗体Bによるシグナルを比較します。2番目のキャピラリーのシグナルの方が低い場合は、その抗体をプローブ1で使用する必要があります。この抗体によるシグナルが両方のキャピラリーで似ている場合は、プローブ1またはプローブ2のどちらでも使用できます。

### 抗体の除去効率の計算

プローブ1とプローブ2の間のステップの抗体除去率は抗体に依存する可能性があるため、抗体除去率を確認することが重要です。プローブ1由来の残留抗体がプローブ2ステップに持ち越され、プローブ2の二次抗体がプローブ1の二次抗体と同じ生物種由来の場合や異なる生物種の抗体への非特異反応が取り除かれていない場合、キャリアオーバーシグナルが予想され、プローブ2の正確な定量に影響を及ぼします。抗体の除去率は、プローブ1由来の一次抗体と二次抗体を除去後、プローブ2においてプローブ1と同一の二次抗体で再度プローピングして決定します (図2の6番目と7番目のキャピラリー)。これにより、プローブ1による残留一次抗体が検出されます。抗体の除去率は、次のように計算します。:

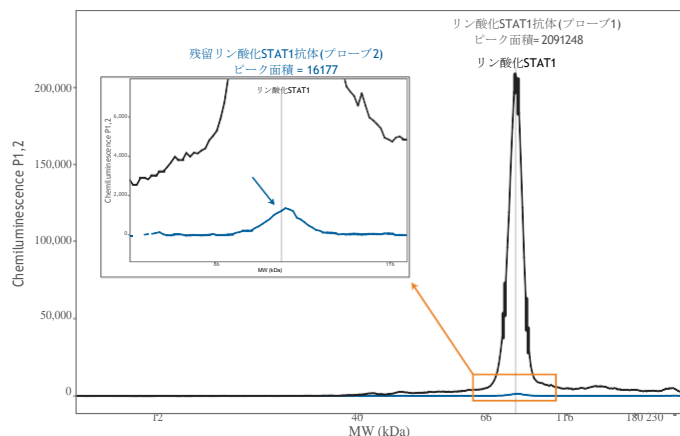
$$\frac{(\text{プローブ1のピーク面積} - \text{プローブ2のピーク面積})}{(\text{プローブ1のピーク面積})} \times 100 = \text{抗体の除去率 (\%)}$$

## RePlexメソッド開発ガイド

リン酸化STAT1抗体の抗体除去率の計算例を図3に示します。抗体除去率は少なくとも95%以上でなければいけません。それより低い場合、その抗体はRePlex™アッセイのプロープ2でのみ使用する必要があります。

### 同じ分子量の2つの標的タンパク質を化学発光で検出

RePlexアッセイは、各標的タンパク質を別々のプロービングステップでプローブすることで、同じ分子量の2つの標的タンパク質を化学発光検出することを可能にします。このアッセイの最も一般的な使用例の1つは、両方の1次抗体が同じ生物種由来である場合など、同じインキュベーションステップで抗体を組み合わせることができない場合に、標的タンパク質のリン酸化およびトータルタンパク質の検出です。これらのタイプのアッセイでは、図4で要約されているような以下のコントロールとプレートのセットアップをお勧めします。この実験では、リン酸化タンパク質を含んでいるサンプルを使用します。一回の測定で最適なアッセイ条件をより迅速に決定するために、いくつかのライセート濃度が含まれています。これらの濃度は2~3倍の連続希釈である必要があります。図2と同じコントロールがこのプレートマップにも含まれており、このガイドで



$$\frac{(2091248-16177)}{2091248} \times 100 = 99.2\% \text{の抗体除去率}$$

図3.リン酸化STAT1抗体の抗体除去率の計算。グラフビューは、プロープ1とプロープ2による結果を重ねて表示しており、プロープ2による結果の拡大図（挿入図）も表示している。プロープ1とプロープ2のピーク面積で、抗体除去率を計算する。

### キャピラリー/プレートウェル

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	Biot. Ladder	低いライセート濃度	低-中濃度のライセート濃度	低-中濃度のライセート濃度	中-高濃度のライセート濃度	中-高濃度のライセート濃度	中-高濃度のライセート濃度	中-高濃度のライセート濃度	中-高濃度のライセート濃度	高いライセート濃度	高いライセート濃度	高いライセート濃度	高いライセート濃度
B	Antibody Diluent												
C	ブロッキング	リン酸化抗体(X)	トータル抗体(Y)	リン酸化抗体(X)	トータル抗体(Y)	リン酸化抗体(X)	トータル抗体(Y)	リン酸化抗体(X)	トータル抗体(Y)	Antibody Diluent	リン酸化抗体(X)	トータル抗体(Y)	
D	Streptavidin	二次抗体 X	二次抗体 Y	二次抗体 X	二次抗体 Y	二次抗体 X	二次抗体 Y	二次抗体 X	二次抗体 Y	Antibody Diluent	二次抗体 X	二次抗体 Y	
E	ブロッキング	トータル抗体(Y)	リン酸化抗体(X)	トータル抗体(Y)	リン酸化抗体(X)	トータル抗体(Y)	リン酸化抗体(X)	トータル抗体(Y)	リン酸化抗体(X)	トータル抗体(Y)	Antibody Diluent	Antibody Diluent	
F	ブロッキング	二次抗体 Y	二次抗体 X	二次抗体 Y	二次抗体 X	二次抗体 Y	二次抗体 X	二次抗体 Y	二次抗体 X	二次抗体 Y	二次抗体 X	二次抗体 Y	

目的	抗体でのプロービングの順序を決定する低いライセート濃度	抗体でのプロービングの順序を決定する低-中濃度のライセート濃度	抗体でのプロービングの順序を決定する中-高濃度のライセート濃度	抗体でのプロービングの順序を決定する高いライセート濃度	プロープ2においてプロープ1の影響を見るためのコントロール; 一次抗体の安定性を決定する	抗体除去率を決定する

図4.リン酸化タンパク質とトータルタンパク質を検出するそれぞれの抗体を使用してRePlexアッセイを最適化するプレート設定。このレイアウトは、1枚のプレート内で2回繰り返すことができ、2つの標的タンパク質/抗体ペアを最適化することができる。

前述したように、プローブの順序、プローブ2に及ぼすプローブ1の影響、および抗体除去率を決定するために使用することができます。

### 最適なライセート濃度の決定

図4のプレートレイアウトは、RePlex™アッセイで使用する最適化されたライセート濃度を決定するのに役立ちます。All Exposuresにチェックを入れて、プローブ1において、最もライセート濃度の高いサンプルでシグナル減衰を確認します（リン酸化抗体の場合は8番目と12番目のキャピラリー、トータル抗体の場合は9番目と13番目のキャピラリー）。

- 1つの抗体のみが短い露光時間（16秒未満）でシグナル減衰を示す場合は、その抗体をプローブ2で使用する必要があります。
  - 定量のヒント:**シグナルの減衰を示さないライセート濃度を使用することをお勧めします。
- 両方の抗体が短い露光時間（16秒未満）でシグナル減衰を示す場合は、より低い濃度のライセートを使用する必要があります。より低い濃度のライセートを流したキャピラリー（2〜7番目のキャピラリー）を確認し、両方の標的タンパク質が検出される濃度を選択します。図5は、ライセート濃度が低いとシグナル減衰がどのように減少するかを例示しています。

より低い濃度のライセートで両方の標的タンパク質を検出できない場合:

- Jessのみ:**プローブ1でシグナルが最も高い標的タンパク質をNIR検出し、プローブ2で第2の標的タンパク質を化学発光で検出します。
  - 定量のヒント:**NIRシグナルが、濃度依存的にシグナルの直線性の範囲にあることを確認するために、フォローアップの検証測定をお勧めします。
- JessとAbby:** RePlexアッセイのプローブ1で単一の化学発光露光時間に設定します。All Exposuresビューを使い、シグナルが安定している最長の化学発光露光時間を選択します。RePlexアッセイで、Compass for Simple WesternのDetection Profileの**RePlex Dynamic Range**のチェックを外し、最適な単一の露光時間を手入力します（図6）。
  - シグナル減衰を示す抗体を代えるために代替の一次抗体を探します。
    - 定量のヒント:**代わりの抗体のシグナルが、使用するライセート濃度で濃度依存的にシグナルの直線性の範囲にあることを確認するために、フォローアップの検証測定をお勧めします。

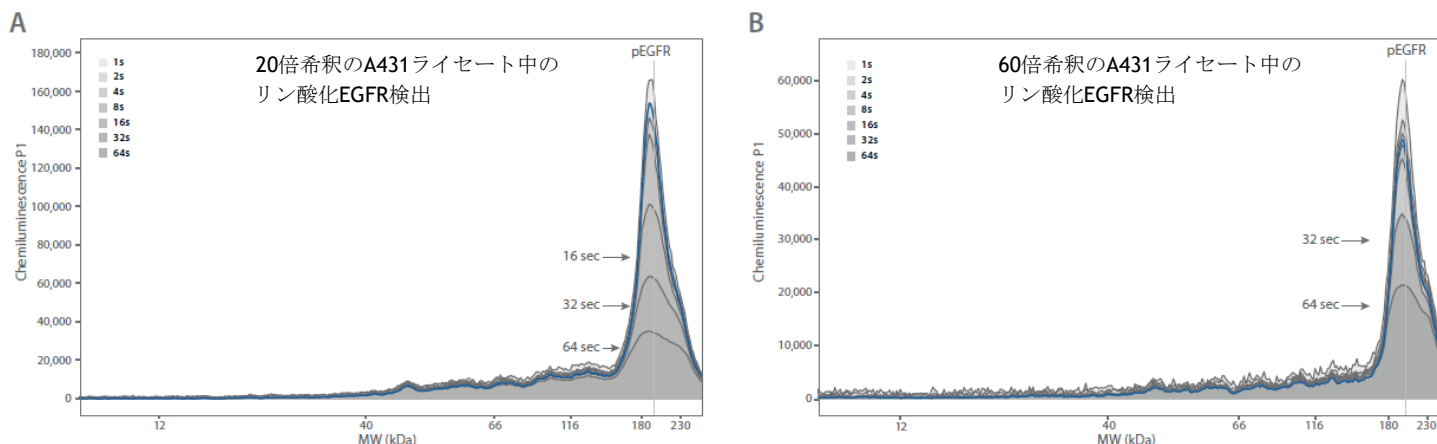


図5. ライセート濃度を下げると、化学発光によるシグナルの減衰が軽減される。20倍希釈のA431ライセート中のリン酸化EGFRを検出すると、Compass for Simple WesternのAll Exposuresで観察されるようにシグナルが減衰する（A）。サンプル濃度を下げて60倍希釈のライセートを使用すると、各露光時間で取得したシグナルがより重なっており、より安定したシグナルとなる（B）。

## プローブ1での標的タンパク質と同じ分子量の標的タンパク質をプローブ2で検出するために化学発光誘導ダメージの確認

化学発光イムノアッセイでは、二次抗体のHorseradish peroxidase (HRP) は、アッセイでシグナルとして検出される光に加えて、ルミノールとの反応中に高濃度で局所的なフリーラジカルを生成します<sup>1</sup>。プローブ1でフリーラジカルが大量に生成されると、これらのラジカルはプローブ2で使用する抗体が認識する近くの抗原に損傷を与えることがあります。したがって、RePlex<sup>™</sup>化学発光アッセイでは、プローブ1で検出する標的タンパク質と同じ分子量の標的タンパク質のシグナルがプローブ2で影響を受ける可能性があります。

例として図4のプレート設定とトータル/リン酸化抗体モデルを使用して、化学発光誘導ダメージが起こったかどうかを確認するために、プローブ2での8番目と11番目のキャピラリーのトータル抗体によるシグナルを比較します。8番目のキャピラリーのシグナルが著しく低い場合 (>20%)、プローブ1で使用しているリン酸化抗体によるシグナルは、抗原の損傷を引き起こすのに十分高いシグナルであった可能性があります。図7は、この影響の例を示しており、3T3ライセート内のc-Junシグナルは、11番目よりも8番目のキャピラリーの方がはるかに低くなっています。

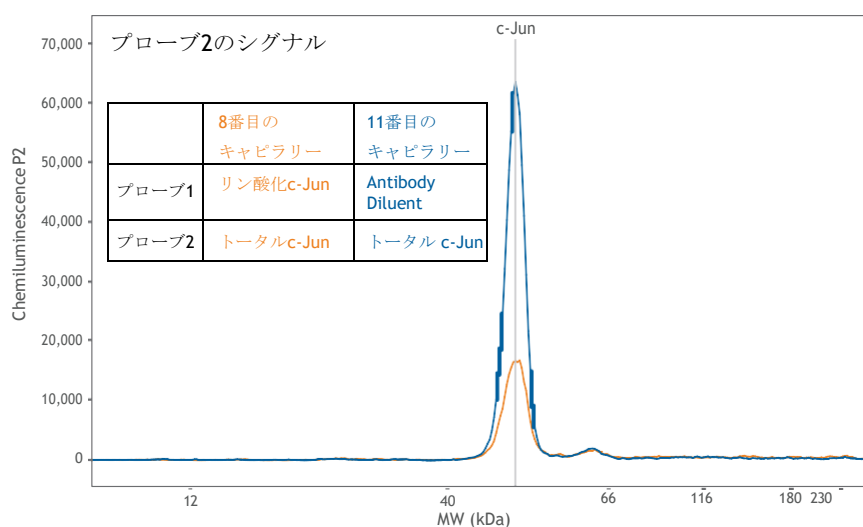


図7. プローブ1のリン酸化c-Junの化学発光検出によるプローブ2の3T3ライセート中のc-Junシグナルの減少。図4のプレートレイアウトで測定すると、8番目のキャピラリーのトータルc-Junシグナル（プローブ2）は、11番目のキャピラリーのシグナル（左）よりもはるかに低く、RePlexで高濃度の3T3ライセートを使用する場合、プローブ1でリン酸化c-Junを検出することは避けなければならないことを示唆している。レーンビュー（右）は、プローブ1とプローブ2におけるシグナルを示している。

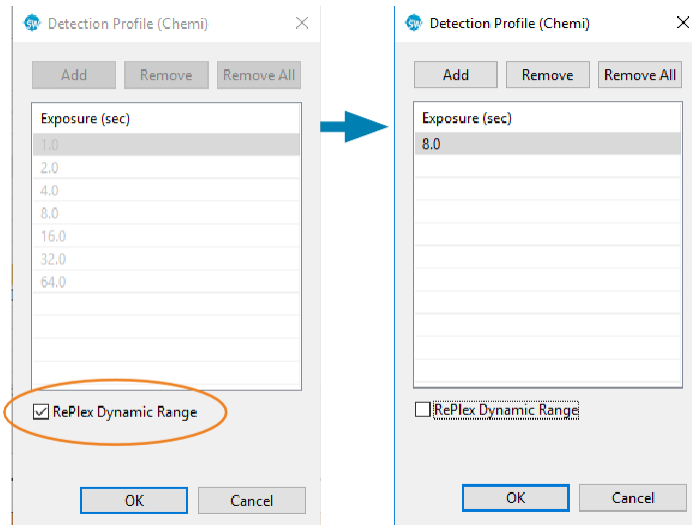
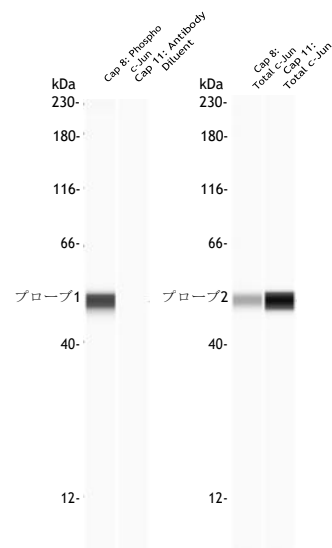


図6. Compass for Simple WesternでRePlex化学発光アッセイを単一の露光時間に変更



## RePlexメソッド開発ガイド

- ・プローブ2で検出した標的タンパク質で化学発光誘導ダメージを観察し、異なるプロービング順序でアッセイを行えない場合、より低い濃度のライセートでアッセイを行う必要があります。低い濃度のライセートを流したキャピラリー（2～7番目のキャピラリー）を確認し、両方の標的タンパク質が検出される濃度を選択します。

より低い濃度のライセートで両方の標的タンパク質を検出できない場合:

- ・ **Jessのみ:** プローブ1でシグナルが最も高い標的タンパク質をNIR検出します。プローブ2で2番目の標的タンパク質を化学発光で検出します。
  - **定量のヒント:** NIRシグナルが、高濃度の標的の場合、シグナルの直線性の範囲にあることを確認するために、フォローアップの検証測定をお勧めします。
- ・ **JessとAbby:** RePlex™アッセイのプローブ1では、単一の化学発光露光時間でシグナルを検出します。All Exposuresビューで、化学発光シグナルが安定している最長の露光時間を選択します。RePlexアッセイで、Compass for Simple WesternのDetection Profileの**RePlex Dynamic**

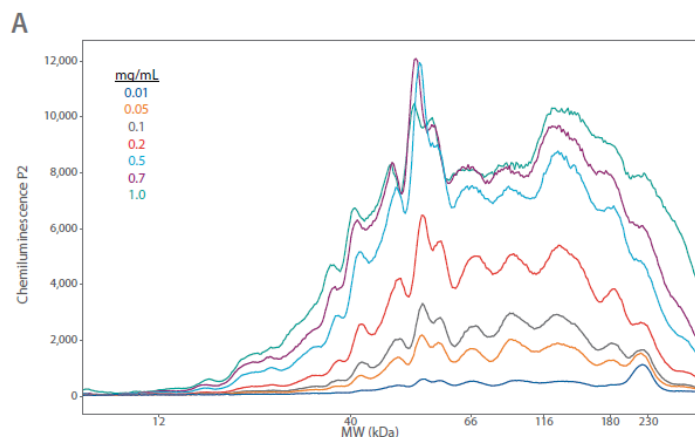


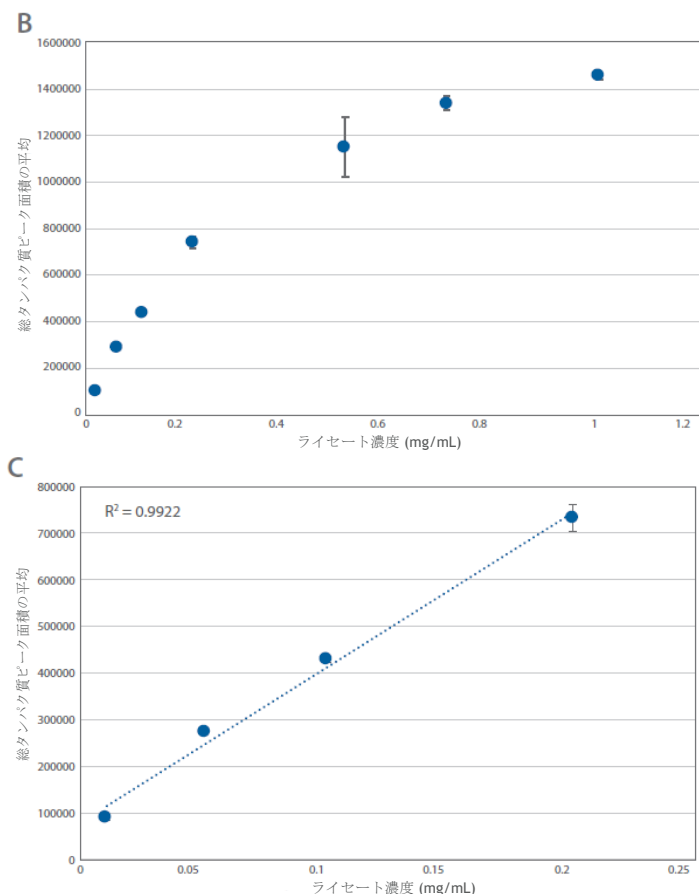
図8. 総タンパク質アッセイでHeLaライセート濃度依存的にシグナルの直線性が保たれる濃度範囲を確立。HeLaライセートを0.01から1mg/mLまで滴定し、Total Protein Detection Module (DM-TP01)でタンパク質含有量を検出した。Compass for Simple Westernのグラフビュー (A) とHeLaライセートの総タンパク質のピーク面積の平均 (B)。線形回帰分析は、このライセートのアッセイの線形範囲が0.01～0.2mg/mLであることを示している ( $R^2 = 0.9922$ ) (C)。

**Range**のチェックを外し、最適な単一の露光時間を手入力します (図6)。

- ・ シグナル減衰を示す抗体を代えるために代替一次抗体を探します。
  - **定量のヒント:** 代わりに抗体のシグナルが、使用するライセート濃度で濃度依存的にシグナルの直線性の範囲にあることを確認するために、フォローアップの検証測定をお勧めします。

## 総タンパク質でイムノアッセイ

RePlexを使用すると、Total Protein Detection Module (P/N DM-TP01)の化学発光総タンパク質アッセイをイムノアッセイと組み合わせて、総タンパク質シグナルでノーマライズすることができます。総タンパク質アッセイはRePlexアッセイのプローブ2で実行され、0.005～0.2mg/mLのライセートタンパク質濃度で最適に機能します。この濃度範囲でより良い総タンパク質アッセイの直線性を得ることができます。図8は、線形回帰分析により、HeLaライセートの総タンパク質シグナルの線形範囲は0.01～0.2 mg/mLであることを示してい



## RePlexメソッド開発ガイド

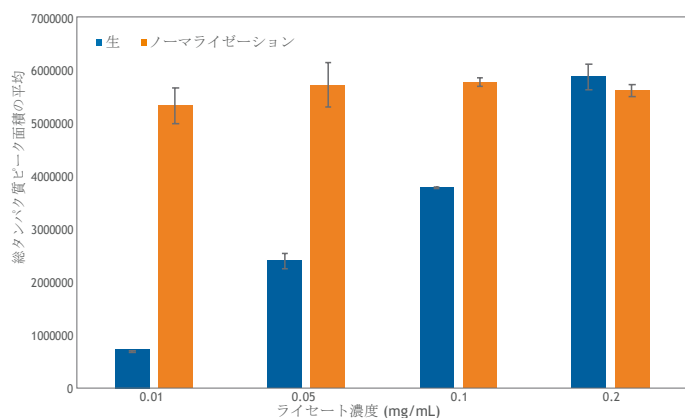


図9. RePlexを使用したタンパク質のノーマライゼーションでは、HeLaライセートの濃度が増加しても、同等の14-3-3シグナルを示す。HeLaライセート (0.01~0.2 mg/mL) をサイズで分離し、プローブ1では14-3-3抗体でプローブ後、プローブ2で総タンパク質アッセイを行った。14-3-3の発現をノーマライゼーション前 (青い棒) 後 (オレンジの棒) のピーク面積で示している。

ます ( $R^2=0.9922$ )。ライセート濃度とシグナルが直線範囲に収まるような抗体とライセートの最適な条件を決定したら、RePlex™アッセイで定量性のあるノーマライゼーションを行うことができます。図9は、最高濃度のライセートをノーマライゼーションの基準として、HeLaライセート内の14-3-3シグナルのノーマライゼーションの例を示しています。予想通り、ライセート濃度 (青い棒) が増加するにつれて、14-3-3シグナル (平均ピーク面積) も増加しています。14-3-3シグナルをRePlexアッセイで得た総タンパク質面積でノーマライゼーションすると、すべてのライセート濃度で同様のピーク面積を得ることができました (オレンジ色の棒)。

タンパク質のノーマライゼーションにTotal Protein Detection ModuleでRePlexアッセイを行う場合、次のこともお勧めします:

1. 標的タンパク質のシグナルはシグナルの減衰を示していない(図5参照)。
2. イムノアッセイは、アッセイの線形範囲にあり、標的タンパク質のシグナルは、アッセイプレートにロードしたサンプル量と直線関係を示します。
3. Biotin Labeling reagentは、プレートにロードする直前に調製します。

## 参考文献

1. The Necessity of and Strategies for Improving Confidence in the Accuracy of Western Blots. R Ghosh, J Gilda, and AV Gomes. *Expert Rev Proteomics*, 2014; 11(5): 549-560.

詳細についてはお問い合わせいただくか、以下のサイトをご覧ください:

プロテインシンプル ジャパン株式会社  
東京都日本橋室町3丁目4-7  
日本橋室町プラザビル9F  
TEL: 03-5542-1436 FAX: 03-5542-1437  
Email: info.japan@proteinsimple.com  
www.proteinsimple.jp