lifetechnologies社

リアルタイムPCR(PTS)セミナー

【セミナー資料】　　2013年5月24日（金）

- 資料の学内限定公開についてはlifetechnologies株式会社の許可を得ておりますが、資料および音声データの二次配布については固く禁止させて頂きます

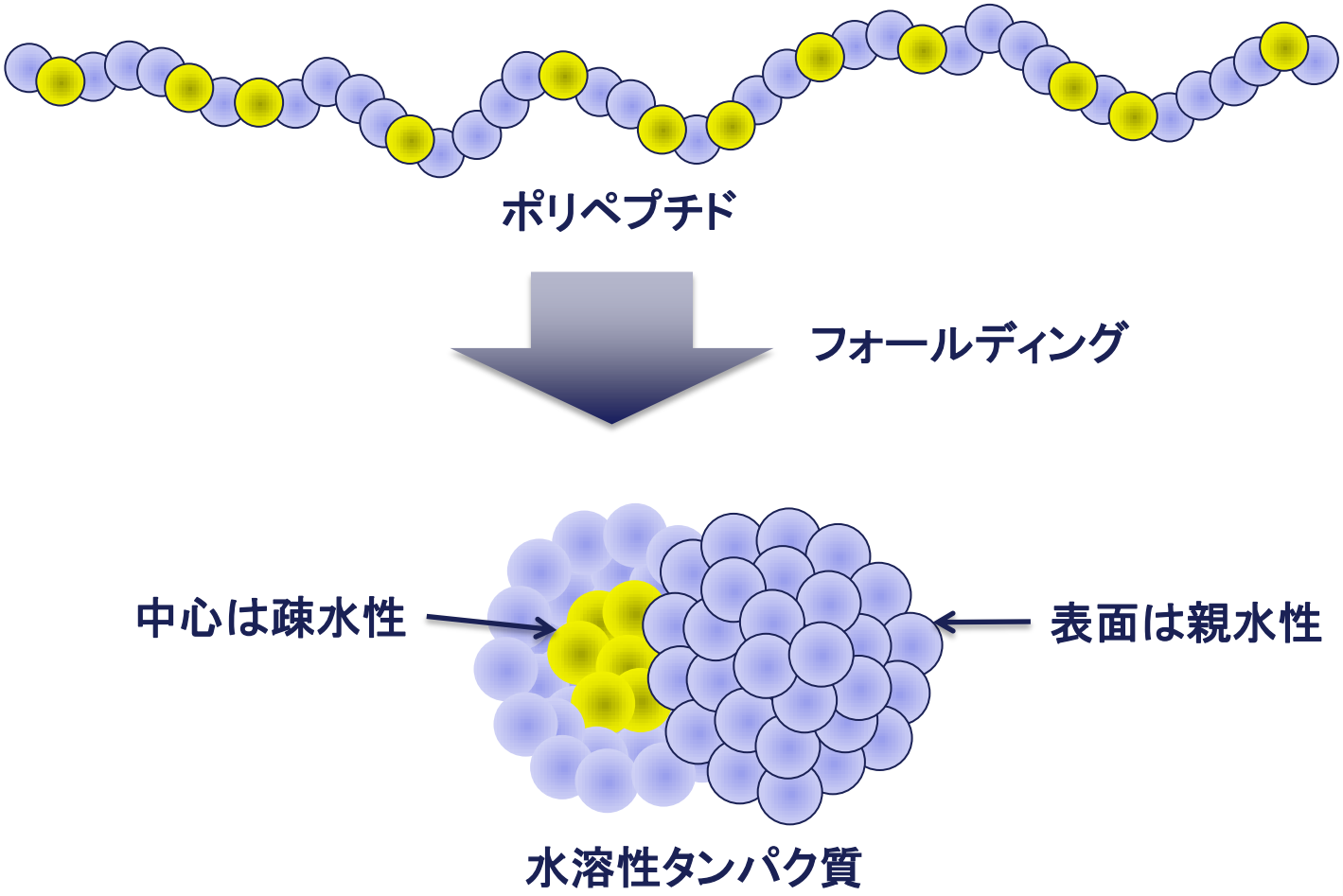
- 資料内部に記載されている消耗品価格は当時のものであり、現在は変更されている可能性がありますので、価格については各自でご確認下さい

鹿児島大学　遺伝子実験施設

リアルタイムPCR を用いた タンパク質のスクリーニング

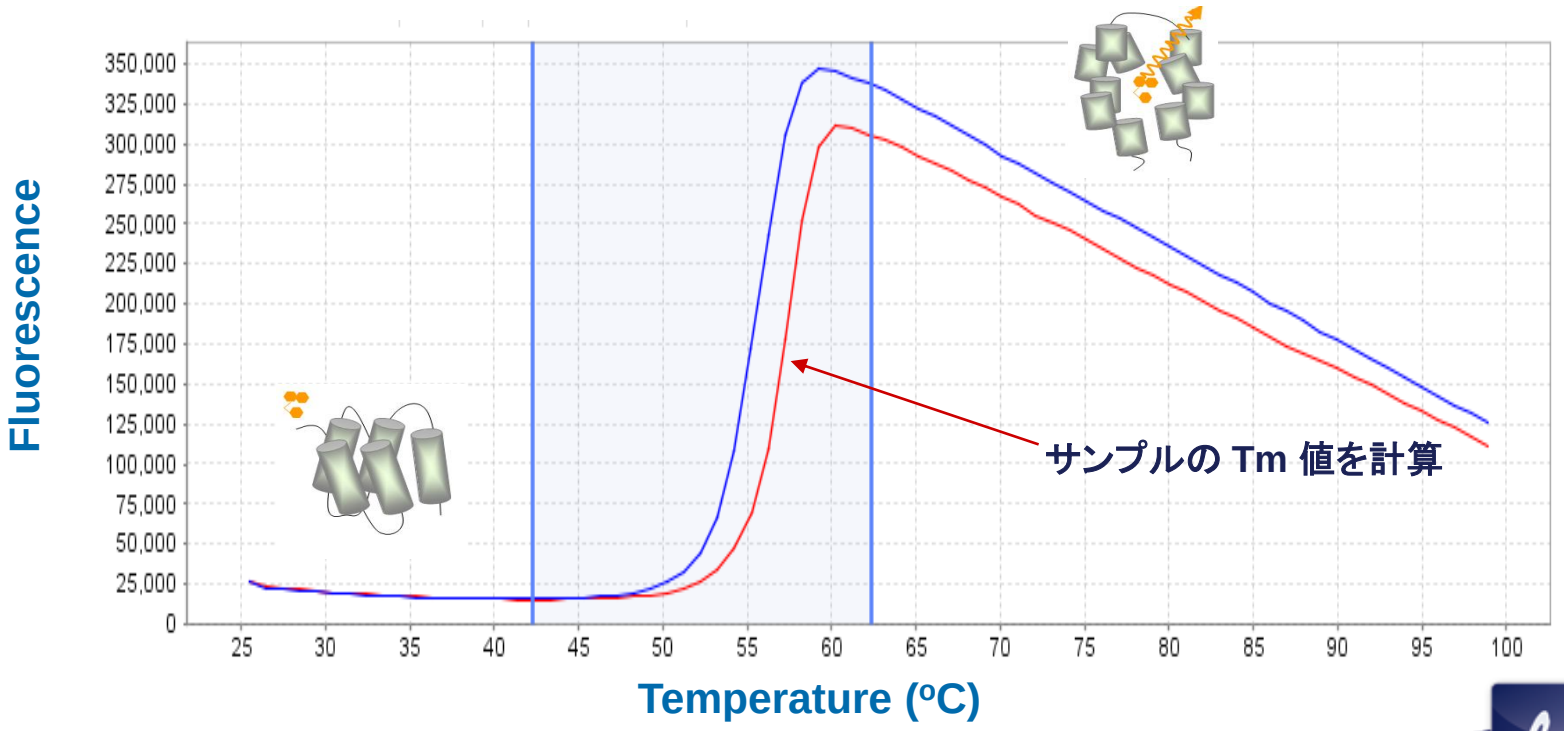
ライフテクノロジーズジャパン株式会社
テクニカルサポート

水溶性タンパク質と疎水性コア



Protein Thermal Shift™ の原理

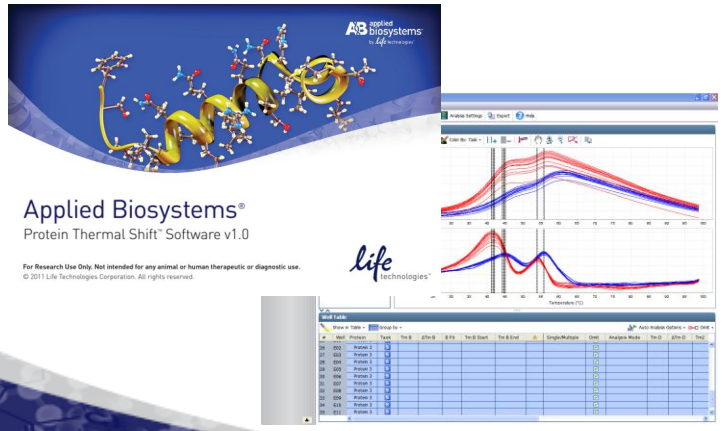
- 水溶液中のタンパク質が変性すると、タンパク質の疎水性領域が露出する
- 蛍光物資がタンパク質の疎水性領域に結合し、蛍光を発する
- 温度を上昇させながら蛍光量を測定し、タンパク質の融解曲線を作成する
- タンパク質の Tm 値はタンパク質の安定性と関連している
- タンパク質の最適バッファーの検討、Ligand のスクリーニングなどに適応可



実験手順

①リアルタイムPCRで融解実験
（蛍光データ取得）

②実験ファイルをインポートして解析



1000X の Dye を希釈し
8X の溶液を調整

反応液調整例

Component	Volume
Protein Thermal Shift™ Buffer	5.0 µL
Water + 2.0 µL Protein Thermal Shift™ Control Protein + Protein Thermal Shift™ Control Ligand (0 mM, 0.1 mM, or 1 mM final concentration)	12.5 µL
Diluted Protein Thermal Shift™ Dye (8X)	2.5 µL
Total volume for each control reaction	**20.0 µL**

タンパク質量（0.05～5ug / well）
1ug / well が標準的

Experiment property

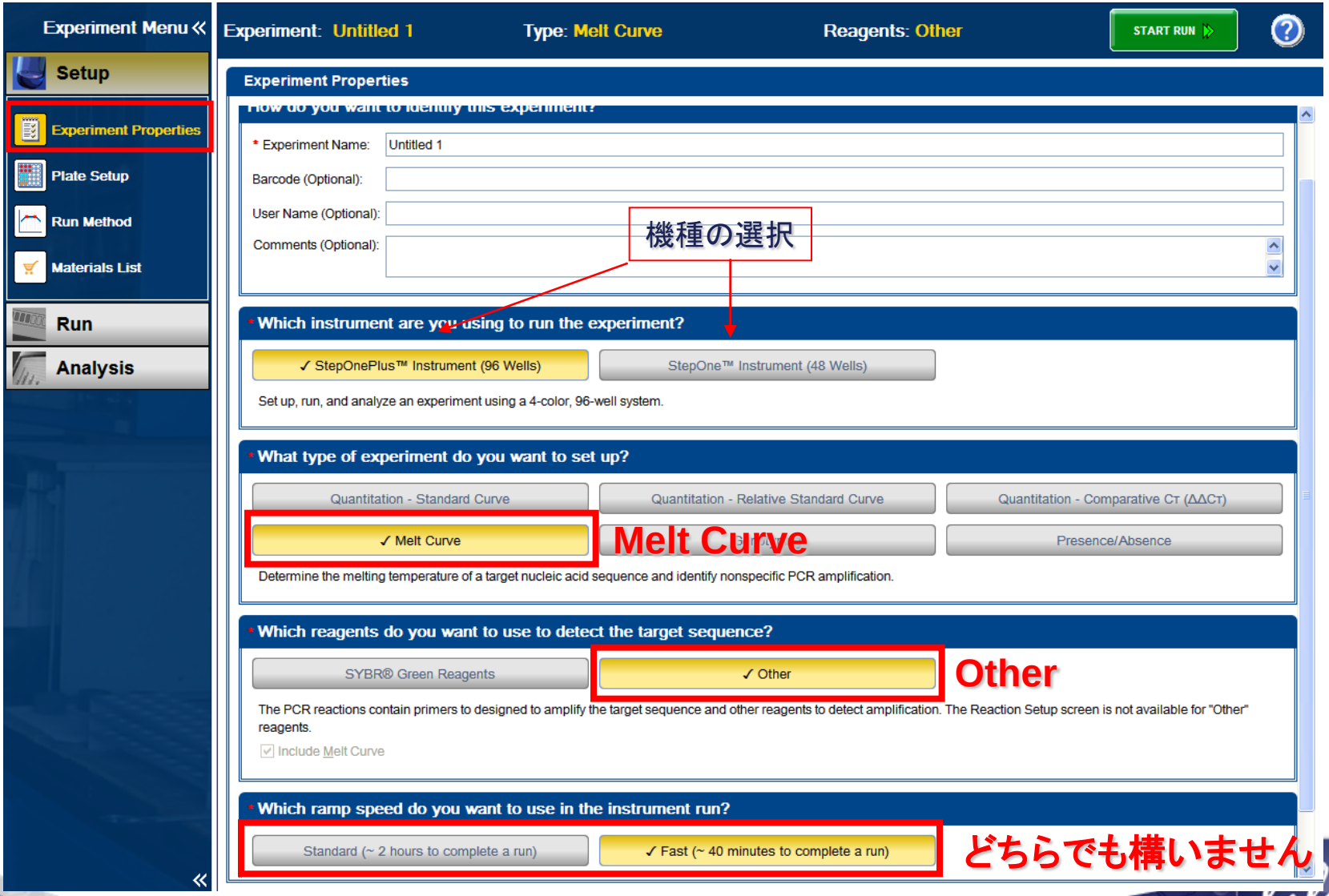


Plate Setup (Define Targets and Samples)

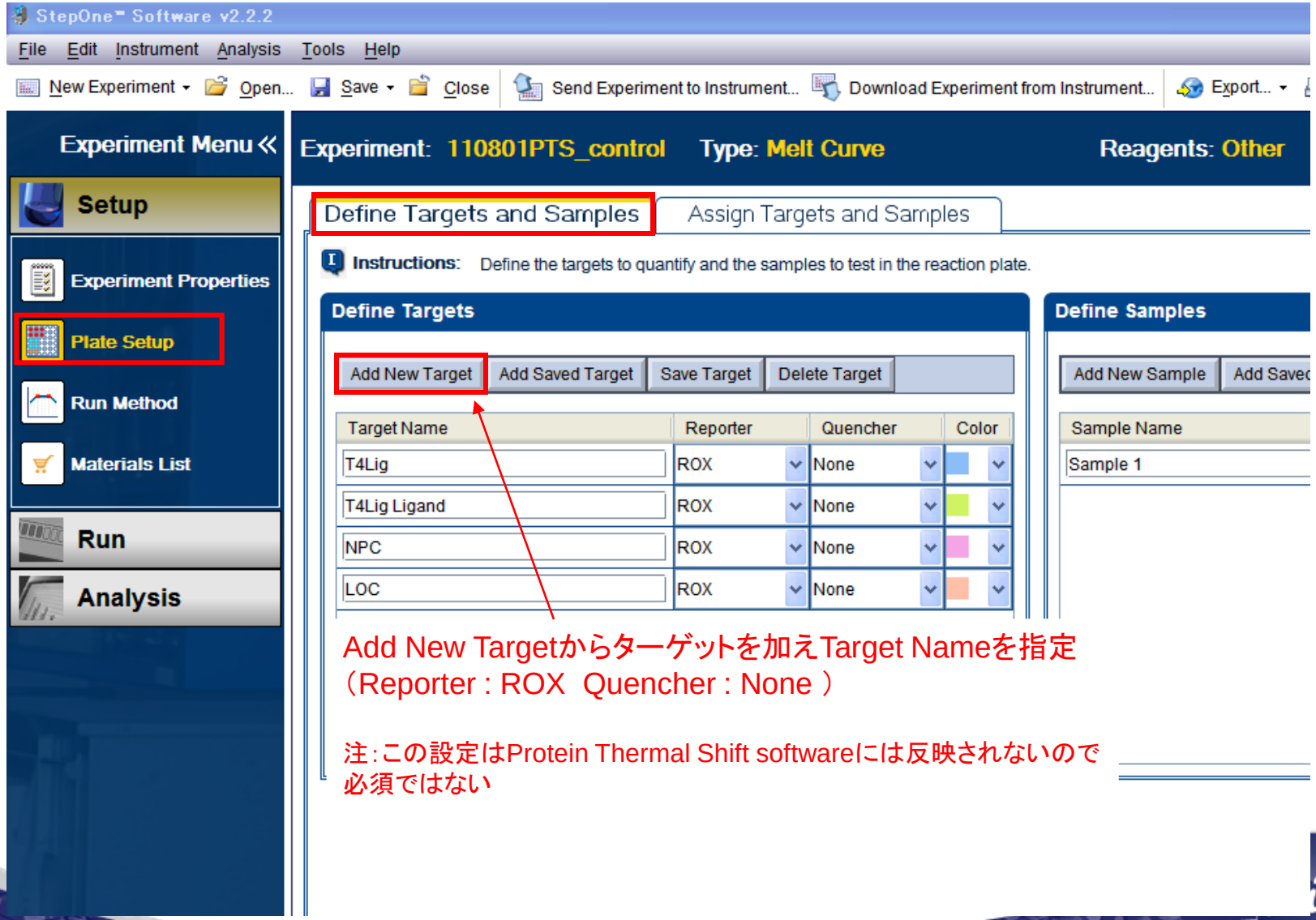
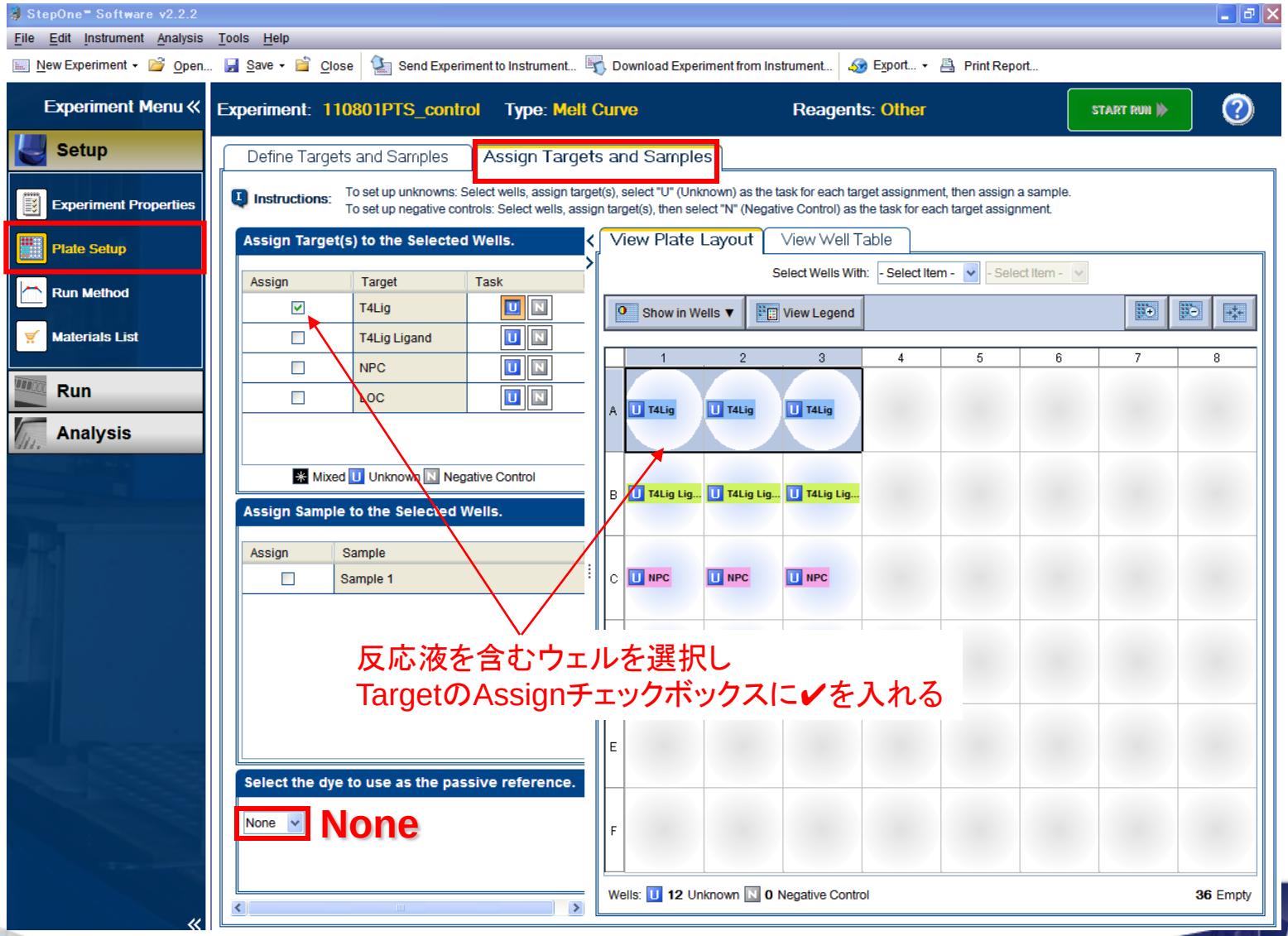
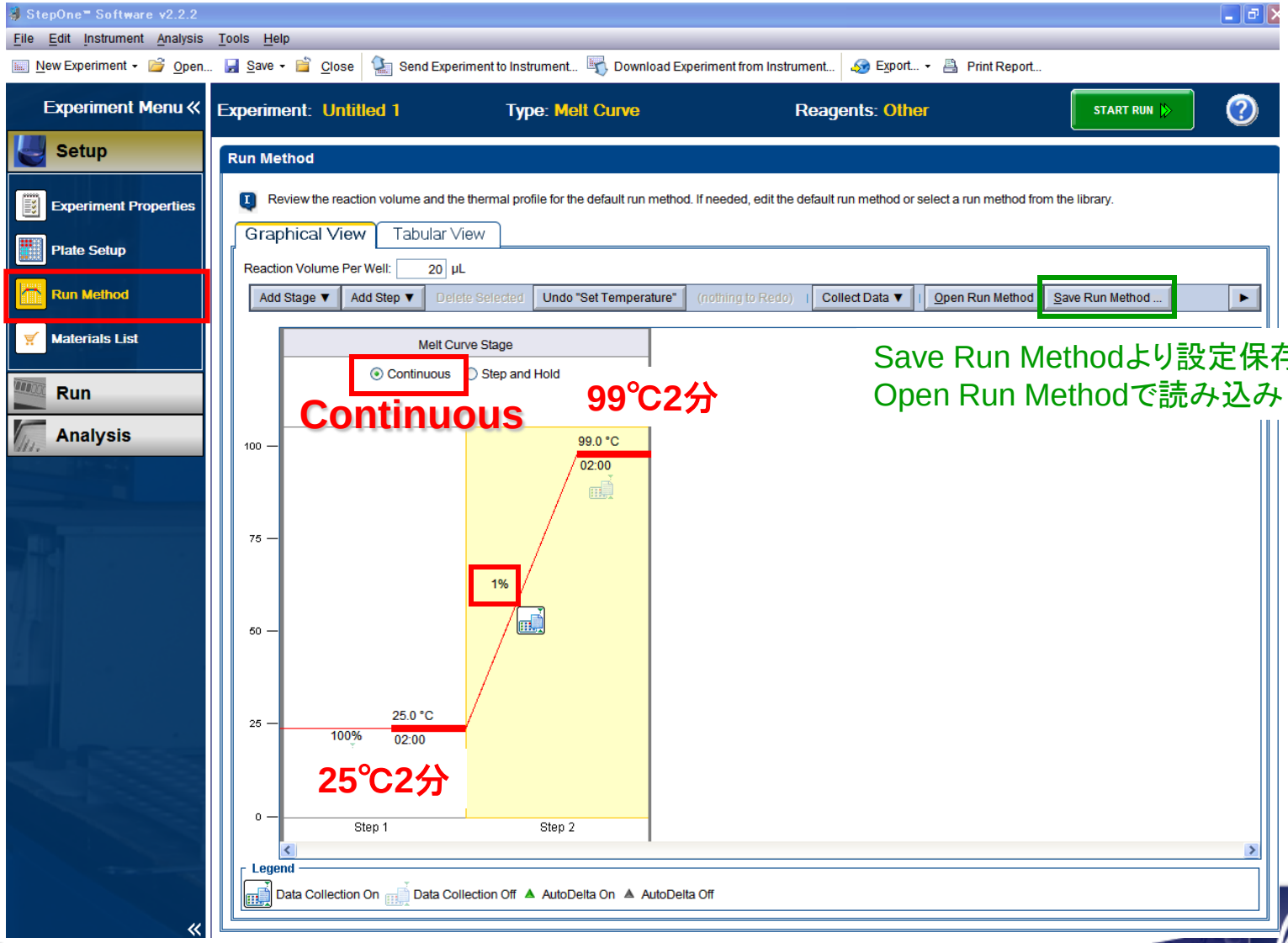


Plate Setup (Assign Targets and Samples)

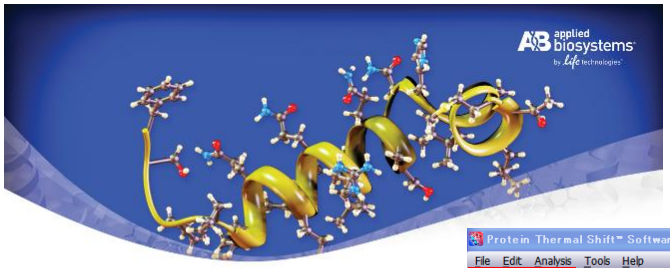


Run Method

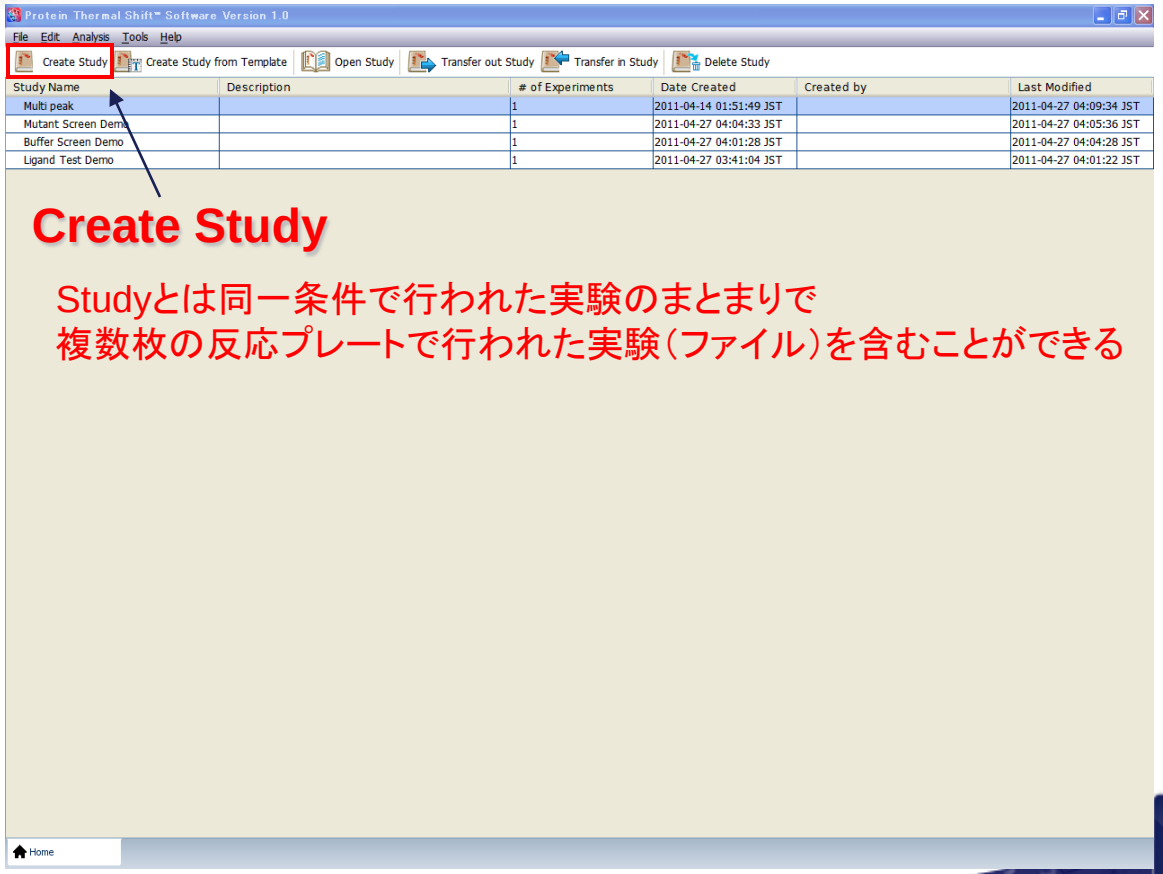


Save Run Methodより設定保存可能
Open Run Methodで読み込み

Protein Thermal Shift™ Software起動

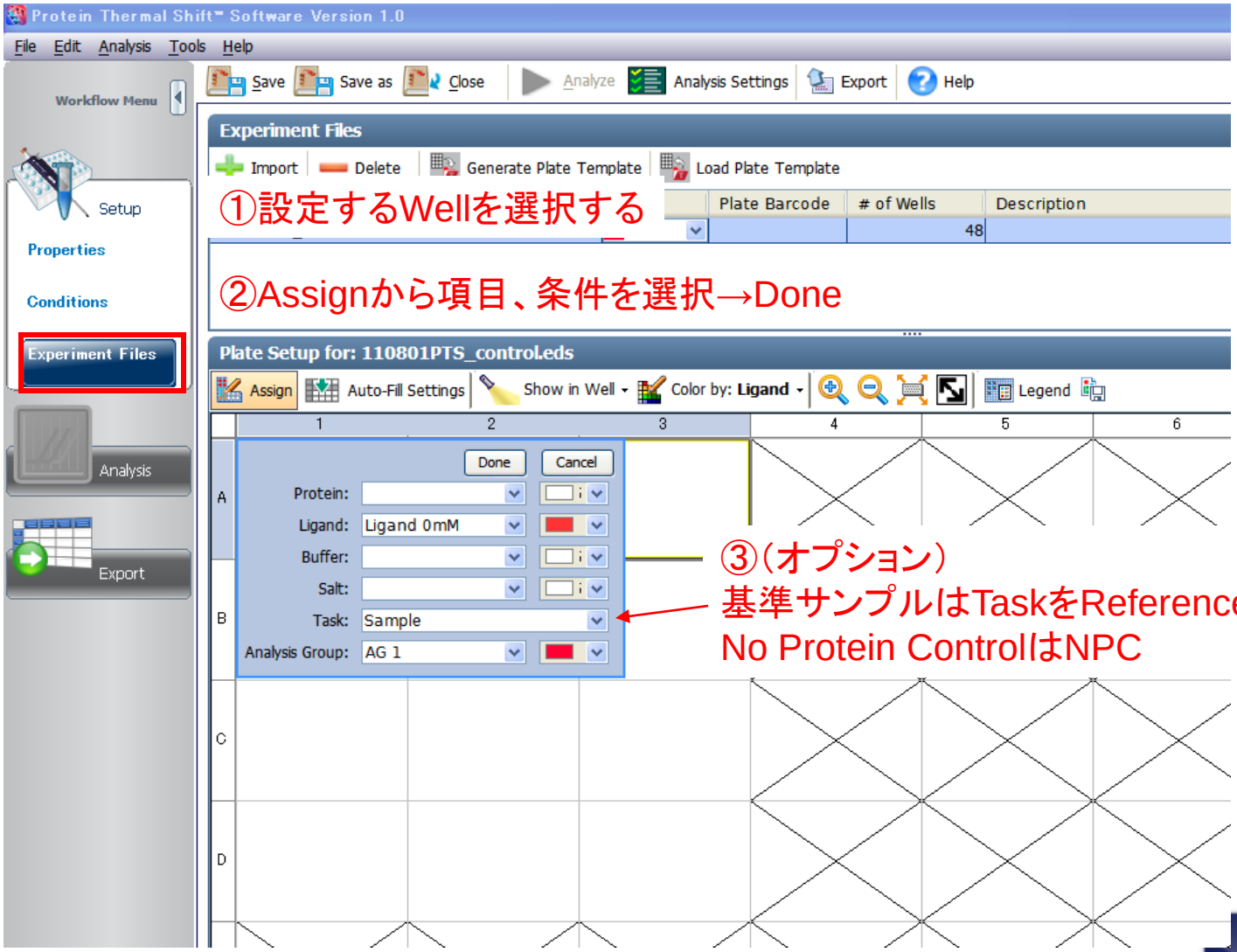


新規Studyの作成

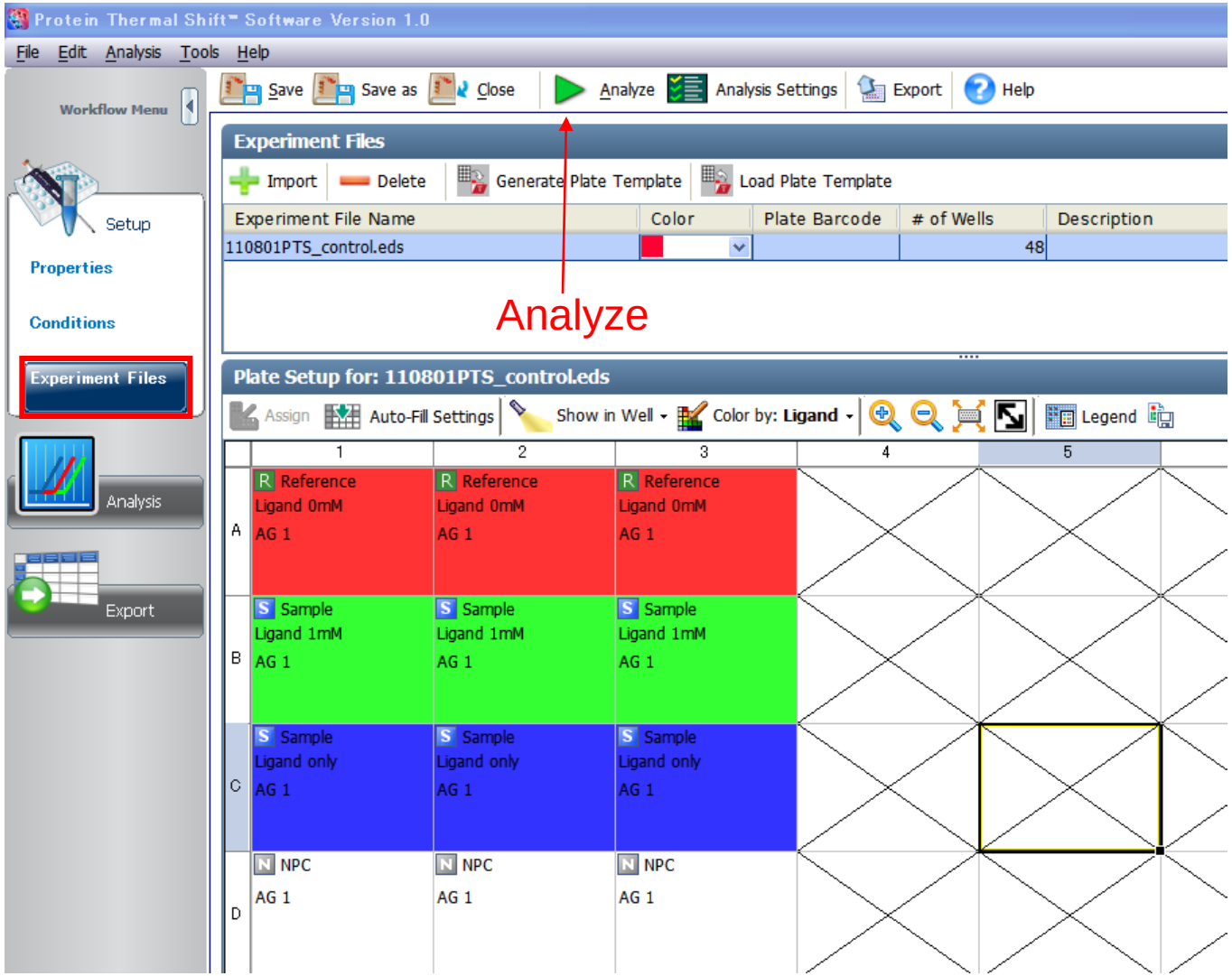


Studyとは同一条件で行われた実験のまとまりで
複数枚の反応プレートで行われた実験（ファイル）を含むことができる

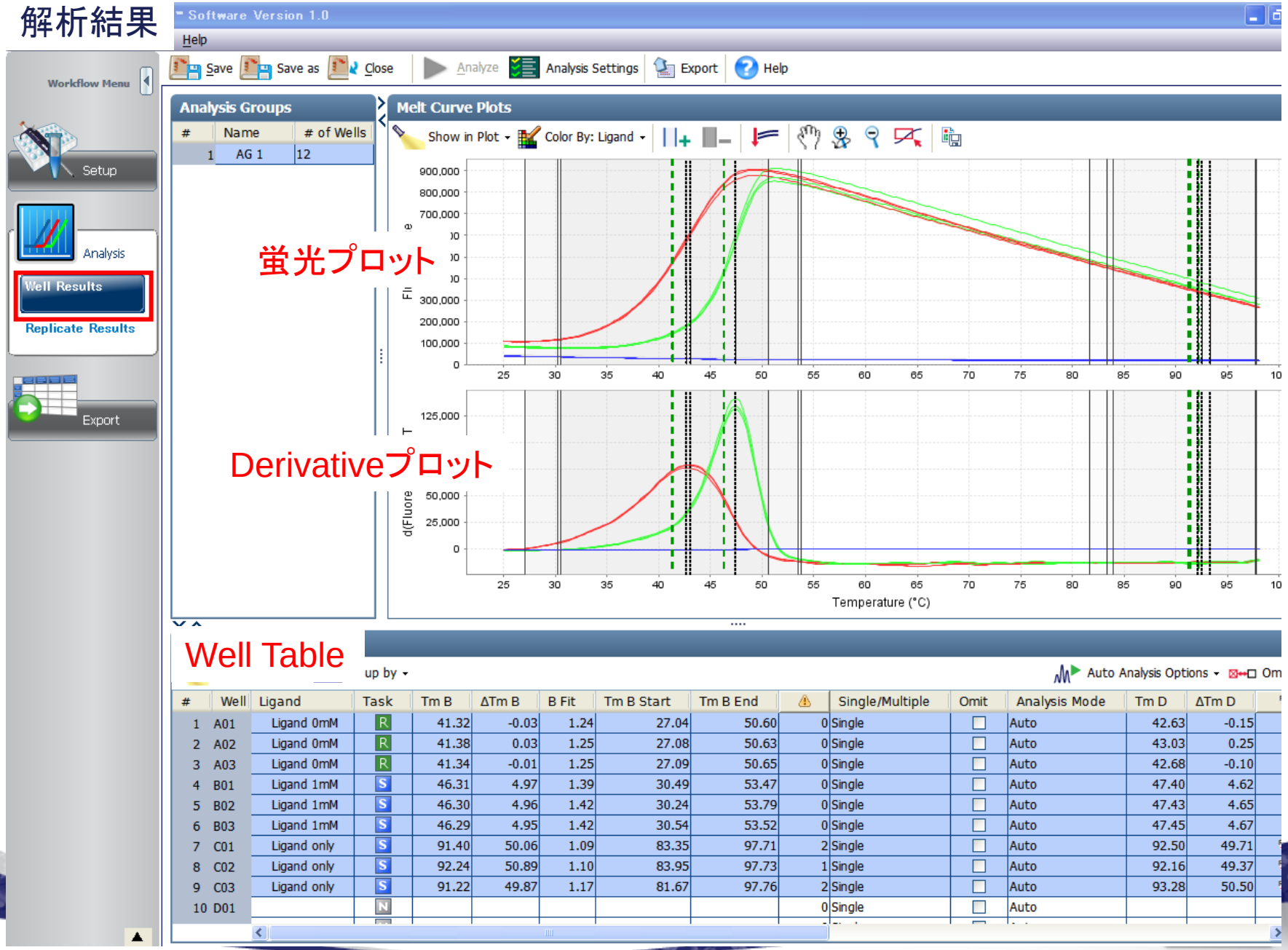
各ウェルの設定


Protein Thermal Shift™ Software Version 1.0
File Edit Analysis Tools Help
Workflow Menu
Save Save as Close Analyze Analysis Settings Export Help
Setup
Properties
Conditions
Experiment Files
Analysis
Export
Experiment Files
Import Delete Generate Plate Template Load Plate Template
①設定するWellを選択する
Plate Barcode # of Wells Description
48
②Assignから項目、条件を選択→Done
Plate Setup for: 110801PTS_control.eds
Assign Auto-Fill Settings Show in Well Color by: Ligand Legend
1 2 3 4 5 6
A
B
C
D
Done Cancel
Protein:
Ligand: Ligand 0mM
Buffer:
Salt:
Task: Sample
Analysis Group: AG 1
③（オプション）
基準サンプルはTaskをReference
No Protein ControlはNPC

解析

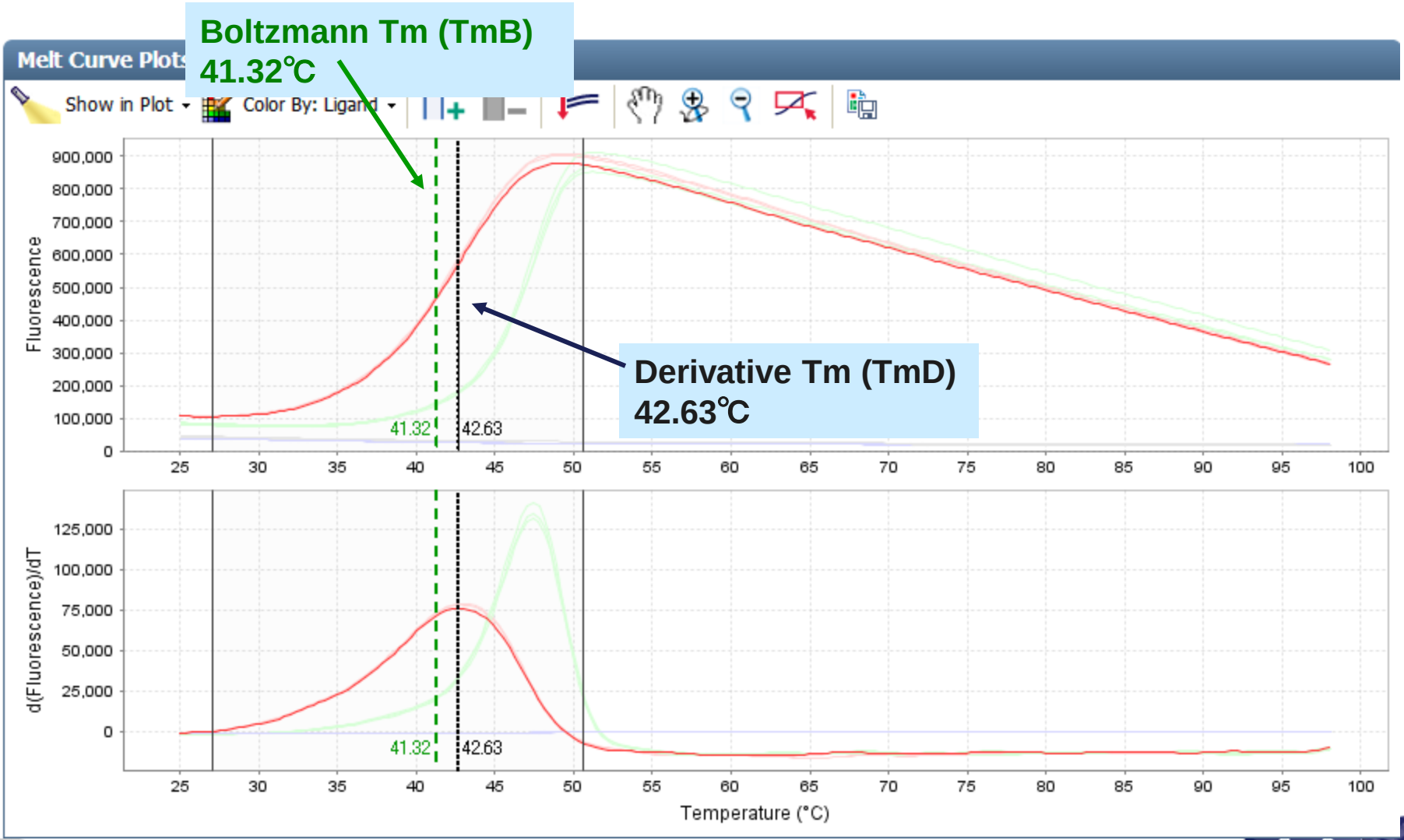

Protein Thermal Shift™ Software Version 1.0
File Edit Analysis Tools Help
Workflow Menu
Save Save as Close Analyze Analysis Settings Export Help
Setup
Properties
Conditions
Experiment Files
Analysis
Export
Experiment Files
Import Delete Generate Plate Template Load Plate Template
Experiment File Name Color Plate Barcode # of Wells Description
110801PTS_control.eds 48
Analyze
Plate Setup for: 110801PTS_control.eds
Assign Auto-Fill Settings Show in Well Color by: Ligand Legend
1 2 3 4 5
A
R Reference Ligand 0mM AG 1
R Reference Ligand 0mM AG 1
R Reference Ligand 0mM AG 1
B
S Sample Ligand 1mM AG 1
S Sample Ligand 1mM AG 1
S Sample Ligand 1mM AG 1
C
S Sample Ligand only AG 1
S Sample Ligand only AG 1
S Sample Ligand only AG 1
D
N NPC AG 1
N NPC AG 1
N NPC AG 1

解析結果



#	Well	Ligand	Task	Tm B	ΔTm B	B Fit	Tm B Start	Tm B End	⚠	Single/Multiple	Omit	Analysis Mode	Tm D	ΔTm D
1	A01	Ligand 0mM	R	41.32	-0.03	1.24	27.04	50.60	0	Single	☐	Auto	42.63	-0.15
2	A02	Ligand 0mM	R	41.38	0.03	1.25	27.08	50.63	0	Single	☐	Auto	43.03	0.25
3	A03	Ligand 0mM	R	41.34	-0.01	1.25	27.09	50.65	0	Single	☐	Auto	42.68	-0.10
4	B01	Ligand 1mM	S	46.31	4.97	1.39	30.49	53.47	0	Single	☐	Auto	47.40	4.62
5	B02	Ligand 1mM	S	46.30	4.96	1.42	30.24	53.79	0	Single	☐	Auto	47.43	4.65
6	B03	Ligand 1mM	S	46.29	4.95	1.42	30.54	53.52	0	Single	☐	Auto	47.45	4.67
7	C01	Ligand only	S	91.40	50.06	1.09	83.35	97.71	2	Single	☐	Auto	92.50	49.71
8	C02	Ligand only	S	92.24	50.89	1.10	83.95	97.73	1	Single	☐	Auto	92.16	49.37
9	C03	Ligand only	S	91.22	49.87	1.17	81.67	97.76	2	Single	☐	Auto	93.28	50.50
10	D01		N						0	Single	☐	Auto		

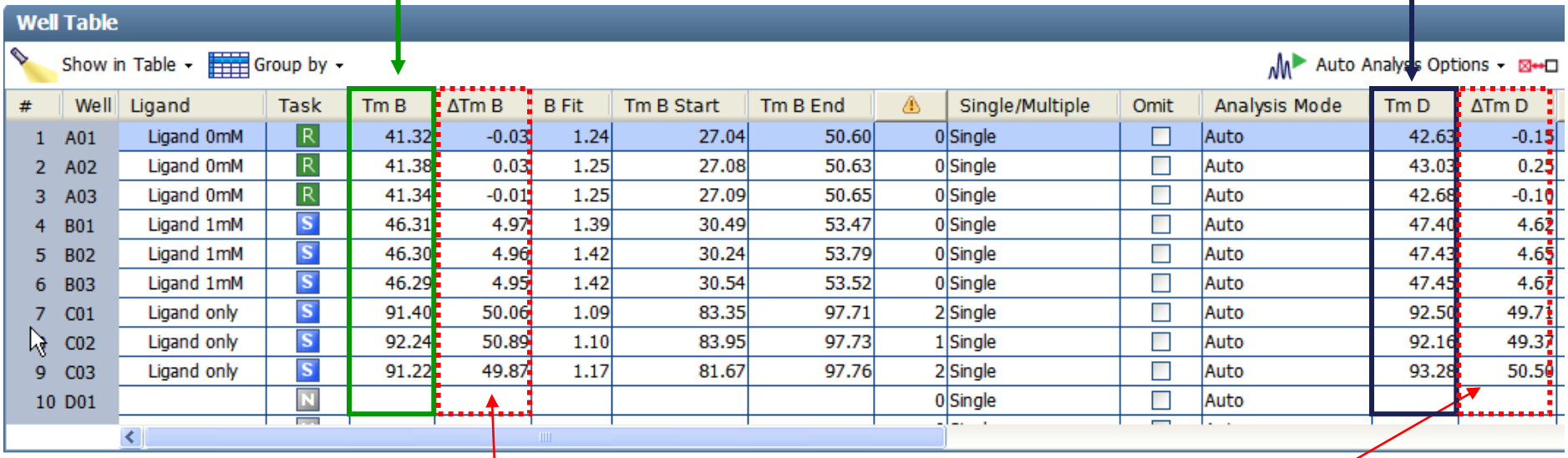
解析結果


Boltzmann Tm (TmB)
41.32℃
Melt Curve Plots
Show in Plot
Color By: Ligand
Fluorescence
900,000
800,000
700,000
600,000
500,000
400,000
300,000
200,000
100,000
0
41.32
42.63
Derivative Tm (TmD)
42.63℃
d(Fluorescence)/dT
125,000
100,000
75,000
50,000
25,000
0
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
Temperature (°C)

解析結果

Boltzmann Tm (TmB)
シングルピーク用

Derivative Tm (TmD)
マルチプルピーク用



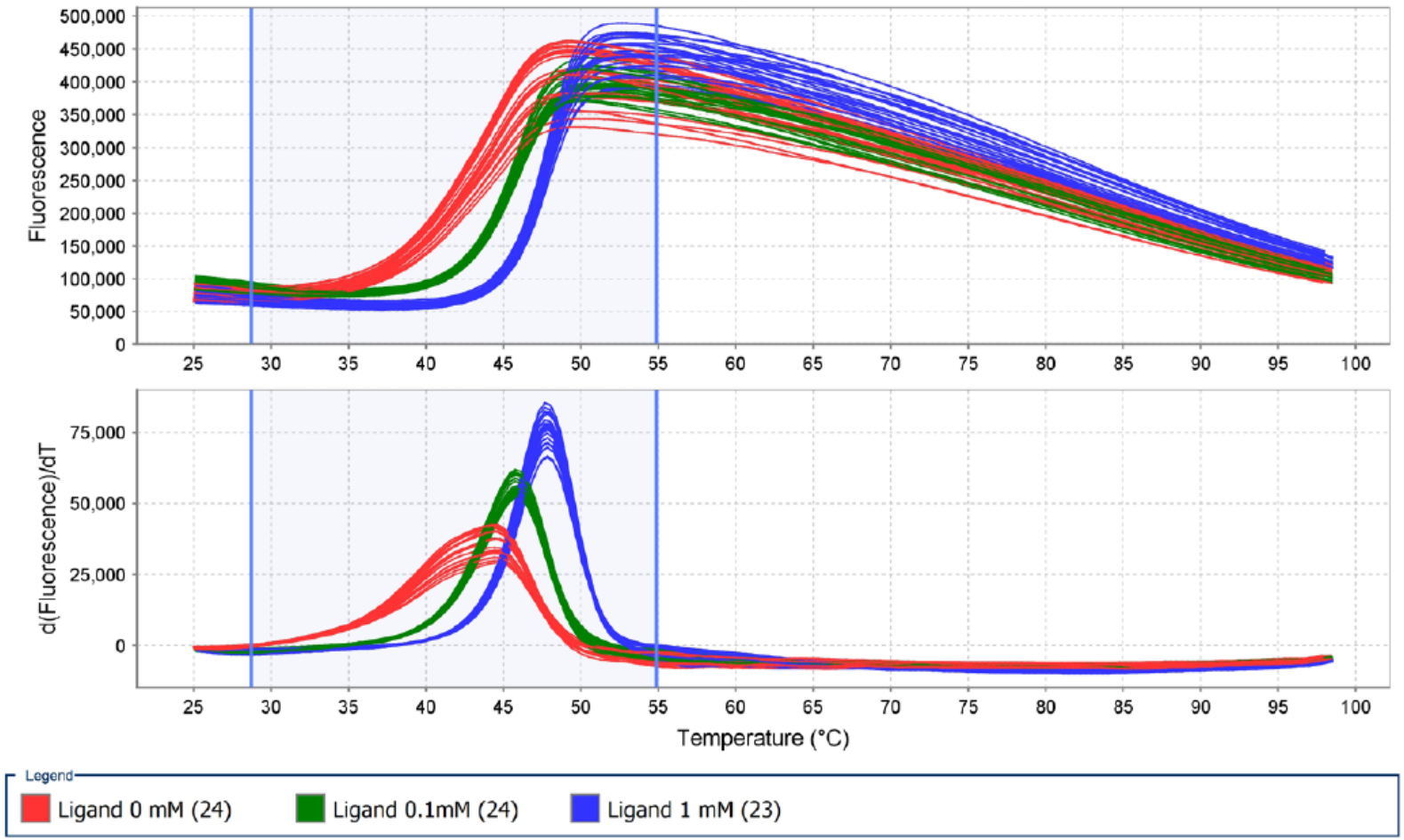
Well Table

Show in Table ▾ Group by ▾ Auto Analysis Options ▾

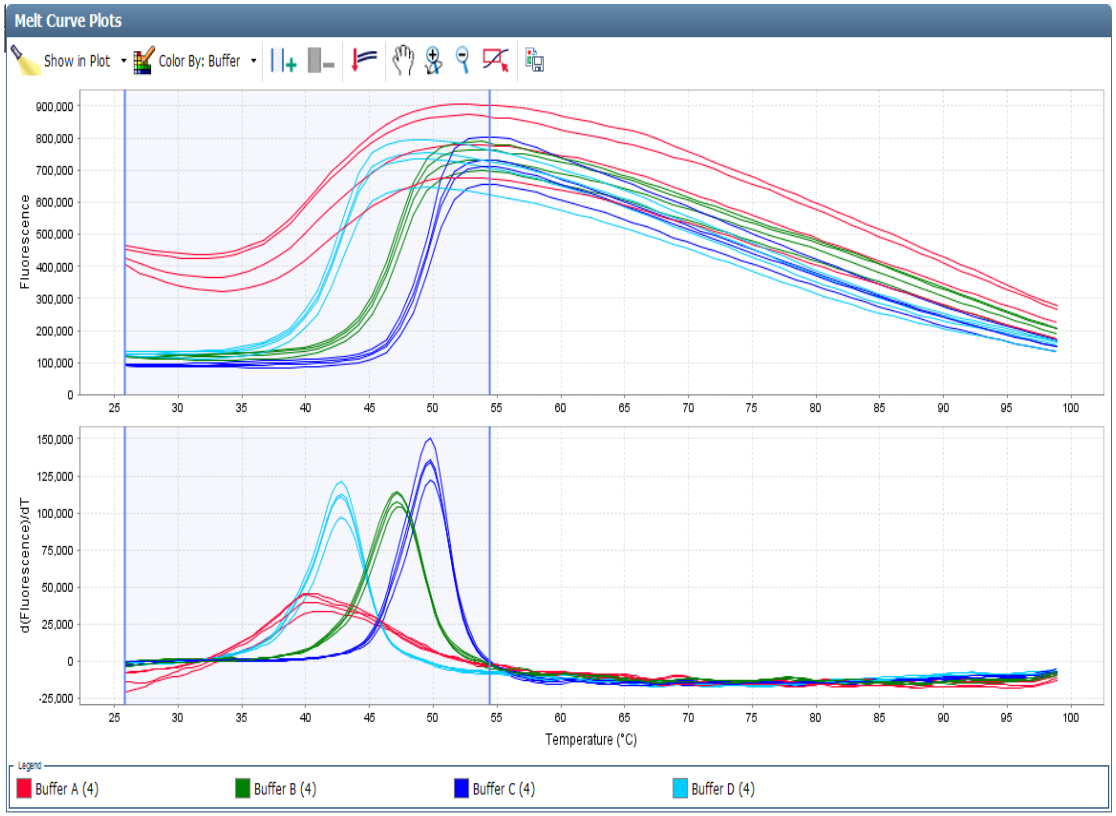
#	Well	Ligand	Task	Tm B	ΔTm B	B Fit	Tm B Start	Tm B End	⚠	Single/Multiple	Omit	Analysis Mode	Tm D	ΔTm D
1	A01	Ligand 0mM	R	41.32	-0.03	1.24	27.04	50.60	0	Single	☐	Auto	42.63	-0.15
2	A02	Ligand 0mM	R	41.38	0.03	1.25	27.08	50.63	0	Single	☐	Auto	43.03	0.25
3	A03	Ligand 0mM	R	41.34	-0.01	1.25	27.09	50.65	0	Single	☐	Auto	42.68	-0.10
4	B01	Ligand 1mM	S	46.31	4.97	1.39	30.49	53.47	0	Single	☐	Auto	47.40	4.62
5	B02	Ligand 1mM	S	46.30	4.96	1.42	30.24	53.79	0	Single	☐	Auto	47.43	4.65
6	B03	Ligand 1mM	S	46.29	4.95	1.42	30.54	53.52	0	Single	☐	Auto	47.45	4.67
7	C01	Ligand only	S	91.40	50.06	1.09	83.35	97.71	2	Single	☐	Auto	92.50	49.71
8	C02	Ligand only	S	92.24	50.89	1.10	83.95	97.73	1	Single	☐	Auto	92.16	49.37
9	C03	Ligand only	S	91.22	49.87	1.17	81.67	97.76	2	Single	☐	Auto	93.28	50.50
10	D01		N						0	Single	☐	Auto		

ΔTmはReferenceサンプルとのTm差

Protein Thermal Shift™
タンパク質とリガンドの結合安定性測定

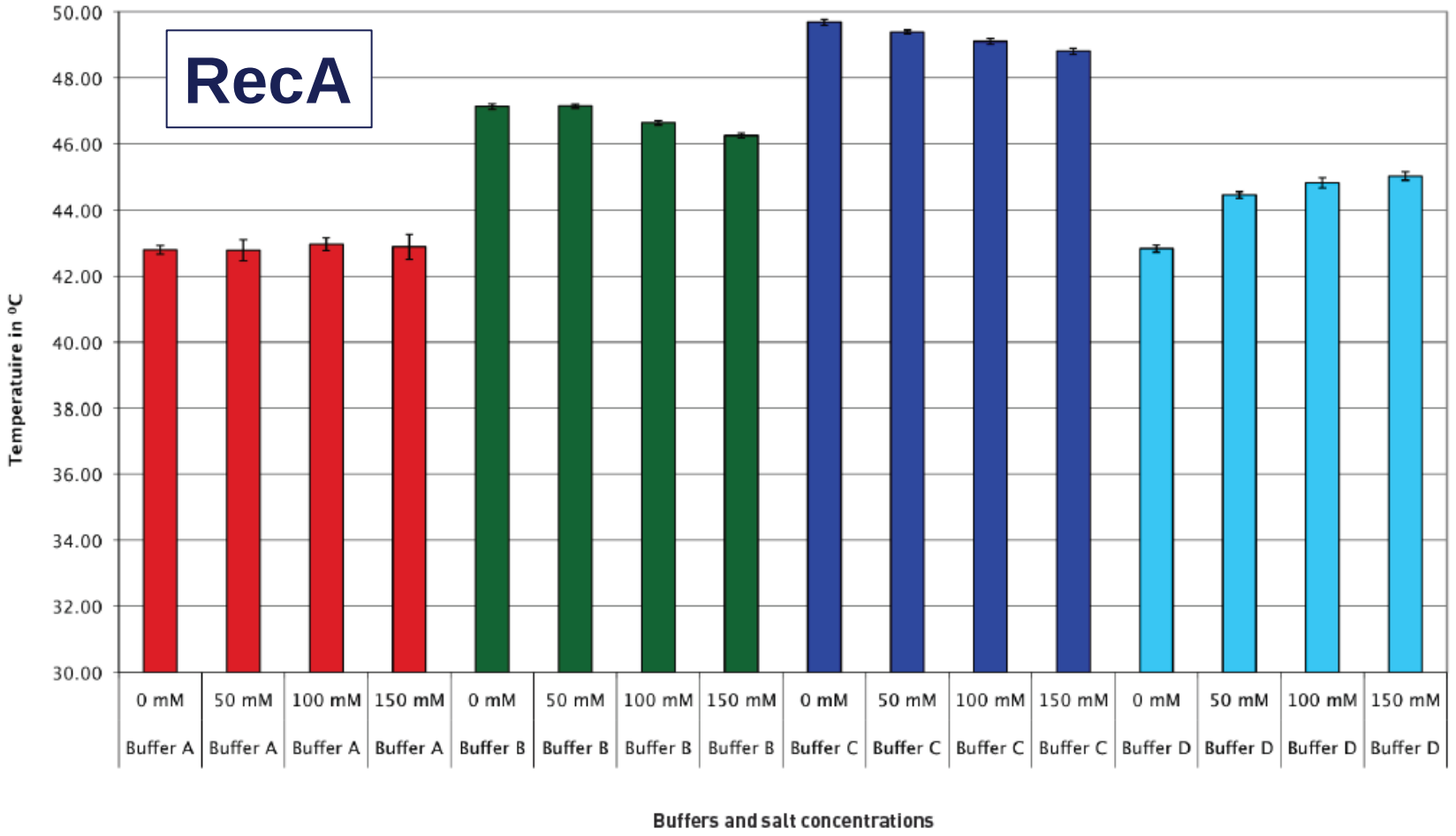


Protein Thermal Shift™
バッファー組成の違いによる安定性の測定

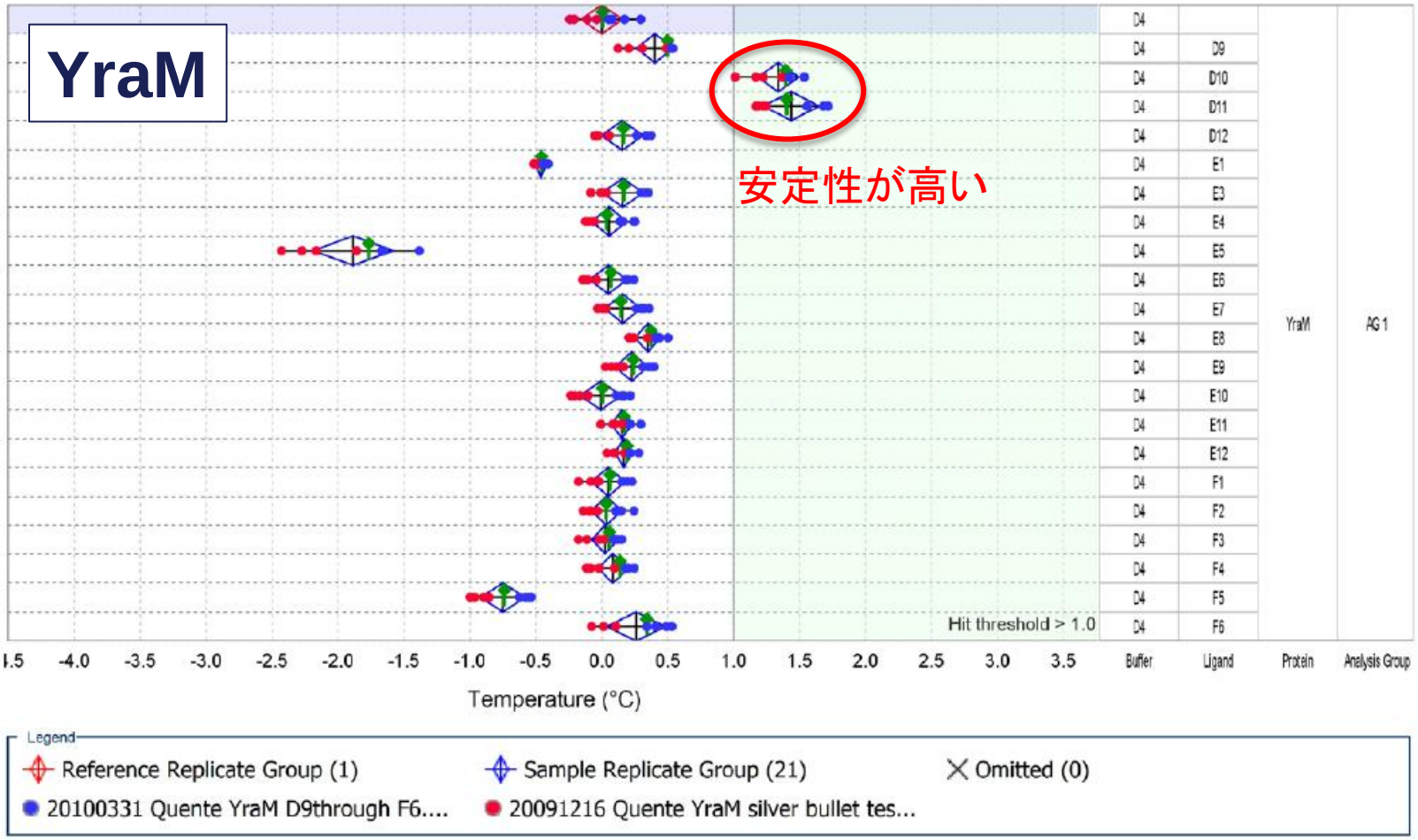


Sample	Temperature	Buffer	Line
RecA in Buffer A4	38.6	Na citrate pH 5.5 + 150 mM NaCl	
RecA in Buffer B4	45.6	KPO4 pH 6.0 + 150mM NaCl	
RecA in Buffer C4	49.0	KPO4 pH 7.0 + 150mM NaCl	
RecA in Buffer D4	45.0	Hepes. pH 7.5 + 150mM NaCl	

Protein Thermal Shift™
バッファー組成の違いによる安定性の測定

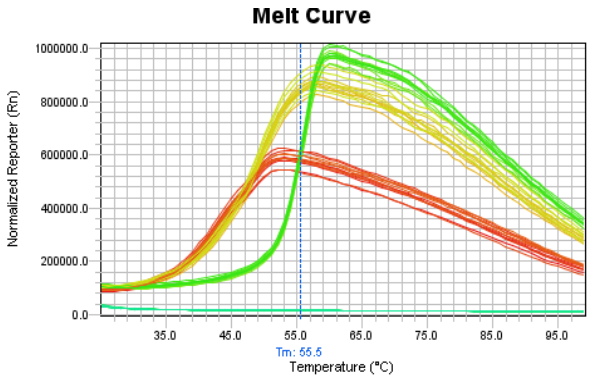


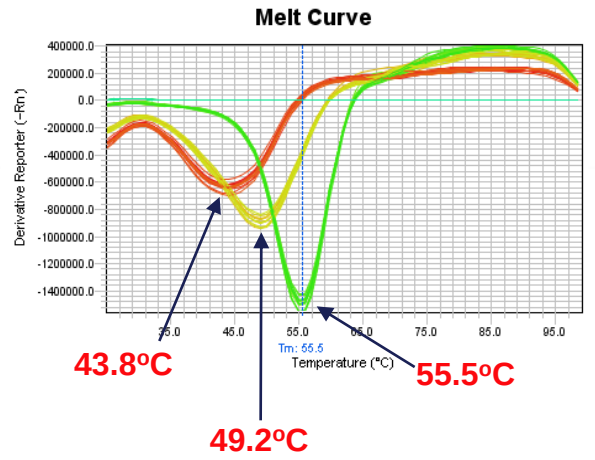
Protein Thermal Shift™
バッファー組成の違いによる安定性の測定



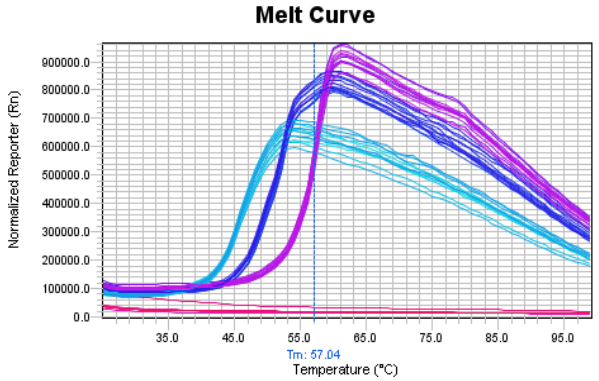
Protein Thermal Shift™
タンパク質の点変異における安定性の測定

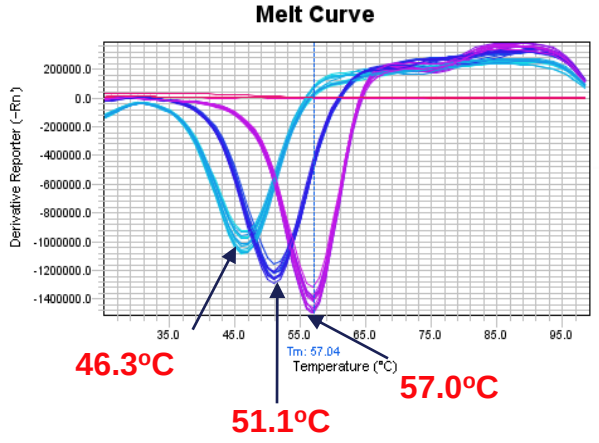
Wild type, Mut1, Mut2





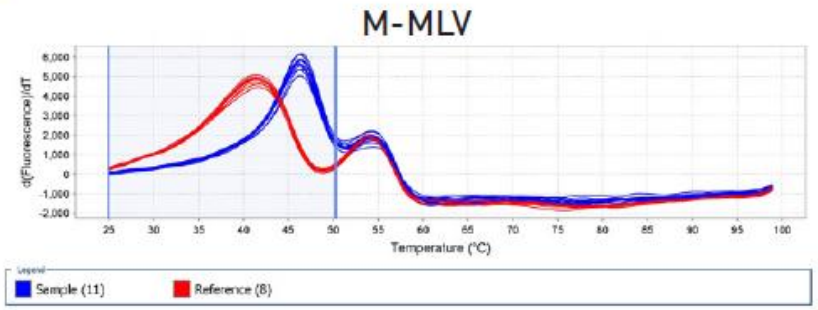
Wild type, Mut1, Mut2 + Ligand



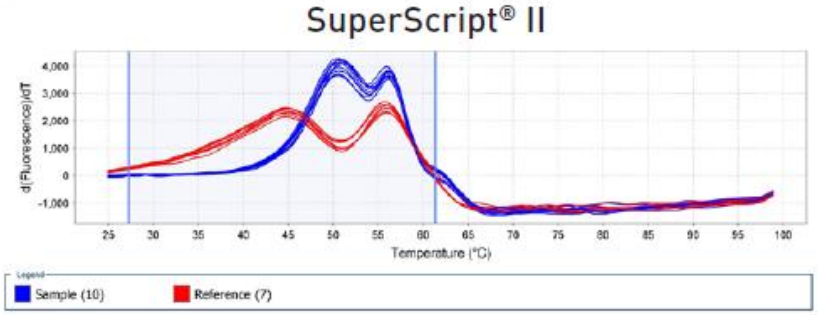


Protein Thermal Shift™
タンパク質の点変異における安定性の測定

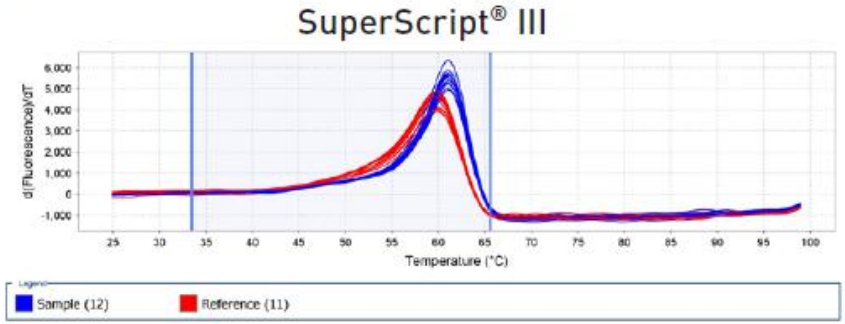
A



B



C

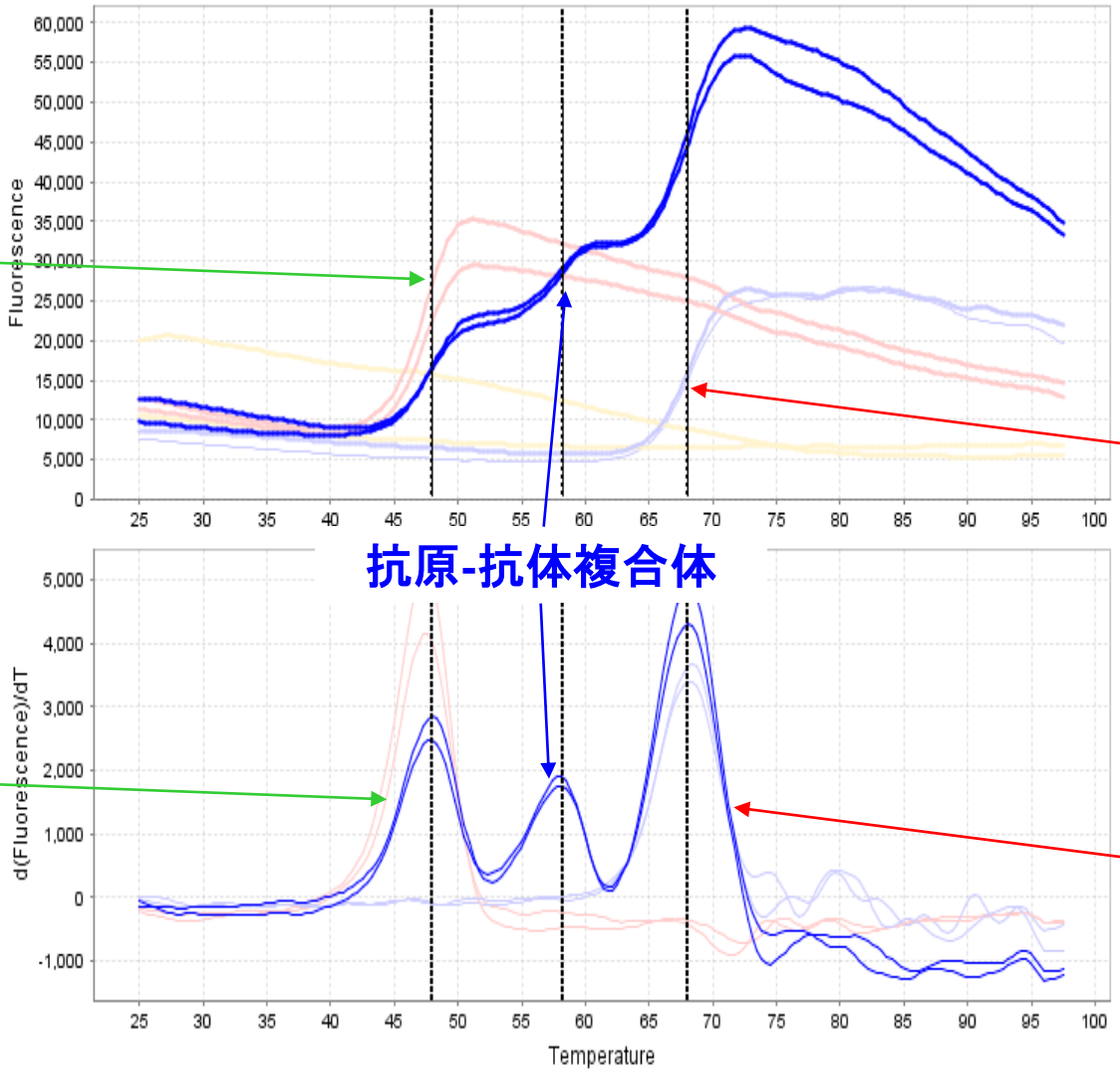


DNAなし

DNAあり

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_095306.pdf

Protein Thermal Shift™
抗原と抗体結合の検出例



Decorin（抗原）

抗原-抗体複合体

Decorin 抗体

Decorin（抗原）

Decorin 抗体

Ordering Information

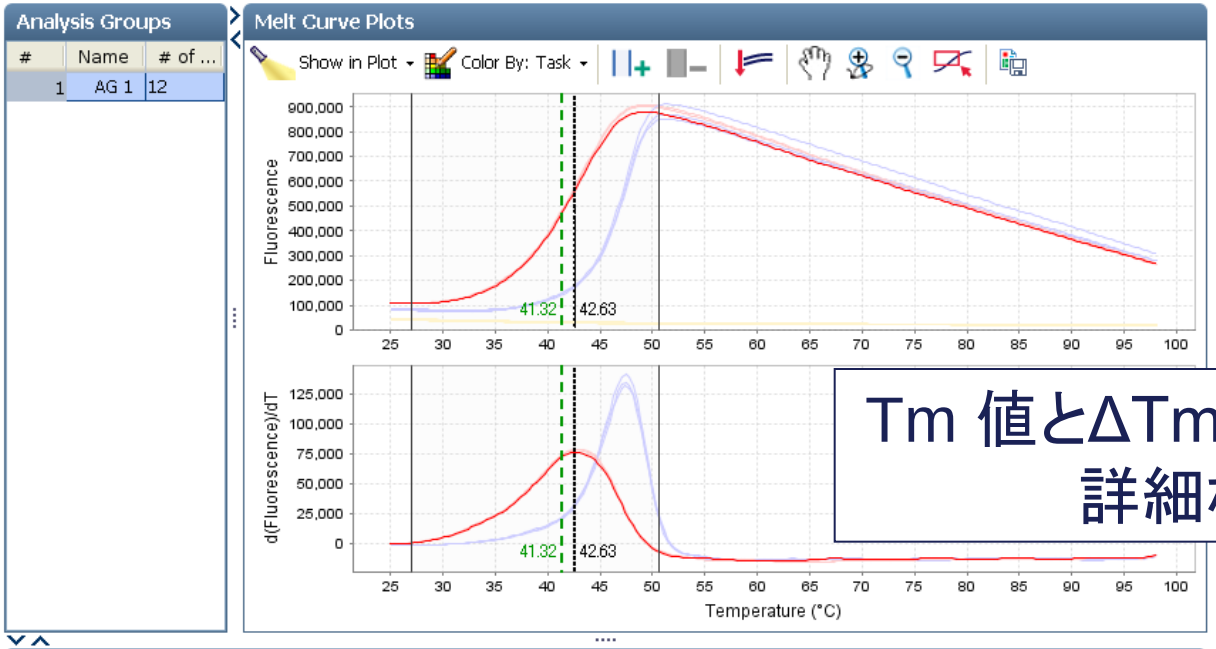
製品名	サイズ	製品番号	価格
Protein Thermal Shift™ スターターキット	2,000反応 + 100 コントロール反応	4462263	¥44,000
Protein Thermal Shift™ Dye キット	2,000反応	4461146	¥19,000
Protein Thermal Shift™ Software v1.0	10 ライセンス	4466037	¥480,000

2011年7月現在

- これから実験を開始する場合はスターターキット (4462263)がお勧め
- 継続して試薬を買い足す場合は Dye (4461146) を購入

- Tm 値はある程度であればリアルタイム PCR 付属ソフトでも対応可能
- 大規模にスクリーニングを行う場合は PTS software v1.0 があると便利

PTS software v1.0 で Tm 値を自動解析



Tm 値とΔTm 値が自動で計算され
詳細な解析が可能

Well Table

Show in Table | Group by | Auto Analysis Options | Omit

#	Well	Protein	Ligand	Task	Tm B	ΔTm B	B Fit	Tm B Start	Tm B End	⚠	Single/Multiple
1	A01	Protein 1		R	41.32	-0.03	1.24	27.04	50.60	0	Single
2	A02	Protein 1		R	41.38	0.03	1.25	27.08	50.63	0	Single
3	A03	Protein 1		R	41.34	-0.01	1.25	27.09	50.65	0	Single
4	B01	Protein 1	Ligand 1	S	46.31	4.97	1.39	30.49	53.47	0	Single
5	B02	Protein 1	Ligand 1	S	46.30	4.96	1.42	30.24	53.79	0	Single
6	B03	Protein 1	Ligand 1	S	46.29	4.95	1.42	30.54	53.52	0	Single

お試し版ダウンロード！

https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=608641

確認されている実験条件

- タンパク質量: 0.05-5 µg/well
- 蛍光色素量: 1X-20X
- pH: pH 2.0 – pH 9.0
- バッファー: HEPES、Tris、KPO_4、NaCitrate、Glycine HCl

実験の流れのご提案

1. 1 µg/well で目的タンパク質が PTS に適しているかどうか確認
2. 0.05-5 µg/well の範囲でタンパク質量を振り、最適タンパク質量を検討
3. pH、バッファー、リガンド等、条件を変えスクリーニング実験

実験上の注意点

- 全てのタンパク質に適応できるわけではない
  - タンパク質によってはデータがうまく出ないものがある
- バッファー、タンパク質はキャリアータンパク質を含まないものを使用する
  - 市販の酵素等はキャリアータンパク質として BSA などを含んでいる場合がある
- 分注時にできるだけ気泡が入らないように気をつける
- タンパク質は変性しやすいので必ず氷上で操作する