

- SulfoBiotics - Protein Redox State Monitoring Kit

Technical Manual

はじめに

タンパク質のチオール基修飾は、代表的な翻訳後修飾の一つであり、生体内のレドックス変化にตอบสนองして生じます。チオール基の翻訳後修飾によるタンパク質の機能制御を理解するためには、個々のチオール基の酸化還元状態を検出する必要があります。

-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit を用いて、タンパク質のチオール基の数を電気泳動法により可視化することが可能です。マレイミド基を有する Protein-SHifter はタンパク質のチオール基と結合し、1 分子の Protein-SHifter が結合することでラベル化されたタンパク質は分子質量約 15 kDa 増加したバンドとして分離・検出されます。

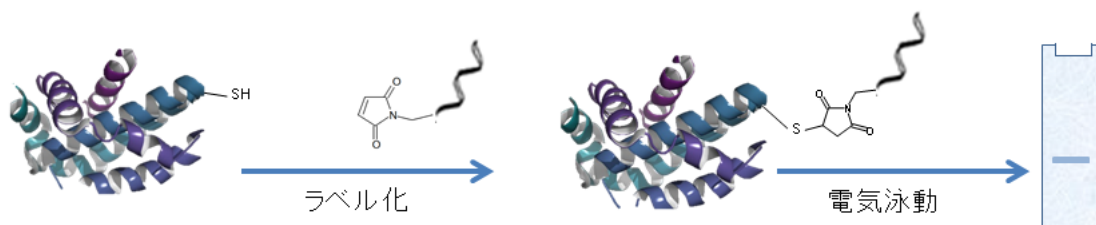


図 1 Protein-SHifter によるタンパク質チオールの修飾

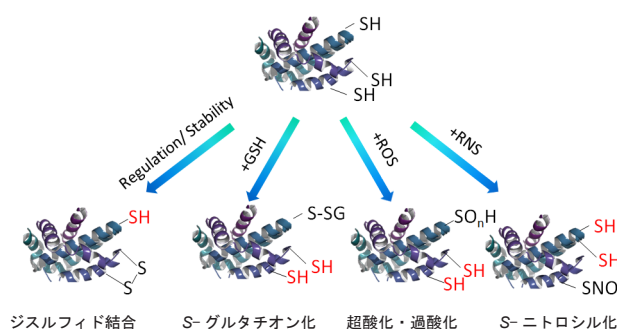


図 2 タンパク質の SH のレドックス変化

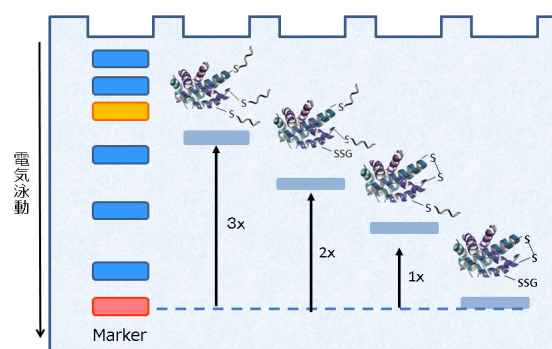


図 3 電気泳動によるタンパク質 SH 基数の可視化

タンパク質の SH 基に Protein-SHifter が結合すると、タンパク質の SH 基あたり泳動度が分子質量約 15 kDa 増加します。

キット内容

- Protein-SHifter	x 5
- Reaction Buffer A	x 1
- Reaction Buffer B	x 1

保存条件

0 - 5 °Cにて保存してください。

必要なもの
(キット以外)

- マイクロピペット (10 µl、100-200 µl)
- 電気泳動用関連試薬類 [ゲル、Loading buffer、タンパク質染色試薬 (CBB:Coomassie Brilliant Blue など)]
- インキュベーター (37 °C)
- PBS (精製タンパク質サンプル希釈用)

使用上のご注意

- ・ 輸送中の振動等により、内容物がチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がありますので、遠心してからご使用ください。
- ・ 本製品は電気泳動用に設計しております。サンプルは精製タンパク質をご使用ください。細胞ライセートなどウェスタンブロット実験に用いる場合には SB12 -SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus をご使用ください。
- ・ Reaction Buffer B は内容物が析出している場合があります。その際は、40-50°Cで加温溶解して使用してください。

使用方法

1. Protein-SHifter に Reaction Buffer A を 4 µl 加え、ピペッティングでよく混合する。
※ Protein-SHifter を Reaction Buffer A,B で溶解すると、マレイミド基の分解が進みます。溶解後はすぐにラベル化操作を行ってください。
2. 操作 1 の溶液にサンプル 2 µl を加え、ピペッティングでよく混合する。
※ サンプルのタンパク質濃度は 0.1 - 1 mg/ml、またはチオール濃度として 100 µmol/l 以下を推奨します。推奨範囲を超える場合には十分なラベル化ができない可能性があります。
※ DTNB を用いたチオール濃度の定量方法は、ホームページ (SB11 の Q&A [使用するサンプルの濃度]) をご参照ください。
3. 操作 2 の溶液に Reaction Buffer B を 4 µl 加え、ピペッティングでよく混合する。
※ Reaction Buffer B を混合することで白濁することがあります。その場合、40-50°Cで加温溶解してください。
※ 溶液が泡立った場合は、7,000 × g、1-2 分間遠心して消泡してください。
4. 37°C、30 分間反応する。
※ ラベル化したサンプルはすぐに電気泳動実験にご使用ください。
5. 操作 4 のサンプル溶液に Loading buffer を適量添加し、ゲル電気泳動に使用する。
※ Loading buffer は本キットに含まれていません。(5x) Loading buffer を使用する場合には、サンプル溶液 10 µl に対し、(5x) Loading buffer 2 µl を添加後、全量をゲルにアプライしてください。
6. ゲルをタンパク質染色試薬で染色し、タンパク質を検出する。

GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) のレドックス状態の解析

1. 1 mg/mlに調製したGAPDH (36 kDa、SH基数3)タンパク質のPBS溶液10 µlを1.5 ml マイクロチューブに入れ、100 mmol/lに調製したDTT(Dithiothreitol)水溶液を1 µl加え、よく混合した。
2. 操作1のチューブを37 °C、10分間インキュベートした。
3. 操作2の溶液全量を10 K フィルトレーションチューブに移し、7,500 x gで15分間遠心した。
4. TE Buffer [50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5)、1 mmol/l EDTA] 100 µlを操作3のチューブに加えて混合し、7,500 x gで15分遠心し、ろ液を除去した。
5. 操作4の作業をもう一度行った。
6. TE Buffer 50 µlを操作5のチューブに加え、よく混合した。(0.2 mg/ml GAPDH)
7. Reaction Buffer A 4 µlをProtein-Shifterに加え、よく混合した。
8. 操作6の溶液2 µlを操作7のチューブに加え、よく混合した。
9. Reaction Buffer B 4 µlを操作8のチューブに加え、よく混合した。
10. 操作9のチューブを37°C、30分間反応した。
11. 操作10で反応した溶液に、Loading Buffer [10 (w/v) % sodium dodecyl sulfate, 50 (v/v) % glycerol, 0.2 mol/l Tris-HCl (pH 6.8), 0.05 (w/v) % bromophenol blue]を2 µl加えよく混合した。
12. 操作11で調製した溶液全量を用いて電気泳動を行った。
13. CBBで染色し、マルチイメージャーにより画像を取得した。

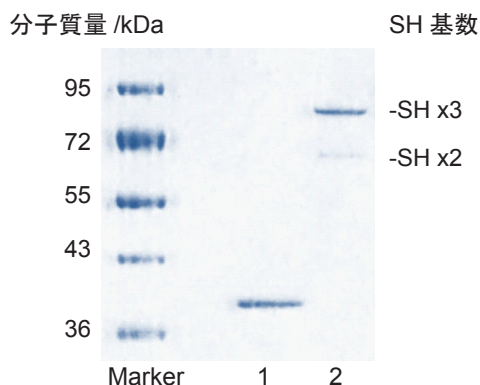


図4 GAPDHのレドックス状態の可視化

- Lane 1: GAPDH, Lane 2: Labeled GAPDH
- 15% SDS-polyacrylamide gel

- 1) Satoshi Hara, Tatsuya Nojima, Kohji Seio, Masasuke Yoshida, Toru Hisabori, "DNA-maleimide: An improved maleimide compound for electrophoresis-based titration of reactive thiols in a specific protein" *Biochim. Biophys. Acta*, **2013**, 1830(4) 3077.
- 2) Satoshi Hara, Yuki Tatenaka, Yuya Ohuchi, Toru Hisabori, "Direct determination of the redox status of cysteine residues in proteins *in vivo*", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, 456(1) 339.

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.
 30W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850 U.S.A.
 Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687
 URL: www.dojindo.com

<委託製造元>

株式会社 同仁化学研究所
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202
 Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:www.dojindo.co.jp/
 ドージン・イースト (東京) Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650