

# - SulfoBiotics - Protein S-Nitrosylation 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。S- ニトロシル化反応は、一酸化窒素(NO)によって起こる重要な翻訳後修飾であり、転写やタンパク質発現、シグナル伝達などの様々な細胞機能の制御に関与していることが明らかにされています。

-SulfoBiotics- Protein S-Nitrosylation Monitoring Kit は、タンパク質内の S- ニトロシル基をゲル電気泳動法によって解析するためのキットです。本キットには、タンパク質内遊離チオール基のブロッキング剤、S- ニトロシル基の選択的還元剤および S- ニトロシル基還元後のチオール基のラベル化剤が含まれています。タンパク質内の遊離チオール基をブロックした後、S- ニトロシル基をキット付属の還元剤によって選択的に還元します。その後、新規の高分子マレイミド試薬 Protein-SHifter Plus によってタンパク質をラベル化し、ゲル電気泳動法によって解析します。ラベル化されたタンパク質は、Protein-SHifter Plus 1 分子あたり分子質量が約 15 kDa 増加したバンドとして分離・検出されるため、S- ニトロシル基の数に応じたバンドシフトが得られます。また、Protein-SHifter Plus は光分解能を有するため、電気泳動後のゲルに UV 光を照射することによってラベル化されたタンパク質から切り離されます。そのため、ラベル化する前と同様に目的タンパク質をウェスタンブロットで検出することが可能です。

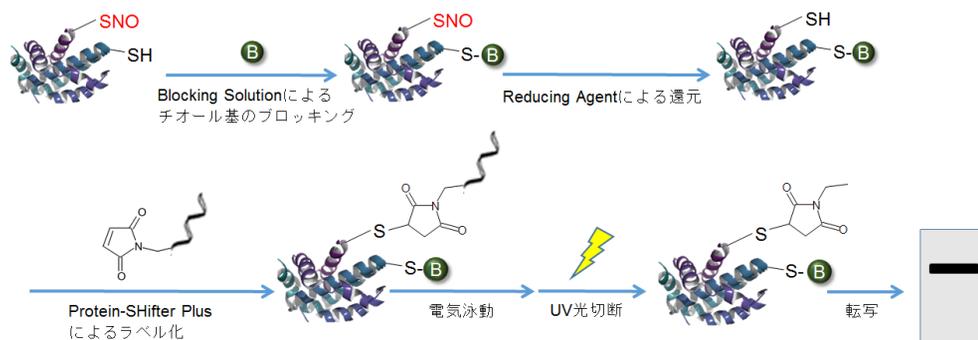


図1 本キットを用いたタンパク質内 S- ニトロシル基の検出原理

キット内容

- Protein-SHifter Plus	x 20
- Reaction Buffer A	x 1
- Reaction Buffer B	x 1
- Lysis Buffer	x 1
- Blocking Stock Solution	x 1
- Reducing Agent	x 5

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)
- マイクロチューブ (1.5 ml)
- 70 (v/v) % EtOH 水溶液
- 電気泳動関連試薬類 [ゲル、Loading Buffer、タンパク質染色試薬 (CBB:Coomassie Brilliant Blue など)]
- ウェスタンブロット関連試薬類 [転写装置、PVDF 膜、光切断装置 (トランスイルミネーター) など]
- アセトン
- インキュベーター (37 °C)
- HBSS あるいは PBS、遠心装置

使用上のご注意

- ・輸送中の振動により、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。
- ・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。
- ・ラベル化の操作は動物細胞用に最適化されています。

使用方法

## Blocking Solution の調製方法

Blocking Stock Solution 100 µl を取り、Lysis Buffer 900 µl を加え、よく混合し、Blocking Solution とする。

- ※溶液が泡立った場合は、7,000 x g, 1-2 分間遠心にかけて消泡してください。
- ※必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を添加してください。

## RA Solution の調製方法

Reducing Agent を含むチューブに Reaction Buffer A 2 ml を加え、転倒混和して溶解し、RA Solution とする。

- ※ RA Solution は用時調製してください。

## 細胞のサンプル (タンパク質溶液) 調製例

1. 1 サンプルあたり 5-10 x 10<sup>5</sup> cells の細胞を準備する。
  2. HBSS あるいは PBS 500 µl で細胞を 2 回洗浄する。
  3. 細胞に Blocking Solution 200 µl を加え、37°Cで 10 分間静置する。
  4. ピペティングにより細胞を溶解した後、全量を 1.5 ml 遠心チューブにそれぞれ回収する。
  5. 各チューブに冷却したアセトン 1 ml を加え、4°C、12,000 x g で 3 分間遠心した後、上清を除去する。
  6. 操作 5 をもう一度行う。
  7. 各チューブに冷却した 70% エタノール 水溶液 1 ml を加え、再度 4°C、12,000 x g で 3 分間遠心した後、上清を除去し、タンパク質ペレットを調製する。
  8. 各チューブに Lysis Buffer 10-50 µl を加え、超音波照射によりタンパク質ペレットを溶解する。
  9. 各チューブを 4°C、12,000 x g で 3 分間遠心した後、上清をサンプル (タンパク質溶液) とする。
- ※調製したサンプルはすぐに Protein SHifter Plus によるラベル化反応に使用してください。

## ラベル化及び解析方法

1. Protein-SHifter Plus を含むチューブに RA solution 4  $\mu$ l を加え、ピペティングでよく混合する。
2. 操作 1 で調製した溶液に、サンプル（タンパク質溶液）2  $\mu$ l および Reaction Buffer B 4  $\mu$ l を加え、ピペティングにより混合する。  
※ 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  $\times$  g, 1-2 分間遠心にかけて消泡してください。
3. 37°C、30 分間静置する。  
※ 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。
4. 操作 3 のサンプルを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  $\mu$ l に対し、(5x) Loading buffer 2  $\mu$ l を添加後、全量をゲルにアプライしてください。
5. 電気泳動後のゲルをトランスイルミネーターで 10 分間 UV(302 nm) 光を照射する。  
※ ゲルが乾燥しないように、ガラスに挟んだ状態で操作を行ってください。
6. 操作 5 のゲルを PVDF 膜に転写し、特異的な抗体によって目的のタンパク質を検出する。

## 実験例

### HeLa 細胞の GAPDH ニトロシル化の解析

1. HeLa 細胞を 24-well プレートに  $5 \times 10^5$  cell/well 播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで一晩培養した（培地は MEM を使用）。
2. HBSS 500  $\mu$ l で細胞を 2 回洗浄し、各ウェルに 1 mmol/l あるいは 100  $\mu$ mol/l S-nitrosocysteine(PBS) 500  $\mu$ l を加えた。
3. 37°C で 45 分間静置した。
4. 上清を吸引除去し、HBSS 500  $\mu$ l で細胞を 2 回洗浄した後、Blocking Solution 200  $\mu$ l を各ウェルに添加し、細胞をピペティングにより溶解した。
5. 全量を 1.5 ml 遠心チューブに回収した後、37°C で 10 分間静置した。
6. 冷却したアセトン 1 ml を各遠心チューブに加え、4°C、12,000  $\times$  g、3 分間遠心した後、上清を除去した。
7. 操作 6 を 2 回行った。
8. 冷却した 70% エタノール水溶液 1 ml を各遠心チューブに加え、再度 4°C、12,000  $\times$  g、3 分間遠心した後、上清を除去した。
9. 各遠心チューブに Lysis Buffer 20  $\mu$ l を加え、ボルテックスおよび超音波照射によりタンパク質ペレットを溶解した。
10. Protein-SHifter Plus を含むチューブに RA solution 4  $\mu$ l を加え、ピペティングにより混合した。
11. 操作 9 で調製したサンプル溶液 2  $\mu$ l および Reaction Buffer B 4  $\mu$ l を、操作 10 で調製した溶液に加え、ピペティングにより混合した。
12. 操作 11 の溶液を 37°C、30 分間静置した。
13. 操作 12 の溶液に、(5x) Loading Buffer (10 (w/v) % sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 (v/v) % glycerol, 0.2 mol/l Tris-HCl (pH 6.8), 0.05 (w/v) % bromophenol blue) 2  $\mu$ l を加え、ピペティングにより混合した。
14. 操作 13 の溶液を SDS-PAGE（アクリルアミドゲル濃度：10 - 20%）に使用した。
15. 電気泳動後のゲルを、トランスイルミネーターで 10 分間 UV(302 nm) 光を照射した。
16. ゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写した。
17. PVDF 膜に転写した GAPDH を抗 GAPDH 抗体、HRP 標識二次抗体およびルミノール発光基質を用いて検出した。

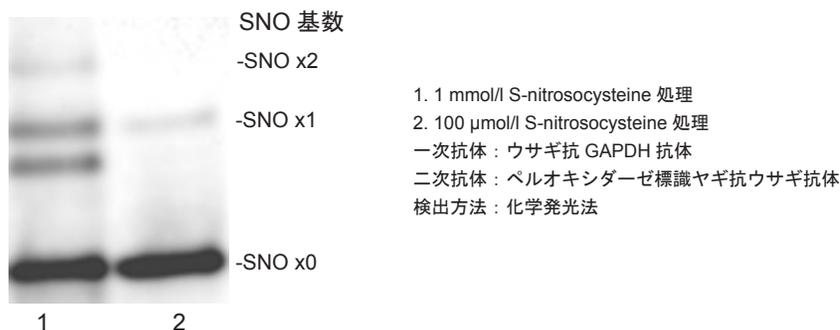


図 2 HeLa 細胞の GAPDH ニトロシル化の解析

## 参考文献

- 1) S. Hara, Y. Tatenaka, Y. Ohuchi and T. Hisabori, "Direct determination of the redox status of cysteine residues in proteins *in vivo*", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, 456(1) 339.
- 2) X. Wang, N. Kettenhofen, S. Shiva, N. Hogg, and M. Gladwin, "Copper dependence of the biotin switch assay: modified assay for measuring cellular and blood nitrosated proteins", *Free Radic. Biol. Med.*, **2008**, 44, 1362.
- 3) M. T. Forrester, M. W. Foster, M. Benhar, and J. S. Stamler, "Detection of Protein S-Nitrosylation with the Biotin Switch Technique", *Free Radic. Biol. Med.*, **2009**, 46(2), 119.
- 4) M. D. Kornberg, N. Sen, M. R. Hara, K. R. Juluri, J. V. K. Nguyen, A. M. Snowman, L. Law, L. D. Hester, and S. H. Snyder, "GAPDH Mediates Nitrosylation of Nuclear Proteins", *Nat. Cell Biol.*, **2010**, 12(11), 1094.

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