

サンプル調製方法 (浮遊細胞用)

- 1) 細胞数として $5 \sim 10 \times 10^5$ cells/tube を用意する。
 ※ サンプルのタンパク質濃度は $0.1 \sim 1$ mg/ml、またはチオール濃度として $100 \mu\text{mol/l}$ 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る。
- 2) $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去する。
- 3) 冷却した $500 \mu\text{l}$ PBS を加え、ピペティングで攪拌後 $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去する。
- 4) 冷却した 10% TCA 水溶液を $500 \mu\text{l}$ 加え、ピペティングで攪拌後、チューブを氷浴上で 30 分間静置する。
- 5) $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去する。
- 6) 冷却したアセトン $500 \mu\text{l}$ を加え、再度 $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去する。(この操作を 2 回行う。)
- 7) 冷却した 70% EtOH 水溶液を $500 \mu\text{l/tube}$ 加え、再度 $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去する。
- 8) Lysis Buffer $100 \mu\text{l/tube}$ を加え、超音波により細胞ペレットを溶解する。
 ※細胞溶解に用いる Lysis Buffer は実験系に応じてプロテアーゼインヒビターを加えること。
 ※溶解後のサンプルはすぐに Protein-SHifter Plus によるラベル化反応に使用すること。

ラベル化方法

- 1) Protein-SHifter Plus に Reaction Buffer A を $4 \mu\text{l}$ 加え、ピペティングでよく混合する。
- 2) 上記で調製したサンプル $2 \mu\text{l}$ を加え、ピペティングでよく混合する。
- 3) Reaction Buffer B を $4 \mu\text{l}$ 加え、ピペ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場合がある。その場合、 $40 \sim 50^\circ\text{C}$ で加温溶解すること。
 ※溶液が泡立った場合は、 $7,000 \times g$ 、 $1 \sim 2$ 分間遠心に於て消泡すること。
- 4) 37°C 、30 分間反応させる。
 ※ラベル化したサンプルはすぐに電気泳動実験に使用すること。
- 5) 操作 4 のサンプルを電気泳動に使用する。
- 6) 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うこと。
- 7) 操作 6 のゲルを PVDF 膜に転写する。
- 8) ウェスタンブロット実験を行い、タンパク質を検出する。

VI 実験例

HeLa 細胞中 GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) の酸化剤に対する応答

- 1) HeLa 細胞を 6-well プレートに 5×10^5 cell/well 播種し、 37°C 、5% CO_2 インキュベーターで一晩培養した。
- 2) 培地を吸引除去し、PBS (37°C) $500 \mu\text{l/well}$ を加え洗浄し、吸引除去した。
- 3) 1 mmol/l Diamide [1,1-Azobis(N,N-dimethylform amide)] または H_2O_2 を $500 \mu\text{l/well}$ 添加し、 37°C で 10 分間静置する。
- 4) 溶液を吸引除去し、冷却する 10% TCA 水溶液を $500 \mu\text{l/well}$ 加え、プレートを氷浴上で 30 分間静置した。
- 5) スクレーパーで細胞を剥がし、 1.5 ml マイクロチューブに回収した。
- 6) $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去した。
- 7) 冷却したアセトンを $500 \mu\text{l/tube}$ 加え、 $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去した。
- 8) 操作 7 をもう一度繰り返した。

- 9) 冷却する 70 % EtOH 水溶液を $500 \mu\text{l/tube}$ 加え、再度 $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去した。
- 10) Lysis Buffer (1% プロテアーゼインヒビター含) $100 \mu\text{l}$ を加え、超音波により細胞ペレットを溶解した。
- 11) Protein-SHifter Plus に Reaction Buffer A を $4 \mu\text{l}$ 加えた。
- 12) 操作 10 の溶液 $2 \mu\text{l}$ を Protein-SHifter Plus に加えた。
- 13) Reaction Buffer B を $4 \mu\text{l}$ を Protein-SHifter Plus に加え、ピペティングでよく混合した。
- 14) 37°C 、30 分間反応させた。
- 15) 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) $2 \mu\text{l}$ を Protein-SHifter Plus に加え、ピペティングでよく混合した。
- 16) 操作 14 の溶液を SDS- ポリアクリルアミドゲル (15%) に使用し、電気泳動を行った。
- 17) 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 照射した。
- 18) ゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写した。

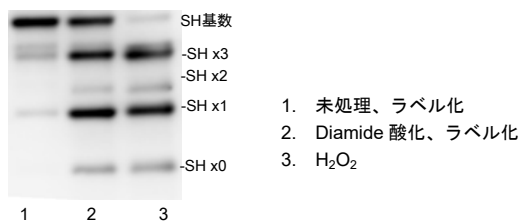


図 4 HeLa 細胞中の GAPDH タンパク質の SH 状態の可視化
 一次抗体：ウサギ抗 GAPDH 抗体
 二次抗体：ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ抗体
 検出方法：化学発光法

VII -SulfoBiotics- PEG-PCMal (Code : SB20) の実験方法

シロイヌナズナの葉に含まれる光応答性タンパク質 (ATP 合成酵素 γ サブユニット) のレドックス状態の解析

- 1) シロイヌナズナの葉を凍結粉碎するために、乳鉢と乳棒を液体窒素であらかじめ冷却した。
- 2) 切り離したシロイヌナズナの葉 1 枚 (約 50 mg) を、暗所もしくは光環境下に 5 分おき、その環境下で液体窒素で凍結させ、乳鉢にて粉碎した。
- 3) 粉碎した葉 (各サンプル) に、 4 mmol/l PEG-PCMal 溶液 $180 \mu\text{l}$ を加え (瞬時に凍る)、乳鉢でさらに粉碎した。
 ※ 4 mmol/l PEG-PCMal 溶液は、PEG-PCMal (1 mg/tube) 2 本に、SDS sample buffer [62.5 mmol/l Tris-HCl (pH7.5), 2% SDS, 7.5% glycerol, 0.01% bromophenol blue] ($90 \mu\text{l/tube}$) を加えて調製した。
- 4) 1.5 ml マイクロチューブに粉碎物を回収し、遮光下、室温で 1 時間静置した。
- 5) 95°C で 5 分間ボイルした後、 $15,000 \text{ rpm}$ で 10 分間遠心した。
- 6) 上清をタンパク質サンプルとし、電気泳動に使用した。
- 7) 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) 照射した。
- 8) ゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写し、抗体を用いて ATP 合成酵素 γ サブユニットを検出した。

細胞
増殖 / 毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

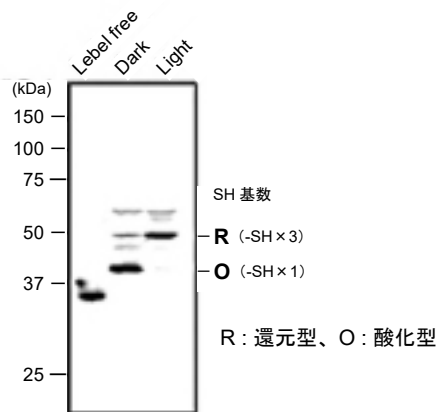


図5 シロイヌナズナ中の光応答性タンパク質のレドックス状態の可視化

技術指導 東京工業大学科学技術創成研究院
 化学生命科学研究所 久堀徹教授
 東京工業大学科学技術創成研究院
 化学生命科学研究所 吉田啓亮助教
 東京工業大学
 生命理工学院 原裕助教

VIII 実験方法 HeLa 細胞中 TRX(Thioredoxin) のレドックス状態の解析

- 1) HeLa 細胞を 96-well プレートに 1×10^5 cell/well 播種し、37°C、5% CO₂ インキュベーターで一晩培養した。
- 2) 培地を吸引除去し、PBS (37°C) 500 μl を加え洗浄し、吸引除去した。
- 3) PEG-PCMal 1 mg を含むチューブに Lysis buffer 360μl を加え、ピペティングにより溶解した (1 mmol/l PEG-PCMal)。
- 4) 1 mmol/l PEG-PCMal 溶液 10 μl を操作 2 の well に加え、ピペティングでよく混合し、細胞を溶解した。
- 5) 操作 4 の溶液 10 μl を 1.5ml マイクロチューブに入れ、37°C で 30 分間静置した。
- 6) 操作 5 のサンプル溶液に Loading buffer 2 μl を加え、よく混合した。
- 7) 操作 6 の溶液を SDS-ポリアクリルアミドゲル (15%) 電気泳動に使用した。
- 8) 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) 照射した。
- 9) ゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写し、抗体を用いて TRX を検出した。

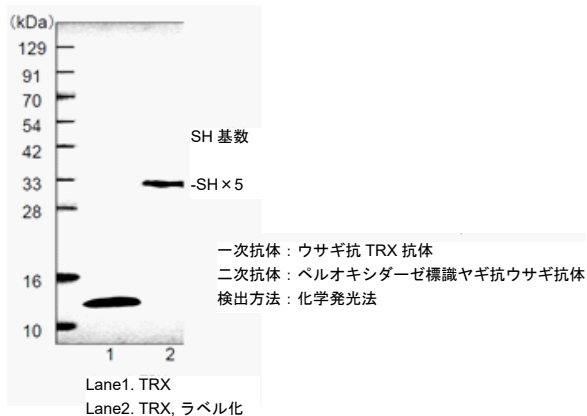


図6 Hela 細胞の TRX のレドックス状態の可視化

参考文献

- 1) T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai, M. Suematsu, H. Motohashi, S. Fujii, T. Matsunaga, M. Yamamoto, K. Ono, N. O. Devarie-Baez, M. Xian, J. M. Fukuto and T. Akaike, "Reactive cysteine and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2014**, *111*, 7606.
- 2) Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J. Oka and H. Kimura, are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain", *FASEB J.*, **2013**, *27*, 2451.
- 3) S. Koike, Y. Ogasawara, N. Shibuya, H. Kimura and K. Ishii, "Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by t-butylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells", *FEBS Lett.*, **2013**, *587*, 3548
- 4) W. Chen, C. Liu, B. Peng, Y. Zhao, A. Pacheco and M. Xian, "New fluorescent probe for sulfane sulfurs and the application in bioimaging", *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 2892.
- 5) E. Marutani, M. Sakaguchi, sW. Chen, K. Sasakura, J. Liu, M. Xian, K. Hanaoka, T. Nagano and F. Ichinose, "Cytoprotective effects of hydrogen sulfide-releasing N-methyl-D-aspartate receptor antagonists mediated by intracellular sulfane sulfur", *Med. Chem. Commun.*, **2014**, *5*, 1577.
- 6) M. Sakaguchi, E. Marutani, H-S. Shin, W. Chen, K. Hanaoka, M. Xian and F. Ichinose, "Sodium Thiosulfate Attenuates Acute Lung Injury in Mice", *Anesthesiology*. **2014**, *121*, 1248.
- 7) Satoshi Hara, Tatsuya Nojima, Kohji Seio, Masasuke Yoshida and Toru Hisabori, "DNA-maleimide: An improved maleimide compound for electrophoresis-based titration of reactive thiols in a protein", *Biochim. Biophys. Acta*, **2013**, *1830.4*. 3077.
- 8) Satoshi Hara, Yuki Tatenaka, Yuya Ohuchi and Toru Hisabori, "Direct determination of the redox status of cysteine residues in proteins *in vivo*", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, *456.1*. 339.