タンパク質の SH 基の数を知りたい

使用製品

-*SulfoBiotics*- Protein Redox State Monitoring Kit [SB11]
-*SulfoBiotics*- Protein Redox State Monitoring Kit Plus [SB12]
-*SulfoBiotics*- PEG-PCMal [SB20]

解析装置

I はじめに

-*SulfoBiotics*- Protein Redox State Monitoring Kit（Code: SB11）および -*SulfoBiotics*- Protein Redox State Monitoring Kit Plus（Code: SB12）は、ゲル電気泳動を用いてタンパク質中の遊離の SH 基数を可視化するためのキットである。キット付属の Protein-SHifter（SB11 付属）および Protein-SHifter Plus（SB12 付属）は、マレイミド基を有する高分子ラベル化剤であり、タンパク質のチオール基に特異的に結合する (図 1)。Protein-SHifter（あるいは Protein-SHifter Plus）でラベル化したタンパク質をゲル電気泳動に適用すると、タンパク質チオール基 1 個当たり分子質量が約 15 kDa 増加したバンドとして分離・検出することが可能である (図 2)。

一方、-*SulfoBiotics*- PEG-PCMal（Code:SB20）が 1 分子結合することで、タンパク質は分子質量約 5 kDa 増加したバンドとして分離検出される。

Protein-SHifter Plus（Code: SB12、SB20 付属）+PEG-PCMal は光分解能を有するため、電気泳動のゲルに UV を照射することで、ラベル化したタンパク質から切り離すことができる。そのため、ラベル化していないタンパク質と同様にウエスタンブロットに適用することが可能である（図 1）。

-*SulfoBiotics*- Protein Redox State Monitoring Kit (Code: SB11) は精製タンパク質の解析に、-*SulfoBiotics*- Protein Redox State Monitoring Kit Plus (Code: SB12) は細胞中の特定タンパク質の解析に、-*SulfoBiotics*- PEG-PCMal（Code : SB20）は、細胞や動物、植物組織の特定タンパク質の解析に適している。

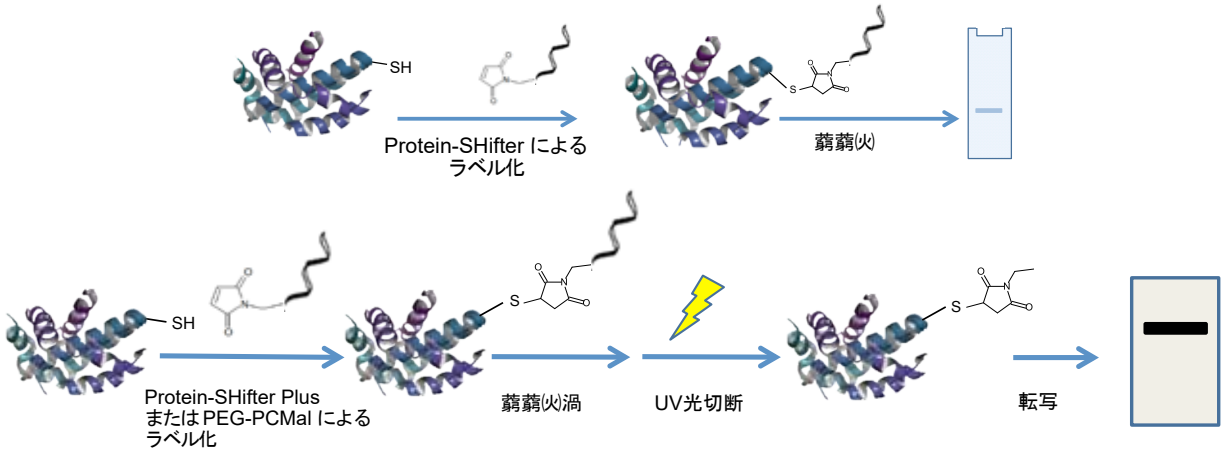


図 1　Protein-SHifter(上段) および Protein-SHifter Plus(下段) の解析原理

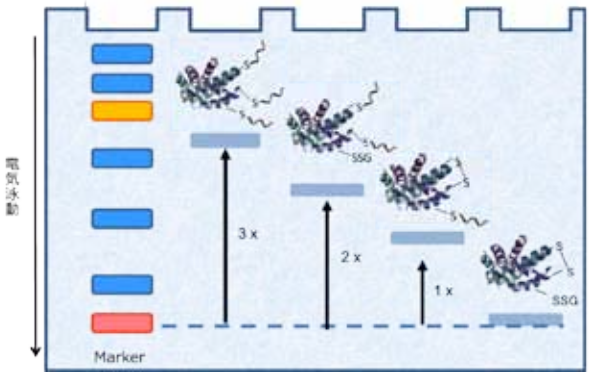


図 2　電気泳動によるタンパク質の SH 基数の可視化

II キット内容

(1) *-SulfoBiotics-* Protein Redox State Monitoring Kit (Code: SB11)
- Protein-SHifter
- Reaction Buffer A
- Reaction Buffer B

(2) *-SulfoBiotics-* Protein Redox State Monitoring Kit Plus (Code: SB12)
- Protein-SHifter Plus
- Reaction Buffer A
- Reaction Buffer B
- Lysis Buffer

キット以外に必要なもの
- 200, 10 µl マイクロピペッター
- 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）
- インキュベーター（37℃）
- PBS（サンプル希釈用）
- マイクロチューブ
- 10 (w/v) % TCA(トリクロロ酢酸) 水溶液
- 70 (v/v) % エタノール水溶液
- アセトン
- ウェスタンブロット関連試薬類 [PVDF 膜、転写装置、光切断装置（トランスイルミネーター）など
- 遠心装置（サンプル調製用）

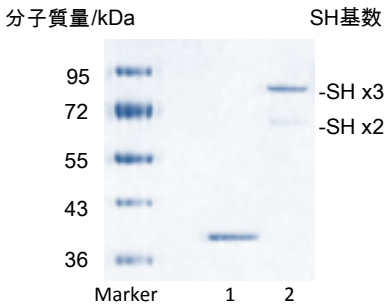
III *-SulfoBiotics-* Protein Redox State Monitoring Kit (Code: SB11) の操作方法

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。
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 以下を推奨する。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。
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る。その場合、40-50℃で加温溶解すること。
   ※ 溶液が泡立った場合は、7,000×*g*、1～2分間遠心して消泡すること。
4) 37℃、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使用する。
5) 操作 4 のサンプルを電気泳動に使用する。
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。

IV 実験例

GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) タンパク質中の SH 基数の検出

1) 1 mg/ml GAPDH (36 kDa、SH 基数 3)(PBS 溶液)10 µlを1.5 ml マイクロチューブに入れ、100 mmol/l DTT (Dithiothreitol) 水溶液を 1 µl 加え、良く混合した。
2) 操作 1 のチューブを 37 ℃、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 の作業をもう一度繰り返した。
6) TE Buffer 50 µl を操作 5 のチューブに加え、良く混合した。（0.2 mg/ml GAPDH）
7) Reaction Buffer A 4 µl を Protein-SHifter に加え、良く混合した。
8) 操作 6 の溶液 2 µl を操作 7 のチューブに加え、良く混合した。
9) Reaction Buffer B 4 µl を操作 8 のチューブに加え、良く混合した。
10) 操作 9) のチューブを 37℃、30 分間反応した。
11) 操作 10) で反応する溶液に、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、良く混合した。
12) 操作 11 で調製する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。



-Lane 1: GAPDH, Lane 2: Labeled GAPDH
-15% SDS-polyacrylamidegel

図 3 GAPDH タンパク質の SH 基数の検出
GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

V *-SulfoBiotics-* Protein Redox State Monitoring Kit Plus (Code: SB12) の操作方法

サンプル調製方法 (付着細胞用)

1) 細胞数として 5 ～ 10 x10^5 cells/well (6-well プレート) を用意する。
   ※ 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 以下を推奨する。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) 培地を吸引除去し、冷却した PBS 500 µl/well で 2 回洗浄する。
3) 冷却した 10 % TCA 水溶液 を 500 µl/well 加え、プレートを氷浴上で 30 分間静置する。
4) スクレーパーで細胞を剥がし、チューブに回収する。
5) 1,000 x *g*、3 分間遠心し、上清を除去する。
6) 冷却したアセトン 500 µl/tube を加え、再度 1,000 x *g*、3 分間遠心し、上清を除去する。（2 回行う。）
7) 冷却した 70% EtOH 水溶液を 500 µl/tube 加え、再度 1,000 x *g*、3 分間遠心し、上清を除去する。
8) Lysis Buffer 100 µl/tube を加え、超音波照射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。

サンプル調製方法 (浮遊細胞用)

1) 細胞数として 5 ～ 10 x10^5 cells/tube を用意する。
※ 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る。
2) 1,000 x *g*、3 分間遠心し、上清を除去する。
3) 冷却した 500 μl PBS を加え、ピペッティングで撹拌後 1,000 x *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 μl 加え、ピペッティングで撹拌後、チューブを氷浴上で 30 分間静置する。
5) 1,000 x *g*、3 分間遠心し、上清を除去する。
6) 冷却したアセトン 500 μl を加え、再度 1,000 x *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 μl/tube 加え、再度 1,000 x *g*、3 分間遠心し、上清を除去する。
8) Lysis Buffer 100 μl/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。

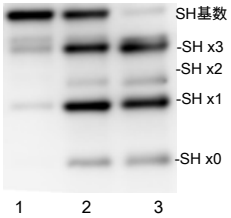
ラベル化方法

1) Protein-SHifter Plus に Reaction Buffer A を 4 μl 加え、ピペッティングでよく混合する。
2) 上記で調製したサンプル 2 μl を加え、ピペッティングでよく混合する。
3) Reaction Buffer B を 4 μ 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場合がある。その場合、40 ～ 50℃で加温溶解すること。
※溶液が泡立った場合は、7,000 × *g*, 1 ～ 2 分間遠心にかけて消泡すること。
4) 37℃、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 x 10^5 cell/well 播種し、37℃、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 ℃）500 μl/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 μl/well 添加し、37℃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 μl/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 x *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 μl/tube 加え、1,000 x *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 μl/tube 加え、再度 1,000 ×*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 μl 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 μl 加えた。
12) 操作 10 の溶液 2 μl を Protein-SHifter Plus に加えた。
13) Reaction Buffer B を 4 μl を Protein-SHifter Plus に加え、ピペッティングでよく混合した。
14) 37 ℃、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 μl を Protein-SHifter Plus に加え、ピペッ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。



1. 未処理、ラベル化
2. Diamide 酸化、ラベル化
3. H_2O_2酸化、ラベル化

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砕するために、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、乳鉢にて粉砕した。
3) 粉砕した葉 (各サンプル) に、4 mmol/l PEG-PCMal 溶液 180μl を加え (瞬時に凍る)、乳鉢でさらに粉砕した。
※ 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 μl/tube) を加えて調製した。
4)1.5 ml マイクロチューブに粉砕物を回収し、遮光下、室温で 1 時間静置した。
5) 95℃で 5 分間ボイルした後、15,000 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。

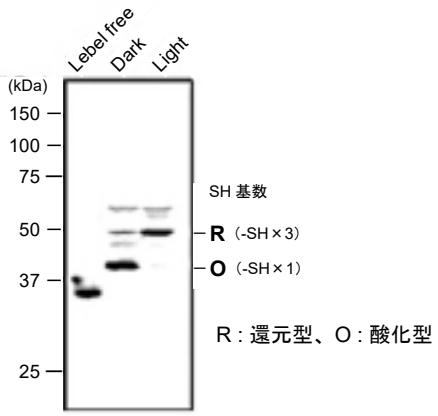


図 5 シロイヌナズナ中の光応答性タンパク質のレドックス状態の可視化

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　原怜助教

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 1x10^5 cell/well 播種し、37℃、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℃) 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、ピペッ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、ピペッ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℃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。

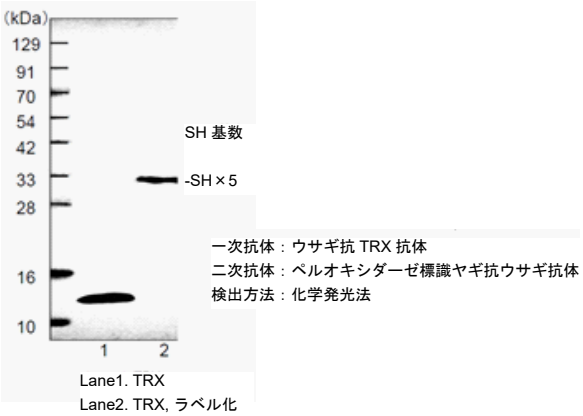


図 6 Hela 細胞の TRX のレドックス状態の可視化

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 H_2S-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.