タンパク質の *S*- ニトロシル基の数を知りたい

使用製品

-*SulfoBiotics*- Protein *S*-Nitrosylation Monitoring Kit [SB14]

解析装置

I 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応答して生じる。タンパク質 *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る。

-*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ある。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る。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する。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する。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る。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る。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ある。

II Protein *S*-Nitrosylation Monitoring Kit を用いた *S*- ニトロシル化タンパク質の検出

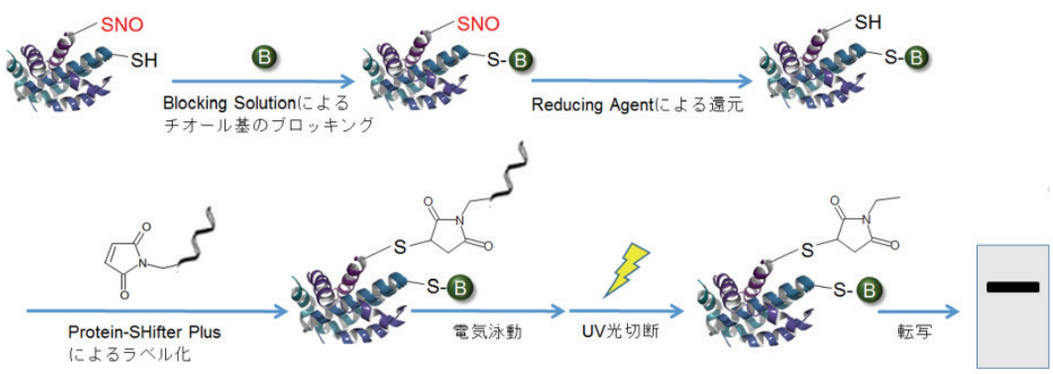


図 1 *S*- ニトロシル基の検出原理

1. 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

2. 製品以外に必要なもの

- マイクロピペット（10 µl、100・200 µl）
- マイクロチューブ（1.5 ml）
- インキュベーター（37 ℃）
- 70（v/v）% EtOH 水溶液
- アセトン
- HBSS あるいは PBS
- *S*-nitrosocysteine(PBS)
- 遠心装置
- 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］

3. 操作方法

(1) 溶液調製

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 × *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。

(2) 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 10^5 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℃で 10 分間静置する。
4) ピペッ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℃、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℃、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℃、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。

(3) HeLa 細胞の GAPDH ニトロシル化の解析例

1) HeLa 細胞を 24-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（培地は MEM を使用）。

2) HBSS 500 µl で細胞を 2 回洗浄し、各ウェルに 1 mmol/l あるいは 100 µmol/l *S*-nitrosocysteine (PBS) 500 µl を加えた。

3) 37℃で 45 分間静置した。

4) 上清を吸引除去し、HBSS 500 µl で細胞を 2 回洗浄した後、Blocking Solution 200 µl を各ウェルに添加し、細胞をピペッ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℃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℃、12,000 x *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℃、12,000 x *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 µl 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 µl を加え、ピペッ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 µl および Reaction Buffer B 4 µl を、操作 10 で調製した溶液に加え、ピペッティングにより混合した。

12) 操作 11 の溶液を 37℃、30 分間静置した。

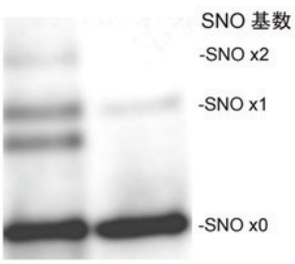
13) 操作 12 の溶液に、(5x) Loading Buffer [10(w/v)% sodium dodecyl sulfate (SDS) , 50(v/v)% glycerol, 0.2 mol/l Tris-HCl (pH 6.8) , 0.05 (w/v) % bromophenol blue] 2 µl を加え、ピペッティングにより混合した。

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。



1. 1 mmol/l *S*-nitrosocysteine 処理
2. 100 µmol/l S-nitrosocysteine 処理
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

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.

FAQ

Q：*S*- ニトロシル化する試薬はありますか？

A：タンパク質の *S*- ニトロシル化には一般的な NO ドナー類が使用できますが、特に *S*-Nitrogluathione や *S*-Nitrosocysteine などのニトロソチオール類が有効です。
生細胞に添加する場合には、細胞透過性の高い *S*-Nitrosocysteine が汎用的に使用されています。

Q：測定に影響を及ぼす物質はありますか？

A：① キレート試薬類：*S*- ニトロシル基の還元反応に影響を及ぼしますので使用しないで下さい。
例）EDTA、Neocuproine など
② 還元物質：タンパク質のチオール基の状態に影響を及ぼしますので使用しないで下さい。
例）DTT、メルカプトエタノール、TCEP など

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を小社 HP にて掲載。ご興味のある方は、小社 HP にて最新情報をご確認下さい。

S- ニトロシル　同仁　検索