

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]
- SulfoBiotics- Biotin-HPDP(WS) solution [SB17]

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反応して生じる。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。

-SulfoBiotics- Biotin-HPDP(WS) solution は、ニトロシル化、スルフヒドリル化、パルミトイル化などのタンパク質チオール修飾の解析法として知られている Biotin switch 法に適用される試薬である⁵⁻¹⁰。本品を用いることで Biotin switch 法でタンパク質のスルフヒドリル (SH) 基にジスルフィド結合を介してピオチンを導入後、ストレプトアビジン固定化樹脂と還元剤を用いてピオチンラベル化タンパク質を精製することができる。従来より、Biotin switch 法には Biotin-HPDP が汎用されているが、Biotin-HPDP は溶媒に対する溶解性が非常に低く、DMSO、DMF などの有機溶媒を用いて溶解する必要があった。そのため、有機溶媒を用いず、また、ピオチン化試薬の濃度を高くしてピオチン化反応をしたい、という要望が存在していた。-SulfoBiotics- Biotin-HPDP(WS) solution は、水への溶解性を飛躍的に向上したことで Biotin-HPDP の課題を克服した製品である。また、20 mmol/l の水溶液タイプのため、試薬の溶解操作も不要である。

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 μ l、100 \cdot 200 μ l)
- マイクロチューブ (1.5 ml)
- インキュベーター (37 $^{\circ}$ C)
- 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 μ l を取り、Lysis Buffer 900 μ l 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 \times 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
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

- (2) 細胞のサンプル (タンパク質溶液) 調製例
- 1 サンプルあたり 5-10 x 10⁵ cells の細胞を準備する。
 - HBSS あるいは PBS 500 μl で細胞を 2 回洗浄する。
 - 細胞に Blocking Solution 200 μl を加え、37°C で 10 分間静置する。
 - 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。
 - 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。
 - 操作 5) をもう一度行う。
 - 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。
 - 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。
 - 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。

- (4) 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 10⁵ cell/well 播種し、37°C、5% CO₂ 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°C 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°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 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°C、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°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 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。

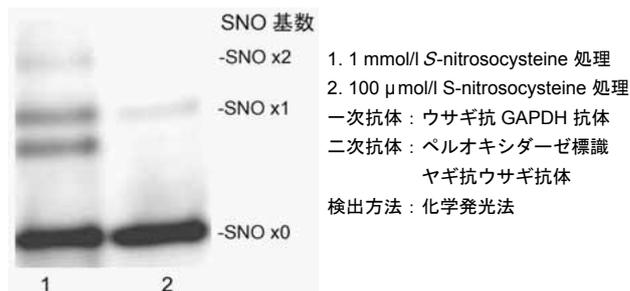


図 2 HeLa 細胞の GAPDH ニトロシル化の解析

III Biotin-HPDP(WS) solution を用いた S- ニトロシル化タンパク質の検出

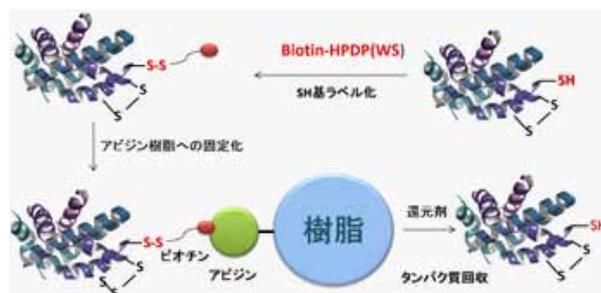


図 3 Biotin-HPDP(WS) によるチオール修飾およびタンパク質回収

1. 製品以外に必要なもの
 - ・ インキュベーター (37°C)
 - ・ マイクロピペット (20 μl, 200 μl, 1 ml)
 - ・ 遠心機
 - ・ マルチイメージャー
 - ・ 1.5 ml マイクロチューブ
 - ・ 10 K Filtration tube
 - ・ Lysis buffer : 6 mol/l Urea, 2% SDS, 150 mmol/l Tris-HCl (pH7.4) の水溶液
 - ・ RIPA buffer : 50 mmol/l Tris-HCl (pH8.0), 150 mmol/l NaCl, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% NP- 40
 - ・ Neutraavidin™ Agarose (Thermo Fisher Scientific)
 - ・ Neutralization buffer : 20 mmol/l HEPES (pH7.7), 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 0.5% TritonX-100
 - ・ Neutralization buffer (+600 mmol NaCl) : Neutralization buffer, 600 mmol NaCl
 - ・ Elution buffer : 20 mmol/l HEPES (pH 7.7), 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 100 mmol/l 2-Mercaptoethanol
 - ・ Loading Buffer : 10% SDS, 50% Glycerol, 0.2 mol/l Tris-HCl (pH 6.8), 0.05% Bromophenol blue
2. 操作
 - 1) 1 mg/ml に調整した GAPDH (36 kDa) の PBS 溶液 10 μl を マイクロチューブに入れ、Lysis buffer 35 μl、100 mmol/l DTT (Lysis buffer) 溶液 5 μl を加えよく混合した。
 - 2) マイクロチューブを 37°C で 30 分間インキュベートした後、溶液全量を 10 K Filtration tube に移し、12,000 rpm で 10 分間遠心した。
 - 3) PBS 50 μl を操作 2 のチューブに加え、12,000 rpm で 10 分間遠心した。
 - 4) 操作 3 をもう一度行った。
 - 5) RIPA buffer 126 μl、4 mmol/l Biotin-HPDP(WS) 水溶液 14 μl を加え、よく混合した (終濃度 400 μmol/l)。

- 6) 37°Cで1時間インキュベートした後、12,000 rpmで10分間遠心した。
- 7) PBS 50 µlを操作7のチューブのメンブレン上加え、12,000 rpmで10分間遠心した。
- 8) 操作7をもう一度行った。
- 9) Neutralization buffer 400 µlを加えてピペティングでメンブレン上のタンパク質を溶解し、マイクロチューブに全量移した。
- 10) 操作9のマイクロチューブから50 µlの溶液をとり、あらかじめNeutralization bufferで洗浄しておいたNeutravidin™ Agaroseに加えてよく混合した。
- 11) 4°Cで1時間静置した。
- 12) 2,500 rpmで1分間遠心し、ピペットマンで上澄みを除去した。
- 13) Neutralization buffer(+600 mmol/l NaCl) 1 mlを加え、2,500 rpmで1分間遠心し、上澄みを除去した。
- 14) 操作13を2回行った。
- 15) Neutralization buffer 1 mlを加え、2,500 rpmで1分間遠心し、上澄みを除去した。
- 16) 操作15をもう一度行った。
- 17) Elution buffer 50 µlを加え、ボルテックスで良く混合した後、4°Cで1時間静置した。
- 18) 2,500 rpmで1分間遠心した後、上清(回収したタンパク質溶液)を1.5 mlマイクロチューブに移した。
- 19) 上清10 µlにLoading Buffer 2 µlを加えてよく混合し、SDS-PAGE(CBB染色)およびウエスタンブロットにより解析した。

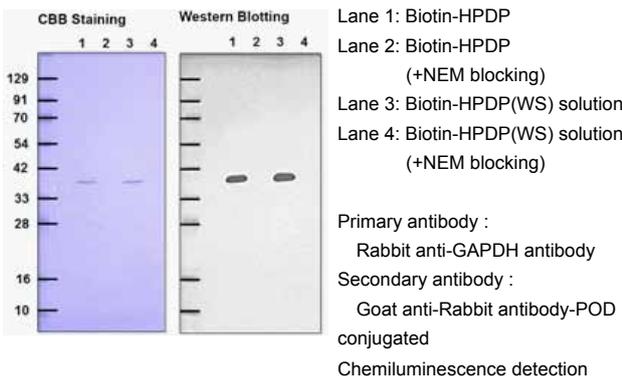


図4 回収したGAPDHの検出

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.
- 5) S. R. Jaffrey and Solomon H. Snyder, "The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins ", *Sci. STKE*, **2001**, 86, pl1.

- 6) J. Wan, A. F. Roth, A. O. Bailey, and N. G. Davis, "Palmitoylated proteins: purification and identification", *Nat. Protoc.*, **2007**, 1573.
- 7) A. K. Mustafa, M. M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. Mu, S. K. Gazi, R. K. Barrow, G. Yang, R. Wang, and S. H. Snyder, "H₂S signals through protein S-sulfhydration", *Sci. Signal.*, **2009**, 2(96), ra72.

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
- Q : Biotin-HPDP(WS) solution と Biotin-HPDP との違いを教えてください。
 A : Biotin-HPDP は殆ど水に溶けず、DMSO 等の有機溶媒で数 mmol/l の溶液を調製した後、バッファーで希釈して Biotin switch 法のラベル化に使用します。Biotin-HPDP を用いた Biotin switch 法では、一般的に終濃度 0.3 mmol/l 程度で用いられます。
 一方、Biotin-HPDP(WS) は水溶性が高いため、有機溶媒を使用する必要がありません。Biotin-HPDP(WS) solution をバッファーに希釈してラベル化をすることが可能です

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

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