

水溶性モノマータンパク質用リフォールディング試薬

Super Refolding mono

使用説明書

【 特徴 】

- ・ 本品は封入体 (inclusion body) など正しい立体構造を保持していないタンパク質を、正常な立体構造へと巻き戻すための試薬セットです。
- ・ 独自の SR 試薬により、多くの水溶性モノマータンパク質に対して、煩雑な条件探索なしに効率的なリフォールディングを行うことができます。SR 試薬は低分子化合物で構成されているため、ゲルろ過クロマトグラフィーや透析等で除去することができます。
- ・ 本品は水溶性モノマータンパク質用に最適化されています。膜タンパク質、オリゴマータンパク質に対する性能は未確認です。なお、全ての水溶性モノマータンパク質において性能を保証するものではなく、標的タンパク質によっては期待した結果を得られないことがあります。
- ・ 各 SR 試薬 1 本で 1~3 mg 程度のタンパク質を処理することが可能です。

APRO

株式会社アプロサイエンス

〒 771-0360

徳島県鳴門市瀬戸町明神字板屋島124-4

TEL. 088-683-7211 FAX. 088-683-7212

URL <http://www.aprosci.com>

本品は試験・研究用以外には使用しないで下さい。

ライセンスについてはお問い合わせ下さい。(特許出願中)

【 試薬構成 】

トライアルセット

- ・ SR 試薬 A 1.0 ml × 1 本
- ・ SR 試薬 B 1.0 ml × 1 本

スタンダードセット A

- ・ SR 試薬 A 1.0 ml × 4 本

スタンダードセット B

- ・ SR 試薬 B 1.0 ml × 4 本

バルク供給についてはお問い合わせ下さい。

【 使用期限 】

1 年 (未使用 4 保存の場合)

開封後はなるべくお早めにご使用下さい。開封後、異物混入や微生物の増殖、変色、pH の変化等が認められた場合は直ちに使用を中止して下さい。

SR 試薬は蓋をしっかりと閉めて保存して下さい。成分の揮発等により、早期劣化の原因となります。

SR 試薬は高濃度の塩を含むため、保存中に塩が析出することがあります。その場合、ぬるま湯に浸すなどして塩を溶解してからご使用下さい。

【 本品以外に準備するもの 】

- ・ 超純水 (比抵抗値 18 M 以上)
- ・ Urea もしくは 塩酸グアニジン
- ・ Tris (またはそれに準ずる緩衝剤)

- ・ 塩酸 (pH 調整用; 必要な場合)
- ・ 水酸化ナトリウム (pH 調整用; 必要な場合)
- ・ DTT (ジチオスレイトール; 必要な場合)
- ・ GSSG (酸化型グルタチオン; 必要な場合)
- ・ GSH (還元型グルタチオン; 必要な場合)
- ・ EDTA などのキレート剤 (必要な場合)
- ・ 標的タンパク質の立体構造形成に必要な補酵素や金属イオンなどの補助因子 (必要な場合)
- ・ 遮光容器もしくはアルミホイル (必要な場合)
- ・ テストチューブ
- ・ 電子天秤および pH メーター
- ・ 室温および 37 の恒温槽等
- ・ 卓上遠心分離機
- ・ ディスポーザブルの手袋

できる限りグレードの高い試薬をご使用下さい。

システイン残基を含む (またはその可能性のある) タンパク質には、DTT、GSSG、GSH を使用して下さい。システイン残基の保護やジスルフィド結合の形成促進に有効とされています。

【 プロトコール 】

本プロトコールでは様々な試薬を使用しますので、作業の際はなるべく手袋や化学防護メガネをご着用下さい。

また、試薬類の保存可能期限はあくまで目安ですので、保存および使用環境によっては保存可能期限が短くなることもあります。特に、異物混入や微生物の増殖、変色等が見られた場合は使用を中止して下さい。

A. 試薬準備

変性溶液：4 で 1 週間保存可能

1. サンプルに応じて、変性剤として Urea もしくは塩酸グアニジンを選択し濃度を決定（一般的には 6～8 M 程度）
2. 必要量の Tris 粉末（100 mM となるようにする）、および必要量の Urea もしくは塩酸グアニジンを秤量し、超純水で溶解
3. 塩酸で pH を 8.2 に調節
4. 超純水でメスアップ（変性溶液）
5. すぐに全量使用しない場合は、容器に入れて冷暗所で密栓保存

標的タンパク質を可溶化し、一度完全に変性させるための溶液として使用する。

変性剤の溶解には、5～10 分程度、緩やかにボルテックスミキサーなどで撹拌する。

DTT 溶液（必要な場合）：-20 で数日保存可能

1. 100 mM Tris-HCl (pH 8.2) を調製
2. 1 M DTT となるように、100 mM Tris-HCl (pH 8.2) に DTT 粉末を溶解
3. すぐに全量使用しない場合は、遮光容器もしくは外側にアルミホイルを巻いた容器などに適量ずつ分注し、-20 で密栓保存

できる限り使用当日に調製するのが好ましい。

凍結保存した溶液はなるべく使用直前に融解し、当日中に使用する。凍結融解は繰り返さない。

調製量は必要量に応じて調節するとよい。

GSSG 溶液（必要な場合）：4 で数日保存可能

1. 超純水で GSSG 粉末を溶解（GSSG 溶液）
2. すぐに全量使用しない場合は、遮光容器もしくは外側にアルミホイルを巻いた容器などに入れ、冷暗所で密栓保存
できる限り使用当日に調製するのが好ましい。
調製量は必要量に応じて調節するとよい。
必要に応じて、適度な割合で GSH を共存させることができる。その場合、GSSG と GSH の合計濃度が 0.5 M となるように調製するとよい。

その他補助試薬（必要な場合）

標的タンパク質の立体構造形成に必要な小分子や金属イオンなどの補助因子、あるいはキレート剤をリフォールディング時に添加すると効果的である可能性があります。必要に応じて調製して下さい。

B. 標的タンパク質の可溶化

1. 標的タンパク質がシステイン残基を含有する場合、変性溶液：DTT 溶液 = 9：1 で混合（1）
2. 変性溶液（もしくは 1 で調製した変性溶液 + DTT 溶液の混合液）で標的タンパク質もしくは封入体を溶解（2）
3. 37 で 2～3 時間静置
4. 軽く遠心分離を行って上清を回収（可溶化サンプル溶液）
 - 1 必要があれば、DTT 濃度はサンプルに応じて加減することができる。
 - 2 標的タンパク質は 20～50 mg/ml 程度を目安に可溶化する。封入体の場合もタンパク質濃度が

20～50 mg/ml 程度を目安に可溶化する。

C. 標的タンパク質のリフォールディング

1. SR 試薬 190 μl に対し、B で調製した可溶化サンプル溶液 10 μl を添加（1）（2）
2. 標的タンパク質がシステイン残基を含有する場合、GSSG 溶液を 2 μl 添加（3）
3. 室温で一晩（14～20 時間）静置（4）（5）
4. 各タンパク質に適した方法でリフォールディング収率の確認を行い、後の実験に使用する。（6）
 - 1 SR 試薬 A と B のどちらが適しているかは、標的タンパク質との相性による。
 - 2 可溶化サンプル溶液は SR 試薬により 20 倍に希釈されることになる。もし必要があれば、希釈倍率を 20～100 倍の間で調整する。
 - 3 必要があれば、GSSG 溶液の添加量はサンプルに応じて加減することができる。
 - 4 リフォールディングの温度は必要に応じて調整する。ジスルフィド結合を持つタンパク質などは、高温（30～50）でフォールディングすると収率が向上することもある。その場合、次のステップへ進む前に、標的タンパク質が変性しない温度まで冷却する。
 - 5 インキュベーション時間は必要に応じて調整する。リフォールディングに必要な時間はジスルフィド結合の有無や、ネイティブ状態の安定性などにより大きく異なる。
 - 6 SR 試薬は高濃度の塩を含むため、必要に応じて透析やゲルろ過クロマトグラフィーなどで脱塩する。

水溶性モノマータンパク質用リフォールディング試薬

Super Refolder mono

参考資料

【トラブルシューティング】

本製品を用いてリフォールディングを行っても期待した結果が得られなかった場合、下記を参考にしてください。

1. GSH 濃度が不適切

標的タンパク質によっては、GSSG 溶液に適度な割合で GSH を共存させるとジスルフィド交換反応が促進される場合があります。特に、触媒中心にチオールが存在するタンパク質は、GSH を多めに入れると良い結果が得られることがあります。

2. 標的タンパク質の変性が不十分

他の変性剤を試してください。塩酸グアニジンは Urea よりも強い変性作用が期待できます。その他、非イオン性界面活性剤やトリフルオロエタノールなどでも変性させることができます。

APRO

株式会社アプロサイエンス

〒771-0360

徳島県鳴門市瀬戸町明神字板屋島124-4

TEL. 088-683-7211 FAX. 088-683-7212

URL <http://www.aprosci.com>

本品は試験・研究用以外には使用しないで下さい。

ライセンスについてはお問い合わせ下さい。(特許出願中)

3. 変性剤の変性能が強すぎる

標的タンパク質によっては、変性剤の変性能が強すぎるとリフォールディングの妨げとなる場合があります。その場合には、酸やアルカリ、1M 程度の低濃度 Urea による変性を試して下さい。また、プロトコール C のステップ 1 において、可溶化サンプル溶液の希釈倍率を上げてみて下さい。

4. リフォールディング時の pH が不適切

ジスルフィド交換反応のためには、pH が 8 以上である必要があります。可溶化サンプル溶液の調製を本説明書に記載の方法以外で行った場合、プロトコール C のステップ 3 において pH が 8 以上となっているかご確認下さい。また、ジスルフィド結合の再生が必要ない標的タンパク質であれば、緩衝液の pH を標的タンパク質の等電点から遠ざけることで非特異的な凝集が抑制され、リフォールディング収率が向上する場合があります。

5. リフォールディング時間が短い

リフォールディングに必要な時間はジスルフィド結合の有無や、ネイティブ状態の安定性などにより大きく異なります。そのためリフォールディング収率が思わしくない場合は、リフォールディング時間を長めにすることで改善される場合があります。

6. リフォールディング収率の評価系への影響

SR 試薬は高濃度の塩を含むため、活性測定等に影響を及ぼす可能性があります。その場合、透析などによる脱塩を試みて下さい。

7. リフォールディング後の脱塩

SR 試薬を透析等で除くと多量の凝集が見られる場合があります。その場合、SR 試薬の濃度を段階的に下げていく方法が考えられます（各 SR 試薬はバルク供給が可能です）。また、置換する緩衝液の pH は標的タンパク質の等電点付近を避けて下さい。

8. SR 試薬の劣化

SR 試薬は保証期限内の未開封品であっても、高温や直射日光への暴露など、保存状態によっては品質の劣化が見られる場合があります。必ず定められた保存方法に従って保存して下さい。特に、SR 試薬の pH が酸性になっている場合、品質が劣化していますので、直ちに使用を中止してください。また、開封後は蓋をしっかりと閉めて保存し、なるべくお早めにご使用下さい。異物混入や微生物の増殖、変色、pH の変化等が認められた場合、直ちに使用を中止して下さい。

9. その他

pH、Tris-HCl 濃度などは、まずは本説明書に記載の条件でお試し下さい。また、リフォールディング時のタンパク質濃度は本説明書に記載の濃度を推奨します。特に、タンパク質濃度が低すぎると期待した結果が得られないことがあり、その場合には SR 試薬を 100 mM Tris-HCl (pH 8.2) で 2 倍程度に希釈して使用すると改善される可能性があります。

【実施例】

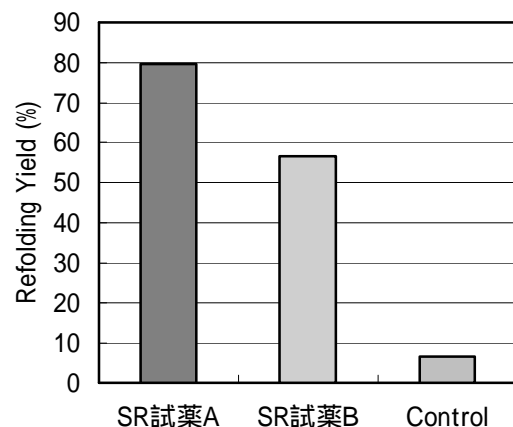
A. ニワトリ卵白リゾチームのリフォールディング

(実験方法)

リゾチームを 50.9 mg/ml となるよう、6.2 M グアニジン塩酸塩、100 mM DTT、100 mM Tris-HCl (pH 8.2) で溶解した後、37 °C で 6 時間リゾチームを変性させた。この変性リゾチーム溶液 10.6 µl に、SR 試薬 A、SR 試薬 B、またはコントロール溶液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.2)) 388.4 µl および 200 mM GSSG 10 µl を加え、37 °C で 18 時間リフォールディングさせた。その後、この溶液の上清を回収し、Micrococcus lysodeikticus に対するリゾチーム活性からリフォールディング収率を求めた。

(実験結果)

SR 試薬はいずれも高いリフォールディング収率が得られ、特に SR 試薬 A では約 80% であった。一方で、SR 試薬を用いなかったコントロールでは、リフォールディング収率は 10% 未満であった。以上のことから、SR 試薬 (特に SR 試薬 A) はリゾチームのリフォールディングに有効であることが示された。



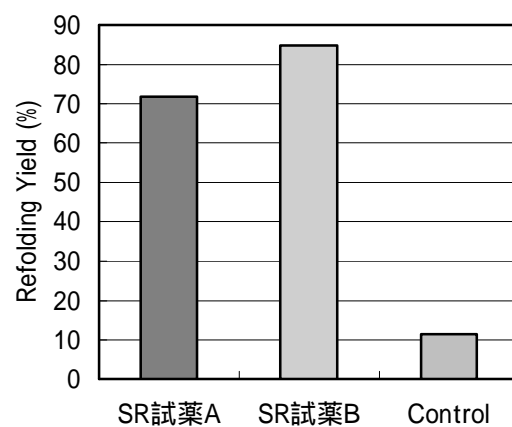
B. カルボニックアンヒドラーゼのリフォールディング

(実験方法)

カルボニックアンヒドラーゼ (CA) を 22.9 mg/ml となるよう、6.0 M Urea、100mM Tris-HCl (pH 8.2) で溶解した後、37 °C で 6 時間 CA を変性させた。この変性 CA 溶液 10.8 µl に、SR 試薬 A、SR 試薬 B、またはコントロール溶液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.2)) を 189.2 µl 加え、37 °C で 14 時間リフォールディングさせた。その後、この溶液の上清を回収し、パラニトロフェニルアセテートに対する CA 活性からリフォールディング収率を求めた。

(実験結果)

SR 試薬はいずれも高いリフォールディング収率が得られ、特に SR 試薬 B では約 85% であった。一方で、SR 試薬を用いなかったコントロールでは、リフォールディング収率は 10% 程度であった。以上のことから、SR 試薬 (特に SR 試薬 B) は CA のリフォールディングに有効であることが示された。



C. α-アミラーゼのリフォールディング

(実験方法)

α-アミラーゼを 18.54 mg/ml となるよう、5.0M グアニジン塩酸塩、100 mM DTT、100 mM Tris-HCl (pH 8.2) で溶解した後、25 °C で 16 時間 α-アミラーゼを変性させた。この変性 α-アミラーゼ溶液 10 µl に、試薬 A、SR 試薬 B、またはコントロール溶液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.2)) 180 µl および 100mM GSSG 10 µl を加え、50 °C で 2 時間リフォールディングさせた。その後、この溶液の上清を回収し、デンプンに対する α-アミラーゼ活性からリフォールディング収率を求めた。

(実験結果)

SR 試薬はいずれも 90% 前後の高いリフォールディング収率が得られた。一方で、SR 試薬を用いなかったコントロールでは、リフォールディング収率は 10% 未満であった。以上のことから、いずれの SR 試薬も α-アミラーゼのリフォールディングに有効であることが示された。

