



Technical note

無細胞くん[®]を用いて合成したタンパク質の SDS-PAGE による確認方法

無細胞くんはタンパク質を簡単に合成できるキットです。合成されたタンパク質の確認には SDS-PAGE が一般に行われますが、無細胞くんキット(SI, SI SS, Start, Quick)に含まれるポリエチレングリコールにより、バンドが乱れることがあります。SDS-PAGE で合成タンパク質をご確認いただく場合は、前処理としてアセトン沈殿を行うことで、きれいな泳動パターンが得られます。ここでは、その方法と実施例をご説明致します。尚、無細胞くんキット【SI (PEG 不含), SI SS(PEG 不含), N Mini, N 100, N 1000, N Mini SS, N 100 SS, N 1000 SS】ではアセトン沈殿処理を行う必要はございません。

1. 作業の概要

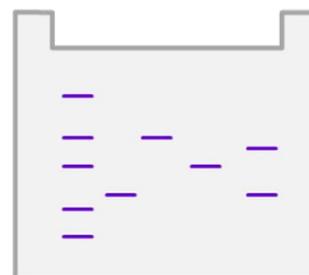
タンパク質合成反応



アセトン沈殿処理



SDS-PAGE



2. プロトコル アセトン沈殿処理

1. 反応終了後、無細胞くんキット(SI, SI SS, Start, Quick)の反応液を新しい 1.5 mL チューブに回収します。
2. 0.6 mL チューブを 2 本用意し、27 μ L の Milli-Q 水を加えます。
 - 1 本が①全画分用、もう 1 本が②可溶性画分用となります。
 - サンプル数が多い場合は 8 連 PCR チューブを使うと便利です。
 - この 2 つのサンプルを SDS-PAGE で流すことで、目的タンパク質の可溶性をご評価頂けます。
 - 未反応の反応液 20 μ L を冷蔵保温しておき、同様の処理を行った後に SDS-PAGE で流すことで、合成タンパク質をより確認しやすくなります。
3. よく混ぜた反応液 3 μ L を①全画分用 0.6 mL チューブに加えます。
4. 反応液を遠心分離します。15,000 $g \times 5$ min, 4 $^{\circ}$ C
5. 遠心後の反応液の上清 3 μ L を②可溶性画分用 0.6 mL チューブに加えます。
 - 反応液は、そのまま精製や分析にご使用いただけます。長期間保存される場合は液体窒素で凍結後、-80 $^{\circ}$ C で保存してください。

SIIC-DN-0002

6. ①全画分、②可溶性画分用の 0.6 mL チューブに 60 μ L のアセトンを加えて vortex 等で混合した後、氷上で 10 min 冷却します。
7. 遠心分離します。15,000 $g \times 5$ min, 4°C
8. 遠心後、上清をピペットで吸って捨て、チューブのフタを開けた状態で、60°Cで 10~20 min 保温し、沈殿物を乾燥させます。
 - タンパク質は沈殿に含まれます。60°Cの保温にはヒートブロック、サーマルサイクラー等をご利用ください。
9. 1xSDS sample buffer を 60 μ L 加え、95°C, 5 min ボイルします。
 - Vortex 等でよく混合します。
10. SDS-PAGE 用のゲルに 10 μ L アプライします。

3. 実施例 1

無細胞くん SI キットを用いて、大腸菌の PpiB(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase b)を合成しました。合成後に、アセトン沈殿処理を行った全画分および可溶性画分と、行わなかった全画分および可溶性画分を 15% SDS-PAGE ゲルで泳動し、染色しました(図 1)。その結果、アセトン沈殿処理を行わなかったサンプルでは、PpiB と周辺のバンドが歪んでしまいました。一方、アセトン沈殿を行ったサンプルでは、PpiB のバンドと周辺のバンドは歪むことなく、本来の分子量の位置に見られました。

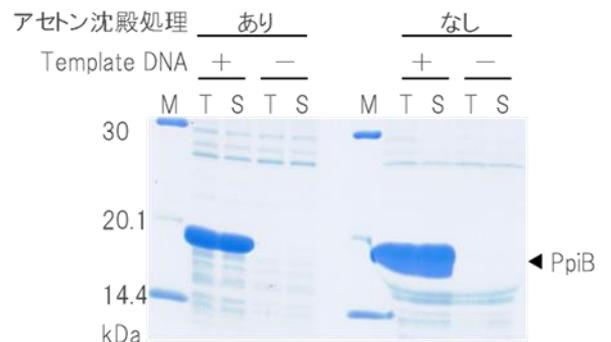


図 1. アセトン沈殿による泳動図の改善
M: 分子量マーカー、T: 反応液の全画分、S: 反応液の可溶性画分

4. 実施例 2

無細胞くん SI キットを用いて、分子量が異なる 4 種類のタンパク質、Streptomyces Subtilisin Inhibitor (SSI), PpiB, Superfolder GFP(sfGFP)、Maltose binding protein(MBP)を合成しました。アセトン沈殿処理を行った全画分と、行わなかった全画分を 15% SDS-PAGE ゲルで泳動し、染色しました(図 2)。その結果、アセトン沈殿処理を行わなかったサンプルでは SSI と PpiB のバンドは歪んでしまいましたが、sfGFP と MBP にはバンドの歪みは見られませんでした。ポリエチレングリコールによる泳動図の乱れは主に分子量 15~25 kDa の範囲に起こります。このように分子量 25 kDa 以上のタンパク質に関してはアセトン沈殿を行わなくてもバンドは歪まず、きれいな泳動図が得られました。

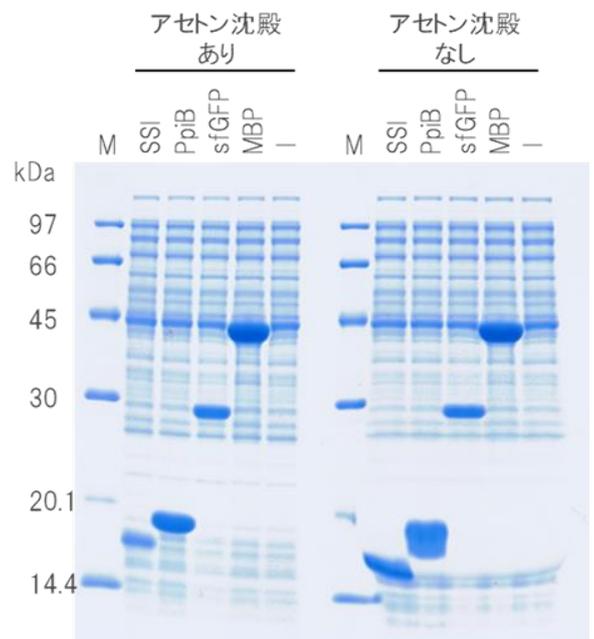


図 2. アセトン沈殿処理による泳動図の改善
(合成タンパク質の分子量の影響)
分子量 SSI: 15.7 kDa*, PpiB: 18.1 kDa, sfGFP: 26.8 kDa, MBP: 44.8 kDa*(タグも含めた分子量)

5. まとめ

無細胞くん SI キットで合成したタンパク質の発現量、可溶性等を SDS-PAGE で調べたい時に、反応液をそのまま流すのではなく、アセトン沈殿処理を行うことでバンドの乱れのないきれいな

泳動図が得られました。分子量 25 kDa 以上のタンパク質についてはアセトン沈殿処理は必須ではなく、単に合成産物を確認する目的であれば、反応液をそのまま SDS-PAGE にご使用いただいて問題ございません。ご参考までに、アセトン沈殿処理を行わない場合の SDS-PAGE サンプルの調製方法を以下にご紹介致します。

6. プロトコル SDS-PAGE サンプルの調製

1. 反応終了後、無細胞くんキットの反応液を新しい 1.5 mL チューブに回収します。
2. 0.6 mL チューブを 2 本用意し、27 μ L の Milli-Q 水を加えます。
 - 1 本が①全画分用、もう 1 本が②可溶性画分用となります。
 - サンプル数が多い場合は 8 連 PCR チューブを使うと便利です。
 - この 2 つのサンプルを SDS-PAGE で流すことで、目的タンパク質の可溶性をご評価頂けます。
 - 未反応の反応液 20 μ L を冷蔵保温しておき、同様の処理を行った後に SDS-PAGE で流すことで、合成タンパク質をより確認しやすくなります。
3. よく混ぜた反応液 3 μ L を①全画分用 0.6 mL チューブに加えます。
4. 反応液を遠心分離します。15,000 $g \times 5$ min, 4°C
5. 遠心後の反応液の上清 3 μ L を②可溶性画分用 0.6 mL チューブに加えます。
 - 反応液は、そのまま精製や分析にご使用いただけます。長期間保存される場合は液体窒素で凍結後、-80°C で保存してください。
6. 2xSDS sample buffer を 30 μ L 加えて Vortex 等でよく混合し、95°C, 5 min ボイルします。
7. SDS-PAGE 用のゲルに 10 μ L アプライします。

無細胞くんについてご質問等
ございましたら、お気軽にご
連絡ください！



・「無細胞くん」「大陽日酸」「TAIYO NIPPON SANSO」「The Gas Professionals」は大陽日酸株式会社の登録商標または商標です。
・その他、記載されている社名及び製品名は、各社の登録商標又は商標です。本文中に TM, R マークを明記していない場合があります。

お問合せ

大陽日酸株式会社 イノベーションユニット SI 事業部
神奈川県横浜市西区みなとみらい 4-6-2
みなとみらいグランドセントラルタワー 7F

E-mail: isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
HP: <https://stableisotope.tn-sanso.co.jp>