

令和 5 年度 化学生命工学実験 3

タンパク質実験

学籍番号 : 082110424

氏名 : 中村優作

実施日 : 10 月 4 日, 5 日, 10 日

1 目的

本実験では、組換えタンパク質 sfGFP-H を発現させた大腸菌から、His-tag を用いたアフィニティクロマトグラフィにより、sfGFP-H を生成する。得られたタンパク質を紫外可視分光法、ブラッドフォード法、SDS-PAGE により定量する。これら 3 つの方法で算出された濃度を比較して考察することを目的とする。

2 操作

2.1 アフィニティクロマトグラフィによる sfGFP-H の精製

電気泳動用に、大腸菌破砕液 100 μ L を分注した。アフィニティクロマトグラフィ担体が詰められたカラム (Bio-Scale Mini Profinity IMAC カートリッジ) に、表 1 のように順次溶液を打ち込んだ。

表 1: sfGFP-H の精製手順

ステップ	使用 buffer	分取量 (mL)	使用チューブ (mL)
1. カラム平衡化	IMAC B1 buffer	8	15
2. タンパク質結合	大腸菌破砕液	2	15
3. カラム洗浄	IMAC B2 buffer	20	50
4. タンパク質溶出	IMAC B3 buffer	0.5 \times 8 本	15

打ち込む際は、プランジャを抜いたシリンジをカラムに装着し、シリンジ内に溶液をピペットで加え、プランジャを押し込むことで溶液をカラムに流し込んだ。また、カラムに溶液を流し込む速度は、1 秒に 2 滴程度となるように調節した。また、打ち込む溶液を交換する際は、カラムからシリンジを外してからプランジャを抜いた。

2.2 紫外・可視分光法によるタンパク質の濃度決定

2.2.1 測定に用いるタンパク質の調整

タンパク質溶出によって分取した 8 本のチューブのうち、目視で最も濃いと判断した 2 番目に溶出したチューブを溶出液として取り扱った。1.5mL チューブに、溶出液 100 μ L を取り、900 μ L の IMAC B3 buffer を加えることで、1/10 倍に希釈した。

2.2.2 分光光度計による吸光度の測定

1/10 倍に希釈した溶出液を、キュベットに移動し、分光光度計にかけて吸光度を測定した。測定波長は、280nm と 488nm とした。488nm で測定した際、吸光度が 2 を超え、定量的信頼性が下がると判断して、溶液を 1/20 倍希釈になるように調整した。1/20 倍に希釈した溶液を、キュベットに移動し、分光光度計にかけて吸光度を測定した。

2.3 ブラッドフォード法によるタンパク質の定量

タンパク質の標準サンプルとして、8mg/mL の BSA 溶液 20 μ L を用意した。この BSA 溶液を IMAC B3 buffer を用いて系列希釈し、0.8mg/mL, 0.4mg/mL, 0.2mg/mL, 0.1mg/mL, 0.05mg/mL の溶液各 50 μ L を 1.5mL チューブに調整した。

また、溶出液 1 μ L に 49 μ L の IMAC B3 buffer を加えた、1/50x 溶出液と、コントロール用の 50 μ L B3 buffer を 1.5mL チューブに調整した。

2.3.1 ブラッドフォード溶液の混合

1.5mL チューブ内で、50 μ L のサンプルに 200 μ L のブラッドフォード試薬を加え、一旦混合した。その後、750 μ L の超純水を添加した。この時、赤色から青色に溶液の色が変化した。

2.3.2 分光光度計による吸光度の測定

調整したブラッドフォード溶液の全量 (1000 μ L) を用いて、吸光度の測定を 595nm で分光光度計を用いて行った。

2.4 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による sfGFP-H の解析

2.4.1 泳動サンプルの調整

表 2 のように、サンプルに 1x SDS-PAGE 用 loading buffer を添加し、混合した後、95°C で 2 分間加熱して用意した。

表 2: 泳動サンプルの調整

	サンプル	1x SDS-PAGE 用 loading buffer
精製前	5 μ L	45 μ L
カラムの通過液	5 μ L	45 μ L
タンパク質溶出液 (1/40)	2 μ L	78 μ L
タンパク質溶出液 (1/200)	5 μ L タンパク質溶出液 (1/40)	20 μ L

2.4.2 SDS-PAGE の実施

ゲルを泳動槽にセットし、SDS-PAGE 用泳動 buffer を添加した。ゲルは ATTO 社の E-T 12.5L ePAGEL 12.5% を使用した。調整したサンプルをそれぞれ 4 μ L ずつ、ウェルに打ち込んだ。その後、ゲル 1 枚あたり 40mA の条件で 40 分程度通電した。

ここでカラムの通過液をゲルに打ち忘れたか、精製前のサンプルのウェルに二重で打ち込んでしまったため、ゲルにバンドが 3 本のみしか見られていない。

2.4.3 ゲルの染色と観察

ゲルを取り出し、染色用の容器に移した。あらかじめ温めておいた超純水を容器の半分程度に加えて、電子レンジで数秒間沸騰させた後、室温で 5 分静置した。超純水を交換し、同様の操作を計 3 回繰り返した。完全

に水を切って、CBB 染色液 10mL を加え、電子レンジで加熱し、沸騰するのが見えたら直ちに止め、室温で 20 分程度静置してバンドが染まったことを確認したら染色液を捨てた。超純水を半分程度加え、電子レンジで沸騰させた後、室温で 5 分静置した。超純水を交換し、同様の操作を計 2 回繰り返した。水を捨てた後、ゲルを撮影装置で撮影した。

3 結果

3.1 紫外・可視分光法によるタンパク質の濃度決定

1/20 倍に希釈した溶液の吸光度を、280nm と 488nm で測定した。吸光度の測定結果を表 3 に示す。濃度の計算に関しては、設問/課題 4.2 に記載した。

表 3: タンパク質溶出液の吸光度の測定結果

測定波長 nm	吸光度
280	0.467
488	1.134

3.2 ブラッドフォード溶液の、分光光度計による吸光度の測定

調整したブラッドフォード溶液を用いて、吸光度の測定を 595nm で分光光度計を用いて行った結果を表 4 に示す。また、測定結果から作成した検量線を図 1 に示す。なお、検量線の縦軸の吸光度はブランクを差し引いた値を用いている。

表 4: ブラッドフォード溶液の吸光度の測定結果

ブラッドフォード溶液	吸光度
0.8mg/mL	2.063
0.4mg/mL	1.046
0.2mg/mL	0.994
0.1mg/mL	0.932
0.05mg/mL	0.874
B3 buffer	0.828
1/50x 溶出液	1.151

作成した検量線から、1/50x 溶出液のブラッドフォード溶液濃度を求めたところ、0.2900mg/mL となった。これは 50 倍希釈の溶液なので、原液の重量濃度は 14.50mg/mL である。sfGFP-H の分子量が 28180Da であることから、原液のモル濃度は以下のように求められた。

$$c_{\text{原液}} = \frac{14.50\text{mg/mL}}{28180\text{Da}} = 51.4\mu\text{M} \quad (1)$$

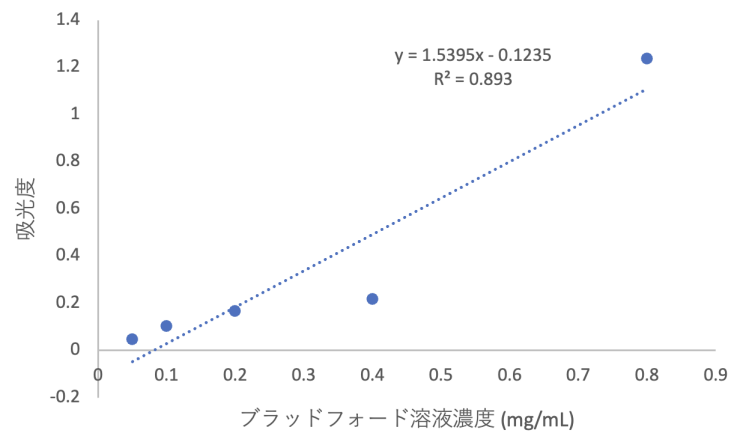


図 1: 吸光度とブラッドフォード溶液濃度の関係

3.3 sfGFP の濃度決定

図 2 に、染色されたゲルの結果を示す。

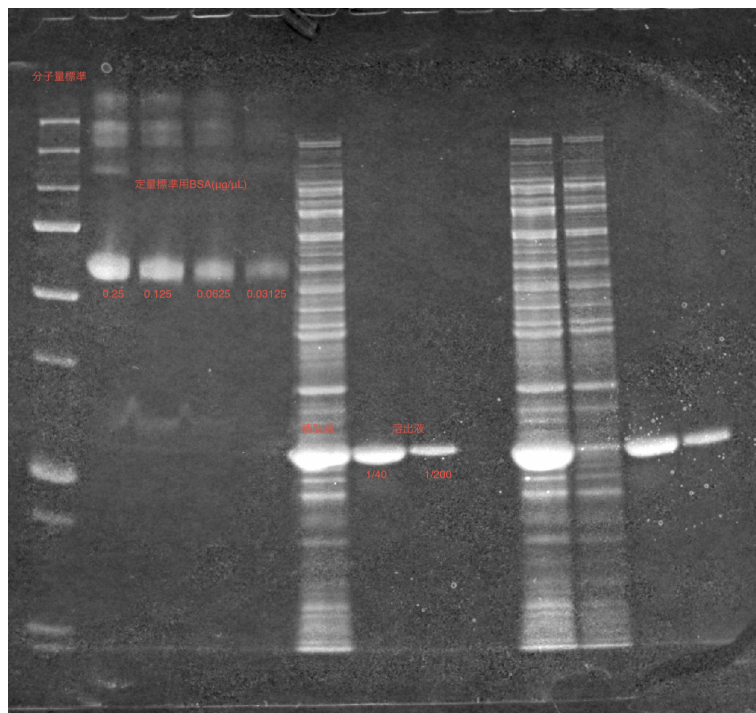


図 2: SDS-PAGE の結果

ImageJ を用いて、標準用 BSA のバンド 4 本と、1/40x タンパク質溶出液のバンド (図 2 の左から 7 番目) について、バンドの強度を定量した。その結果を表 5 に示す。また、結果から作成した検量線を図 3 に示す。作成した検量線から、1/40x 溶出液の sfGFP 濃度を求めたところ、0.2494mg/mL であった。これは 40 倍希

表 5: SDS-PAGE の結果

バンド	強度	濃度 (mg/mL)
BSA(1)	2.976	0.25
BSA(2)	2.457	0.125
BSA(3)	1.659	0.0625
BSA(4)	1.038	0.03125
1/40x 溶出液	3.137	

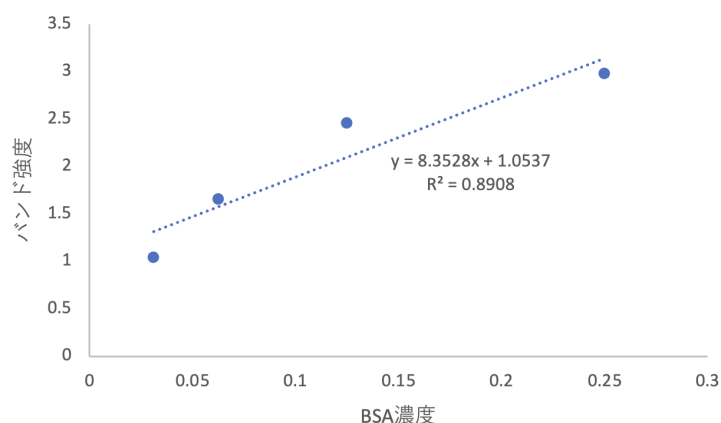


図 3: バンド強度と BSA 濃度の関係

釈の溶液なので、原液の重量濃度は 9.976mg/mL である。sfGFP の分子量が 28180Da であることから、原液のモル濃度は以下のように求められた。

$$c_{\text{原液}} = \frac{9.976\text{mg/mL}}{28180\text{Da}} = 35.4\mu\text{M} \quad (2)$$

3.4 sfGFP-H の分子量の決定

ImageJ を用いて、BFP の泳動距離を測定し、各タンパク質のバンドの相対泳動度 (Rf 値) を測定した。各タンパク質の分子量と Rf 値を表 6 に示す。また、結果から作成した検量線を図 4 に示す。作成した検量線から、1/40x タンパク質溶出液、1/200x タンパク質溶出液の分子量はそれぞれ 24.8kDa、25.5kDa であった。

4 設問/課題

4.1 sfGFP の 280nm における mol 吸光係数 ϵ_{280} の計算

ExPasy の Translate に与えられた sfGFP のアミノ酸配列を用いて、5'3'Frame1 のアミノ酸配列を算出した。その後、ProtParam を用いて分子量と理論上の mol 吸光係数を求めたところ、分子量は 2.8180g/mol、

表 6: 各タンパク質の分子量と Rf 値

分子量 (kDa)	Rf 値
200	0.160361567
150	0.207231336
100	0.266488115
75	0.328757951
50	0.438901908
37	0.541680616
25	0.728824908
20	0.7941078

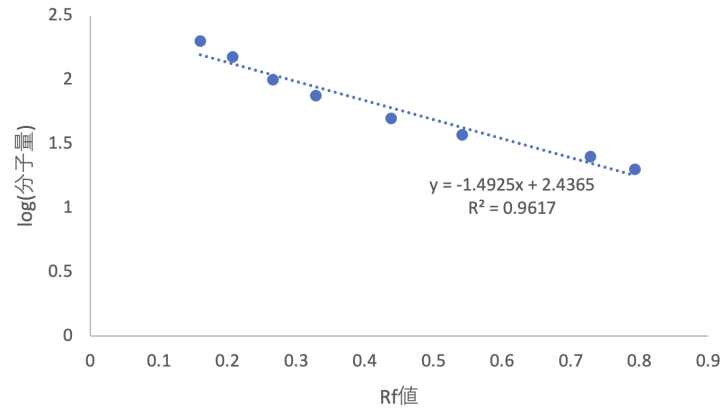


図 4: 分子量と Rf 値の関係

理論上の mol 吸光係数は $18910\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ となった。

4.2 吸光度を用いた sfGFP 濃度の計算

5.1 で計算した mol 吸光係数と、実測した 280nm における吸光度 A_{280} の値を用いて、Lambert-Beer の式から、sfGFP の濃度を計算したところ以下ようになった。

$$c_{20\text{倍希釈}} = \frac{0.467}{18910\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}} = 2.47\mu\text{M} \quad (3)$$

これは 20 倍希釈した sfGFP 溶液の濃度であるため、溶出液の sfGFP 濃度は $49.4\mu\text{M}$ となる。

4.3 His-tag 以外の精製用ペプチド tag とタンパク質 tag の例

4.3.1 C-tag

C 末端にのみ付加できるタグで、EPEA のアミノ酸配列を持つ。高濃度の SEPEA ペプチドによる競合溶出法、または塩濃度が高く（例：2M MgCl_2 ）かつ酸性条件の溶液で、タンパク質を変性させずに溶出する。[1]

4.3.2 GST-tag

分子量は約 26kDa で、211 アミノ酸残機を持つタンパク質である。発現量が多く、細胞の制御機構に関与するタンパク質である。抗 GST VHH 抗体 (Nanobody®) またはグルタチオンと強固に結合し、樹脂担体への残存は少ない傾向にある。還元型グルタチオンを用いて溶出する。GST タグによってタンパク質の溶解性が向上し、可溶性タグ融合タンパク質の発現量が増加する。GST タグは多量体からなるタンパク質複合体の精製には適していない。タグの分子量が大きいため、目的タンパク質の機能に干渉する可能性がある。したがって、精製ステップの後にタグを除去する場合がある。[1]

4.4 本実験操作以外のタンパク質濃度測定法

本実験では、紫外可視分光法、ブラッドフォード法、SDS-PAGE による濃度決定の 3 つの方法を用いてタンパク質濃度を測定した。その他の方法として、蛍光法がある。蛍光法にはタンパク質中の第一級アミンとの結合により蛍光を発する試薬を用いて定量する方法と、タンパク質をコートする界面活性剤に結合して蛍光を発する方法の 2 つがある。蛍光法の利点として、高感度である、試料が少量で済む、大掛かりな装置や熟練した技術者を必要としないことが挙げられる。[2]

第一級アミンとの反応を利用したタンパク質の定量について述べる。Fluorescamine は元々傾向を生じないが、タンパク質中の第一級アミンと速やかに反応すると、青緑色の蛍光 (極大蛍光波長: 495nm) を発する誘導体を形成する。この時の蛍光強度を測定し、標準タンパク質で作成した検量線と比較することによって、タンパク質の定量分析を行うことができる。タンパク質との反応に際して、過剰量の試薬は水との反応により速やかに蛍光を生じない産物に変換されるため、fluorescamine は溶液中のタンパク質濃度の測定に適している。一方で、トリスなどアミン系試薬により測定が妨害される場合がある。[2]

定量範囲に関して、紫外可視分光法は 50~2000 $\mu\text{g/mL}$ 、ブラッドフォード法は 50~2000 $\mu\text{g/mL}$ であるのに対し、Fluorescamine を用いた蛍光法では、0.3~13 $\mu\text{g/mL}$ であり、軽微量のタンパク質を高感度で検出する場合は蛍光法の方が適しているといえる。また、SDS-PAGE のようなゲル電気泳動法に比べて装置などが必要がなく簡便である。反応にアミン系試薬が必要な場合、測定が妨害される可能性があるため、蛍光法は使用するべきではない。[2]

4.5 488nm における mol 吸光係数

課題 4.2 から、溶出液中の sfGFP 濃度は 24.7 μM であった。また、結果 3.1 から、測定波長が 488nm での吸光度は 1.134 であった。Lambert-Beer の式から、488nm での mol 吸光係数を求めると以下ようになる。

$$\epsilon_{488} = \frac{1.134}{2.47\mu\text{M}} = 45911\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad (4)$$

文献 (Creation, Expression, Purification and Characterization of GFP) によると sfGFP の ϵ_{488} の値は 83300 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であった [3]。実測値と比べると、値が大きく外れているといえる。

計算式は吸光度のみに依存しているので、吸光度の測定値が小さく観測されたために理論値と大きく外れたと考えられる。吸光度が小さい原因として、溶出液の希釈が過剰に行われてしまったことが考えられるが、希釈は 1.5mL チューブを用いて行っており、発生する誤差は 1 μL 程度であるため、希釈による誤差は考えにくい。

4.6 SDS-PAGE の移動度から計算した分子量と理論上の分子量の不一致の原因

タンパク質の中には塩基性アミノ酸や酸性アミノ酸が極端に多いものもあり、SDS の結合量が標準的なタンパク質とは異なり、分子量から予想される移動度とは異なる挙動を示すタンパク質もある。また糖鎖などの翻訳後修飾によって見かけ上の移動度が影響されることもあり、SDS-PAGE による分子量の計算においては、このような誤差も考慮した解釈が必要となる。[4]

5 考察

5.1 ブラッドフォード法での濃度決定

結果 3.2 で示した、0.8mg/mL ブラッドフォード溶液の吸光度は図 1 からわかるように大きく外れた値をとっていると考えられる。吸光度は $\log(1/T)$ (T は透過率) であるので、吸光度が 2.063 の場合、透過率は 1 % 程度であり、定量的な信頼性が低いといえる。

外れ値を除いて溶出液の濃度を再度求める。0.8mg/mL での吸光度の値を除いて検量線を作成したところ図 5 のようになった。

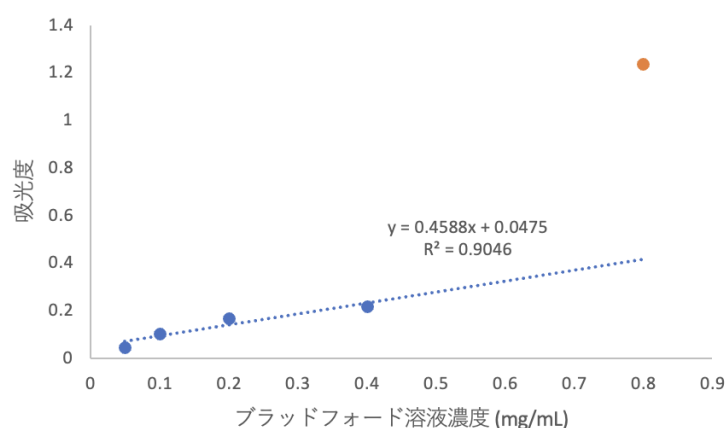


図 5: 吸光度とブラッドフォード溶液濃度の関係 (外れ値を除く)

作成した検量線から、1/50x 溶出液のブラッドフォード溶液濃度を求めたところ、0.6005mg/mL となった。これは 50 倍希釈の溶液なので、原液の重量濃度は 30.025mg/mL である。sfGFP の分子量が 28180Da であることから、原液のモル濃度は以下のように求められた。

$$c_{\text{原液}} = \frac{30.025\text{mg/mL}}{28180\text{Da}} = 106.5\mu\text{M} \quad (5)$$

外れ値を除いていない場合に比べて、2 倍近く濃度が高い結果が得られた。吸光度法でのモル濃度が 49.4 μ M、SDS-PAGE で 35.4 μ M であったことと比較すると、外れ値を除かない場合のモル濃度 (51.4 μ M) の方がより正確な濃度に近いと考えられる。

より正確に測定するため、最大の吸光度が 1.5 を超えない希釈率で測定をするべきであった。

5.2 sfGFP-H の分子量

結果 3.4 で算出した、1/40x タンパク質溶出液、1/200x タンパク質溶出液の分子量はそれぞれ 24.8kDa, 25.5kDa であった。これは sfGFP の分子量 (28180Da) と比較すると、大きく外れているといえる。これは、SDS-PAGE による定量では、タンパク質の移動度から分子量を算出し、それを標準タンパク質の移動度と比較することで濃度を算出しているため、移動度の測定誤差が濃度の算出に影響していると考えられる。

結果 3.3 で算出した、1/40x 溶出液の sfGFP 濃度は 35.4 μ M であった。結果 3.4 で算出された 1/40x タンパク質溶出液の分子量が 24.8kDa であることから、原液のモル濃度を再度計算すると以下ようになった。

$$c_{\text{原液}} = \frac{9.976\text{mg/mL}}{24.8\text{kDa}} = 40.2\mu\text{M} \quad (6)$$

5.3 それぞれの濃度測定の結果

本実験では、紫外可視分光法、ブラッドフォード法、SDS-PAGE による 3 つの方法でタンパク質濃度を測定した。それぞれの方法で測定した濃度を表 7 に示す。

表 7: それぞれの濃度測定の結果

測定方法	濃度 (μ M)
紫外可視分光法	49.4
ブラッドフォード法	51.4
SDS-PAGE	35.4 (40.8)

結果から、紫外可視分光法とブラッドフォード法により算出された濃度は比較的近い値を取ったが、SDS-PAGE による定量では他の 2 つの方法と比べて濃度が低く算出された。これは、SDS-PAGE による定量では、タンパク質の移動度から分子量を算出し、それを標準タンパク質の移動度と比較することで濃度を算出しているため、移動度の測定誤差が濃度の算出に影響していると考えられる。また、SDS-PAGE で算出した分子量では、sfGFP の分子量 (28180Da) と比較すると大きく外れていることから、移動度の測定誤差が大きいと考えられる。

しかし、紫外可視分光法では課題 4.5 で述べたように mol 吸光係数が大きくずれてしまったこと、ブラッドフォード法では吸光度が外れた値をとっており検量線の信頼度が低いと考えられるため、どの方法が最も正確な濃度を測定できたかは明確ではない。

参考文献

- [1] タンパク質精製用タグ, 株式会社プロテインテックジャパン,
<https://www.ptglab.co.jp/news/blog/tags-for-protein-purification/>
- [2] 総タンパク質の定量法, 鈴木 祥夫,
<https://www.jsac.or.jp/bunseki/pdf/bunseki2018/201801nyuumon.pdf>

- [3] Creation, Expression, Purification and Characterization of GFP
https://www.biophysik.physik.uni-muenchen.de/teaching/laboratory_courses/gfp_expression/g4b_gfp_expressionenglish_2017.pdf
- [4] SDS-PAGE のキホン！ 分子量計算, バイオ・ラッド Technical QA,
<https://pdbu-support.bio-rad.co.jp/techbrief/bulletins201804.html>