

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

1 目的

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、大腸菌破碎液 $100\mu\text{L}$ 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	大腸菌破碎液	2	15
3. カラム洗浄	IMAC B2 buffer	20	50
4. タンパク質溶出	IMAC B3 buffer	0.5×8 本	15

打ち込む際は、プランジャー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、プランジャー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ーを抜いた。

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 $100\mu\text{L}$ を取り、 $900\mu\text{L}$ 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 $20\mu\text{L}$ 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 $50\mu\text{L}$ を 1.5mL チューブに調整した。

また、溶出液 $1\mu\text{L}$ に $49\mu\text{L}$ の IMAC B3 buffer を加えた、 $1/50\times$ 溶出液と、コントロール用の $50\mu\text{LB3}$

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、 $50\mu\text{L}$ のサンプルに $200\mu\text{L}$ のブラッドフォード試薬を加え、一旦混合した。その後、 $750\mu\text{l}$ 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 ($1000\mu\text{L}$) 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	$5\mu\text{L}$	$45\mu\text{L}$
カラムの通過液	$5\mu\text{L}$	$45\mu\text{L}$
タンパク質溶出液 (1/40)	$2\mu\text{L}$	$78\mu\text{L}$
タンパク質溶出液 (1/200)	$5\mu\text{L}$ タンパク質溶出液 (1/40)	$20\mu\text{L}$

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 $4\mu\text{L}$ 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。

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。

2.4.4 sfGFP の濃度決定

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。

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。

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

3.3 sfGFP の濃度決定

図 1 に、染色されたゲルの結果を示す。

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 1 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 2 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、0.2813mg/mL であった。

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 3 に示す。

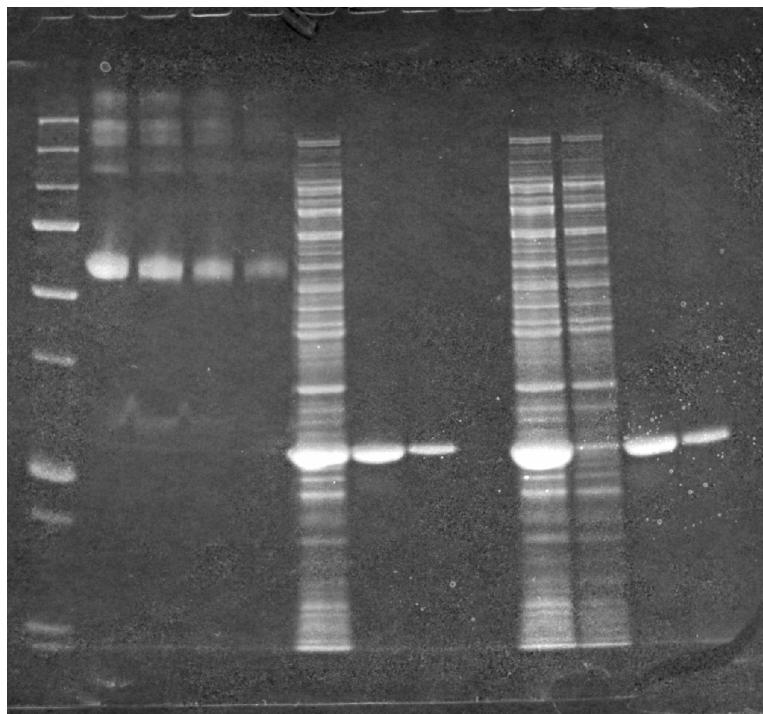


図 1: SDS-PAGE の結果

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	

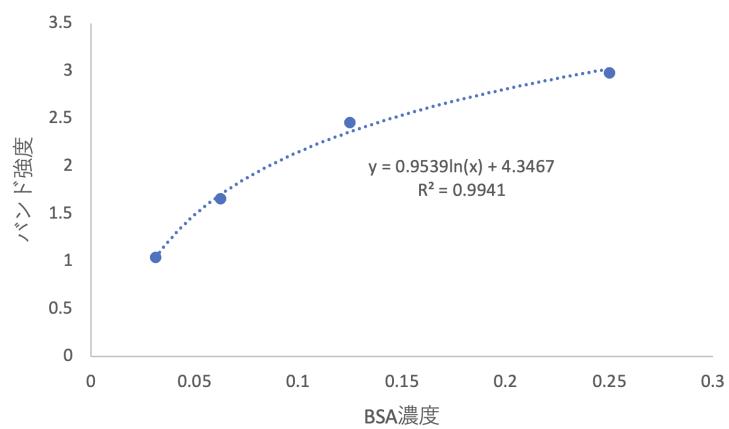


図 2: バンド強度と BSA 濃度の関係

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

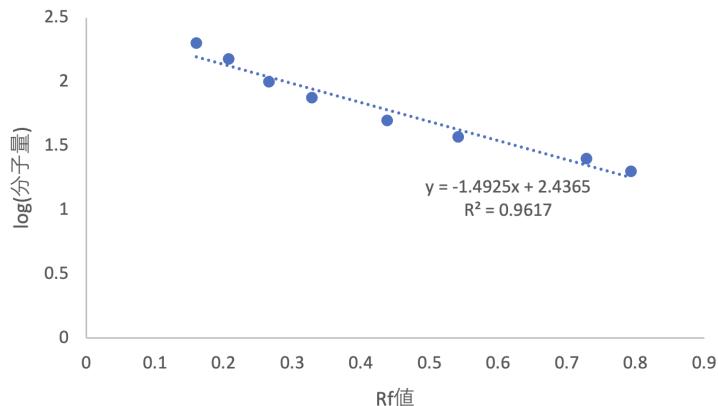


図 3: 分子量と Rf 値の関係

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 考察

5 設問/課題

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

5.2 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のようにになった。

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

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。

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

5.3.1 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 MgCl₂）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]

5.3.2 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]

5.4 本実験操作以外のタンパク質濃度測定法

5.5 488nm における mol 吸光係数

5.6 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

6 参考文献

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/>