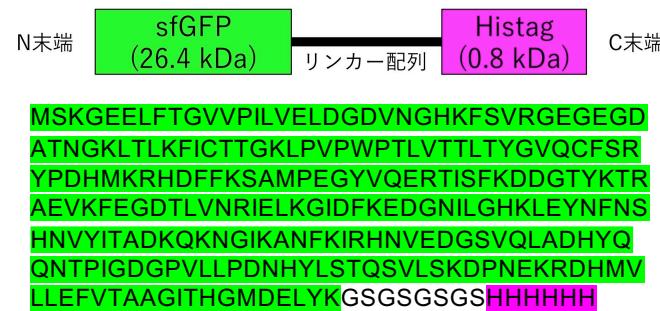


与えられた塩基配列から
sfGFP-H の分子量と
mol 吸光係数を計算

導出過程（全体）

(5')...ATGCAAAAGCGAAGAACGTGTTACGGGTGTGGTGCCGATCCTGGTGGAACT
GGACGGTGATGTCACCGTCATAAAATTCAAGCGTGCAGCGGGGAAGGTGAAGGGCATG
CGACCAATGGTAACCTGACCCCTGAAATTTATTCAGCACCACCGGTAACACTGCCGGTGC
GTGGCCGACCCCTGGTACCCACCTGACCATGGTGTGCAGTGTTTACCGCTTATCC
GGATCACATGAAACGCCATGATTCTTAAAAGCGCGATGCCGGAAAGGTTATGTTCAAG
GAACGTACCATCAGCTTAAAGATGATGGCACCTATAAAACCCGCGCCGAAAGTGAAT
TTGAAGGTGATACCCCTGGTAAACCGTATTGAACGGCATCGATTCAAAGAAGA
TGGTAACATCCTGGGCCATAAACTGGAATACAACACTTCAACAGCCATAACGTGTACATCA
CCGGGGATAAAACGAAAAACCGTATCAAAGCCAACCTCAAATCCGCCATAATGTGGGA
AGATGGCAGCGTTCAAGCTGGCCGATCATTATCAGCAGAACACCCCGATTGGTGTAC
CCCGGTGCTGCTGCCGATAATCATTATCTGAGCACCCAGAGCGTTCTGAGCAAAGA
TCCGAACGAAAACCGTACATGGTCTGCTGGAATTGGTACGGCGGCTGGCAT
TACGCACGGTATGGTGAACGTATAAAAGGATCCGGTAGTGGATCTGGATCACCAT
CATCACCAACCACTA...(3')



計算結果

分子量 : 28.2 kDa

mol吸光係数(280 nm) : 18910 /M·cm

① sfGFP-Hの塩基配列



ExPasy
Translate tool

② sfGFP-Hのアミノ酸配列



ExPasy
ProtParam

③ sfGFP-Hの分子量・mol吸光係数

ExPasyを用いて塩基配列をアミノ酸配列に変換しsfGFP-Hの分子量およびmol吸光係数を求める。

塩基配列からアミノ酸配列を調べる

(1) ExPasyのサイト(<https://www.expasy.org/>)にアクセス

(2) 上記サイトでTranslateを検索し、Translate ツールをクリック

The screenshot shows the ExPasy homepage with a search bar containing 'Translate'. Below the search bar, there is a message: 'You can also query "Translate" into a selection of SIB databases in parallel' followed by a '+' sign. Under the search bar, it says '1 resource found for Translate'. A box contains the 'Translate' link, which is highlighted with a blue arrow.

(3) Browse the resource websiteをクリックして、Translate toolを開く

The screenshot shows the 'Translate' resource website. At the top, there are three icons: Genomics (blue), Proteins & Proteomes (red), and Software tool (green). Below the icons, it says 'Translation of a nucleotide (DNA/RNA) sequence to a protein sequence.' At the bottom left, there is a button labeled 'Browse the resource website' with a blue border, which is highlighted with a blue arrow.

塩基配列からアミノ酸配列を調べる

(4) sfGFP-Hの塩基配列を貼り付け、TRANSLATE!をクリック

Translate tool

Translate is a tool which allows the translation of a nucleotide (DNA/RNA) sequence to a protein sequence.

DNA or RNA sequence

```
ATGCAAAAGCGAAGAACGTGTTACGGGTGTGGTG  
CCGATCTGGTGAACCTGGACGGTGTGCAACGGTC  
ATAAATTCACTCGTGGCGCGAAGGTGAAGGGATG  
CGACCAATGGTAAACTGCCGTGCGCCTGACCGTGC  
CACCGTAAACTGCCGTGCGCCTGACCGTGC  
TACCAACCTGACCTATGGTGTGCAGTGTAGCCGT  
TATCCGGATCACATGAAACGCCATGATTTTAA  
GCGGATGCCGAAGGTTATGTTCAAGGAACGTACCAT  
CAGCTTAAAGATGATGGCACCTATAAAACCGCGCC  
GAAGTGAATTGAAAGGTGATACCTGGTAACCGT  
TTAACCTGAAACCGCATGATTCGAAACGATGTA
```

Output format

- Verbose: Met, Stop, spaces between residues
- Compact: M, -, no spaces
- Includes nucleotide sequence
- Includes nucleotide sequence, no spaces

DNA strands

- forward reverse

Genetic codes - See NCBI's genetic codes

Standard

reset **TRANSLATE!** ←

(5) 5'3' Frame 1のアミノ酸配列をコピー

Results of translation

- Open reading frames are highlighted in red
- Select your initiator on one of the following frames to retrieve your amino acid sequence

Download all the translated frames

5'3' Frame 1

```
MSKGEELFTGVVPIIIVELDGDVNNGHKFNSVRGELEGDAATNGKLTLKFICTTGKLPVFWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMRHDFFKSAMPEGVVQERTISFKDDGTYXTRAEVKPEGDTLVNRIELKGIDFKEGNILGH  
KLEYNFNSHNVYITADKQKNGIRANFKIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGFVLLPDNHYLSTQSVLSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYKGSGSGSGSHHHHHH-
```

5'3' Frame 2

```
CQKAKNCILRVWCRSNWNWTVMSTIVINSACAARKVKAMRPVN-P-NLFAPPVNCRGRPWLPF-PMVCSVLA VIRIT-NA MISLKARCRKVMFRNVPSALKMMAPIKPKP-NLKVIPWLTVLN-KASISKRMVISWAI  
NWNTSTAITCTSPRINRKIVSKPTSKSAINWKMRAFSWFIIISRTFLVMARCCCRITI-APIAF-AKIRTKNWTWSWNL-RRLALRTWVNCIKDPVVDLDHTTITTT
```

5'3' Frame 3

←

アミノ酸配列から分子量とmol吸光係数を求める

- (1) Exasyのサイト(<https://www.expasy.org/>)で ProtParamを検索し Browse the resource website でProtParam toolを開く
- (2) アミノ酸配列をペーストし、Compute pramatersをクリック

ProtParam tool

ProtParam (References / Documentation) is a tool which allows the computation of various physical and chemical parameters for a given protein stored in acid composition, atomic composition, extinction coefficient, estimated half-life, instability index, aliphatic index and grand average of hydropathicity (GRAVY).

Please note that you may only fill out **one** of the following fields at a time.

Enter a Swiss-Prot/TrEMBL accession number (AC) (for example P05130) or a sequence identifier (ID) (for example KPC1_DROME):

Or you can paste your own amino acid sequence (in one-letter code) in the box below:

```
MSKGEELEFTGVPPIVLELDDGVNGHKFVSRGEEDATNGKLTFLKICITGGKLPVPPPTLVTLTYGVOCFSRYPDHMKRHDFKSAMPEGYDERTISFKDDGTYKTRAEVKFEQDTLNVRIELKGIDFKEDEGNILGLHKEYNFNSHNYYTADKOKNCIGKANFKIRHNVEDGSVOLADHYQONTPIGDGPVLPPDNHYLSTOSVLSKDNPKRDHMLLEPVAAGITHGMDELYKGSGSGSGSHHHH
```

RESET Compute parameters



- (3) Molecular weightとExtinction coefficinentsが算出できる

* 今回はDTT を用いて還元しているため、ジスルフィド結合のないmol吸光係数である18910を用いる。

検索結果

Number of amino acids: 252																																																																											
Molecular weight: 28180.58																																																																											
Theoretical pI: 6.23																																																																											
Amino acid composition: CSV format																																																																											
<table><tr><td>Ala (A)</td><td>0</td><td>3.2%</td></tr><tr><td>Arg (R)</td><td>8</td><td>3.1%</td></tr><tr><td>Asn (N)</td><td>13</td><td>5.2%</td></tr><tr><td>Asp (D)</td><td>18</td><td>7.1%</td></tr><tr><td>Cys (C)</td><td>2</td><td>0.8%</td></tr><tr><td>Gln (Q)</td><td>7</td><td>2.8%</td></tr><tr><td>Glu (E)</td><td>16</td><td>6.3%</td></tr><tr><td>Gly (G)</td><td>28</td><td>10.3%</td></tr><tr><td>His (H)</td><td>16</td><td>6.3%</td></tr><tr><td>Ile (I)</td><td>11</td><td>4.4%</td></tr><tr><td>Leu (V)</td><td>20</td><td>7.9%</td></tr><tr><td>Lys (K)</td><td>20</td><td>7.9%</td></tr><tr><td>Met (M)</td><td>5</td><td>2.0%</td></tr><tr><td>Ph (F)</td><td>12</td><td>4.8%</td></tr><tr><td>Pro (P)</td><td>10</td><td>4.0%</td></tr><tr><td>Ser (S)</td><td>14</td><td>5.6%</td></tr><tr><td>Thr (T)</td><td>19</td><td>7.5%</td></tr><tr><td>Trp (W)</td><td>1</td><td>0.4%</td></tr><tr><td>Tyr (Y)</td><td>9</td><td>3.6%</td></tr><tr><td>Val (Y)</td><td>18</td><td>7.1%</td></tr><tr><td>Pyl (O)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr><tr><td>Sec (U)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr><tr><td>(B)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr><tr><td>(Z)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr><tr><td>(X)</td><td>0</td><td>0.0%</td></tr></table>	Ala (A)	0	3.2%	Arg (R)	8	3.1%	Asn (N)	13	5.2%	Asp (D)	18	7.1%	Cys (C)	2	0.8%	Gln (Q)	7	2.8%	Glu (E)	16	6.3%	Gly (G)	28	10.3%	His (H)	16	6.3%	Ile (I)	11	4.4%	Leu (V)	20	7.9%	Lys (K)	20	7.9%	Met (M)	5	2.0%	Ph (F)	12	4.8%	Pro (P)	10	4.0%	Ser (S)	14	5.6%	Thr (T)	19	7.5%	Trp (W)	1	0.4%	Tyr (Y)	9	3.6%	Val (Y)	18	7.1%	Pyl (O)	0	0.0%	Sec (U)	0	0.0%	(B)	0	0.0%	(Z)	0	0.0%	(X)	0	0.0%
Ala (A)	0	3.2%																																																																									
Arg (R)	8	3.1%																																																																									
Asn (N)	13	5.2%																																																																									
Asp (D)	18	7.1%																																																																									
Cys (C)	2	0.8%																																																																									
Gln (Q)	7	2.8%																																																																									
Glu (E)	16	6.3%																																																																									
Gly (G)	28	10.3%																																																																									
His (H)	16	6.3%																																																																									
Ile (I)	11	4.4%																																																																									
Leu (V)	20	7.9%																																																																									
Lys (K)	20	7.9%																																																																									
Met (M)	5	2.0%																																																																									
Ph (F)	12	4.8%																																																																									
Pro (P)	10	4.0%																																																																									
Ser (S)	14	5.6%																																																																									
Thr (T)	19	7.5%																																																																									
Trp (W)	1	0.4%																																																																									
Tyr (Y)	9	3.6%																																																																									
Val (Y)	18	7.1%																																																																									
Pyl (O)	0	0.0%																																																																									
Sec (U)	0	0.0%																																																																									
(B)	0	0.0%																																																																									
(Z)	0	0.0%																																																																									
(X)	0	0.0%																																																																									
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 34																																																																											
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 28																																																																											
Atomic composition:																																																																											
Carbon C 1250																																																																											
Hydrogen H 1927																																																																											
Nitrogen N 349																																																																											
Oxygen O 382																																																																											
Sulfur S 7																																																																											
Formula: C ₁₂₅₀ H ₁₉₂₇ N ₃₄₉ O ₃₈₂ S ₇																																																																											
Total number of atoms: 3815																																																																											
Extinction coefficients:																																																																											
Extinction coefficients are in units of M ⁻¹ cm ⁻¹ , at 280 nm measured in water.																																																																											
Ext. coefficient 18910																																																																											
Abs 0.1% (= 1 g/l) 0.671, assuming all pairs of Cys residues form cystines																																																																											
Ext. coefficient 18910																																																																											
Abs 0.1% (= 1 g/l) 0.671, assuming all Cys residues are reduced																																																																											
Estimated half-life:																																																																											
The N-terminal of the sequence considered is M (Met).																																																																											
The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).																																																																											
>10 hours (yeast, in vivo).																																																																											
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).																																																																											

実験結果から
sfGFP-H の分子量および
タンパク質濃度を計算

事前準備 – ImageJのダウンロード

(1) ImageJのサイト(<https://imagej.nih.gov/ij/>)にアクセスし、Downloadをクリック

(2) 各OSに対応するものをクリックし、ダウンロード

Download

Platform Independent

To install ImageJ on a computer with Java pre-installed, or to upgrade to the latest full distribution (including macros, plugins and LUTs), download the **ZIP archive** (6MB) and extract the ImageJ directory. Use the *Help>Update ImageJ* command to upgrade to newer versions.

Mac OS X

Download **ImageJ bundled with Java 1.8.0_172** (may need to work around *Path Randomization*). Instructions. With M1 (ARM) Macs, download **ImageJ bundled with Zulu OpenJDK 13.0.6**.

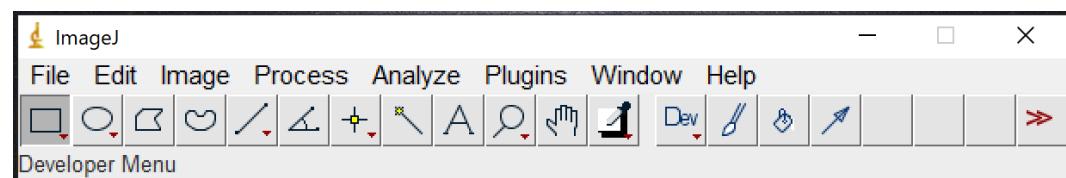
Linux

Download **ImageJ bundled with Java 1.8.0_172** (82MB).
[Instructions.](#)

Windows

Download **ImageJ bundled with 64-bit Java 1.8.0_172** (100MB).
[Instructions.](#)

(3) ダウンロードしたzipファイルを展開
ImageJ.exeを開き動作確認
右のようなものが開けばOK



タンパク質濃度の測定

○輝度値からタンパク質の濃度を測定する

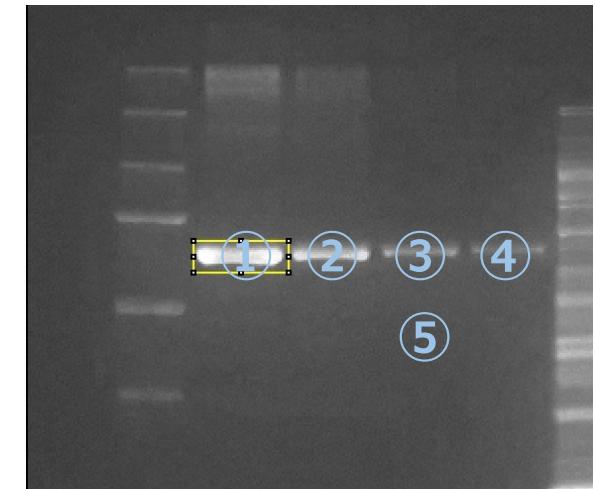
(1) Analyze→Set Measurementを選択し、AreaとIntegrated Densityにチェックを入れておく。
(Integrated Density:輝度の平均値×面積の値。バンド強度を表す。)

(2) 四角ツールを選択し、レーン2の最も明るいバンドを囲み、Measureを行なう。
(他のレーンのバンドがなるべく入らないようにする)

(3) 矢印キーで選択範囲を移動させ、各レーンのバンド(②～④)と、
バックグラウンド測定用に近くの適当な位置(⑤)にMeasureを行なう。

(4) 各バンドのIntDenの値からバックグラウンド分を引いた値を用いて、
バンド強度とBSA濃度についての検量線を作成する。

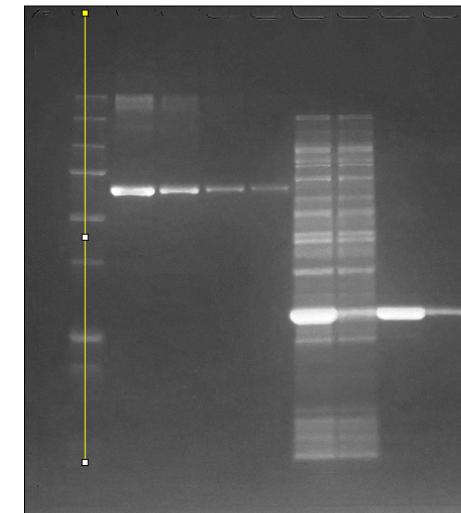
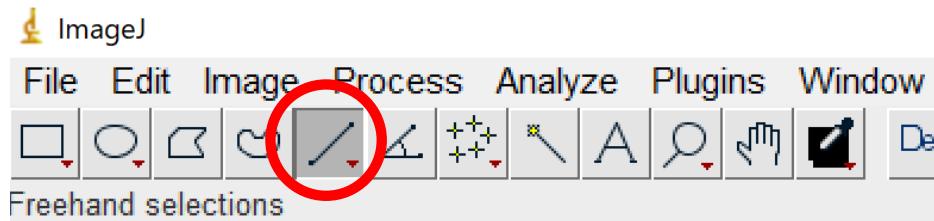
(5) 同様に溶出液のバンドとそれに対応するバックグラウンドに対してMeasureを行ない、
溶出液のsfGFP濃度を計算する。



分子量の測定

○泳動距離からタンパク質の分子量を測定する

(1) 直線ツールを選択し、マーカーのレーン上にゲルの上端から泳動先端まで直線を引く。

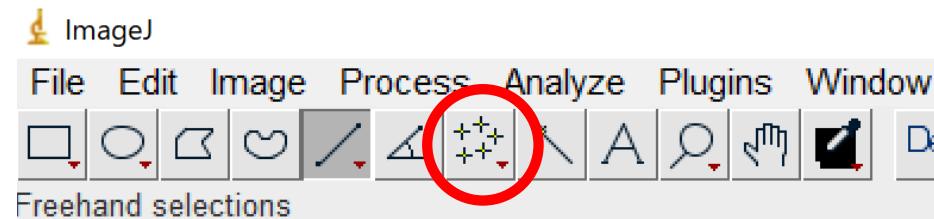
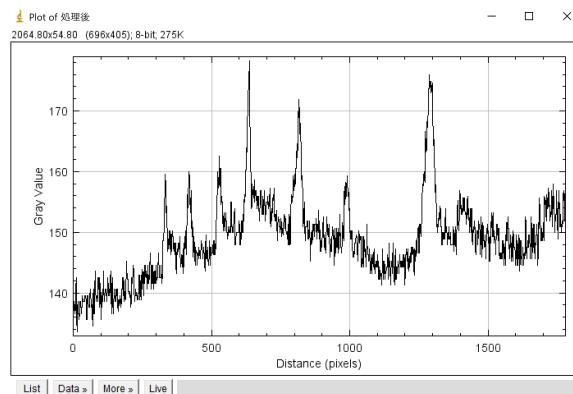


(2) 直線を引いた状態でAnalyze→Measure を選択する(Ctrl+Mでショートカット可能)と、Resultsというウィンドウが表示される。
ここに書かれたLengthの値が直線の長さなので、この値をExcelファイルに記録しておく。

分子量の測定

(3) Analyze→Plot Profile を選択し、下図のようなウィンドウを表示させる。

(4) 右下図の○で囲まれたツールを右クリックで選択し、Multi-point Toolを選択する。
この状態でプロットのピークを左クリックしていくき、Analyze→Measure を選択する(Ctrl+M)。



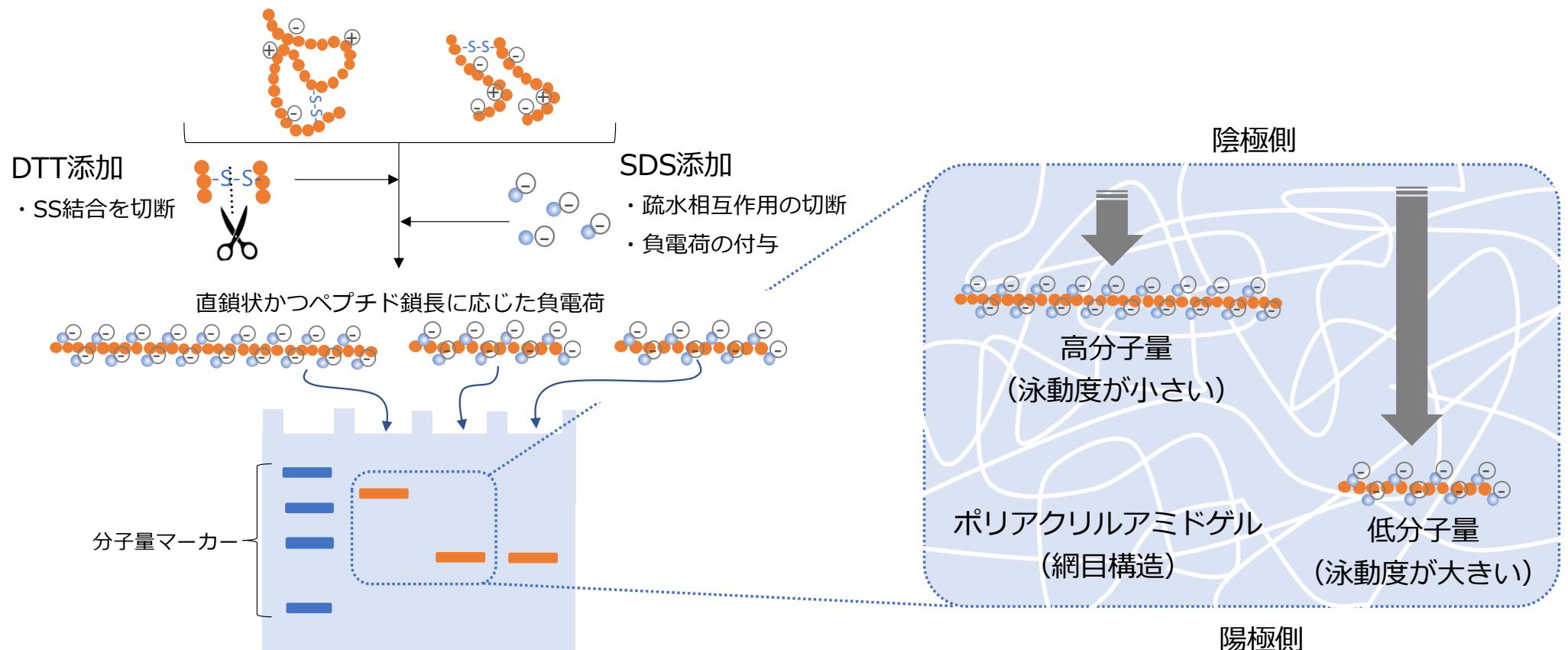
	Area	Mean	Min	Max	X	Y
1	0.000	0	0	0	332.267	158.227
2	0.000	0	0	0	419.783	159.242
3	0.000	0	0	0	529.550	159.648
4	0.000	0	0	0	636.350	177.645
5	0.000	0	0	0	814.350	171.285
6	0.000	255	255	255	989.383	157.348
7	0.000	0	0	0	1286.050	174.262

(5) 出力されたResultのXの値が始点から各バンドまでの距離なので、これをExcelにコピーし、Rf値を算出して検量線を作成する。

(6) 直線ツールを用いてMeasureからsfGFPの泳動距離を測定し、検量線から分子量を算出する。

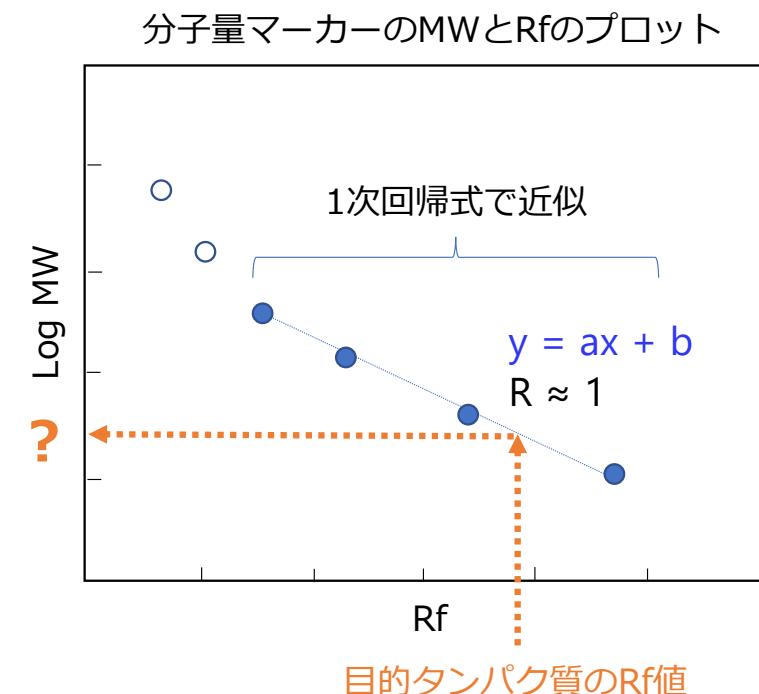
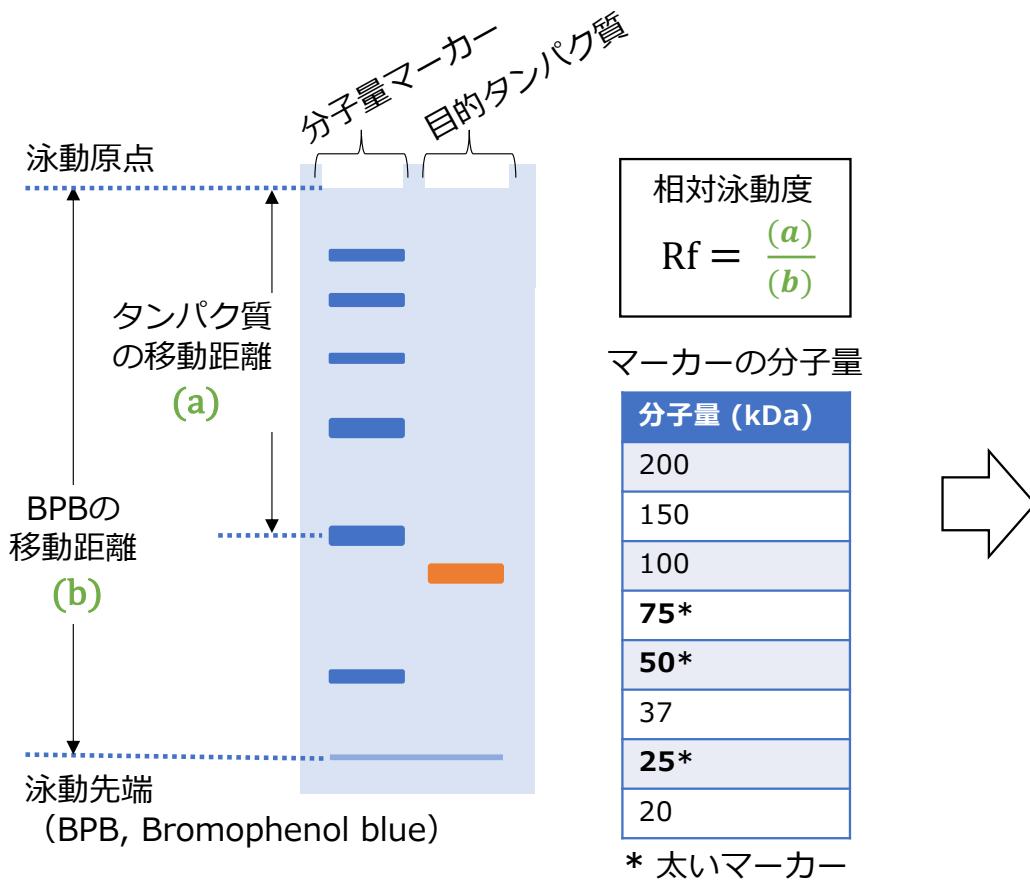
SDS-PAGEによる分子量の決定 – 原理の振り返り

- 分子量の差を利用してタンパク質を分離する手法
- 還元剤DTTによりタンパク質のジスルフィド結合を切断し、界面活性剤SDSにより疎水相互作用を切断することで、タンパク質を直鎖状に伸ばし、かつ大量の負電荷を付与する
- 網目構造を持ったポリアクリラミドゲルで電気泳動（PAGE）を行うと、泳動度が分子量に依存する。よって、異なる分子量のタンパク質を分離できる。また、マーカーを指標に分子量の推定もできる



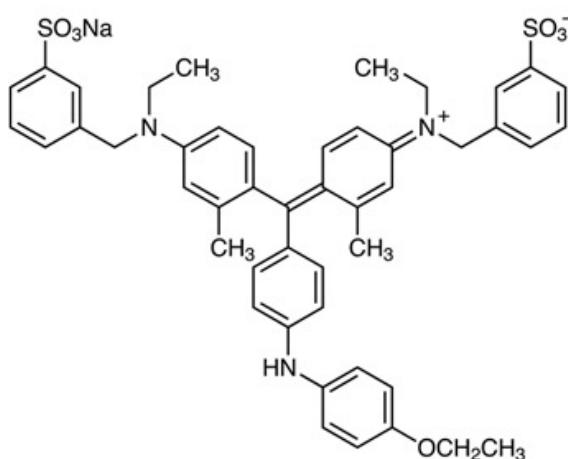
SDS-PAGEによる分子量の決定 – 解析手順

- ① 分子量マーカーと目的タンパク質の相対泳動度 Rf値を計測する（定規やImageJ使用）
- ② 分子量マーカーの分子量とRf値のプロットを作成し、近似式を算出する
- ③ 近似式から目的タンパク質の分子量を決定する

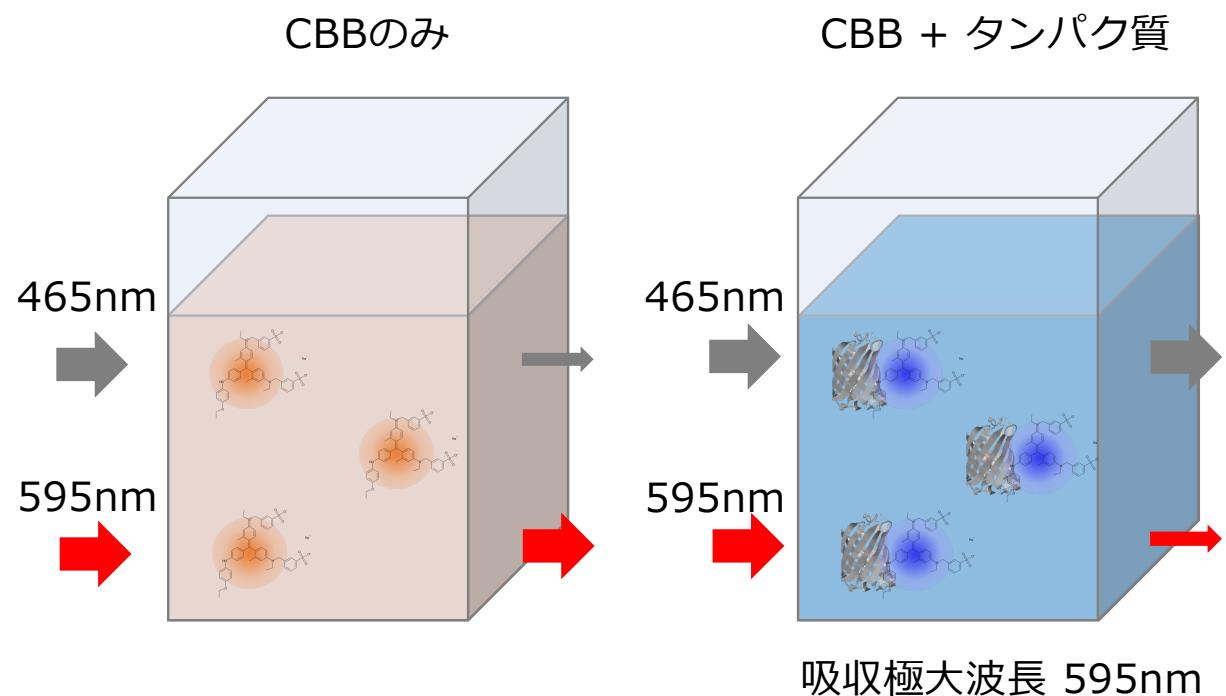


ブラッドフォード法によるタンパク質濃度の定量 – 原理の振り返り

- CBB (Coomassie brilliant blue) G-250が酸性条件下でタンパク質の塩基性アミノ酸に結合し、吸収極大波長が465nmから595nmにシフトすることを利用し、タンパク質を定量する手法
 - ランバート・ベールの法則 ($A = \epsilon cl$, A:吸光度, c:濃度, l:光路長) より吸光度と濃度が比例関係であることを基に検量線を用意することで、吸光度 (595nm) から濃度を算出できる



Coomassie Brilliant Blue G-250



ブラッドフォード法によるタンパク質濃度の定量 — 解析手順

- ① BSA希釈系列の重量濃度 (mg/mL) と吸光度 (595nm) のプロットを作成し、近似式を求める
- ② 近似式から希釈済みの目的サンプルの重量濃度を算出する
- ③ ②の濃度に希釈倍数を乗じ、原液の重量濃度を求める
- ④ sfGFP-Hの分子量が28,180 Daであることを基に、モル濃度（重量濃度÷分子量）を算出する

