

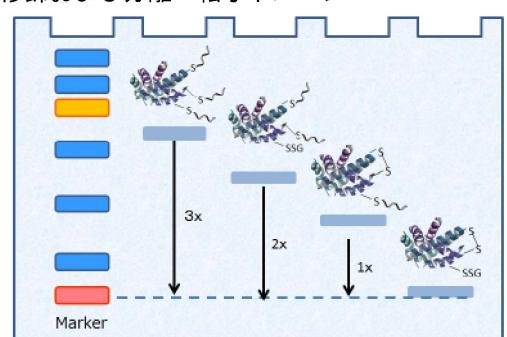
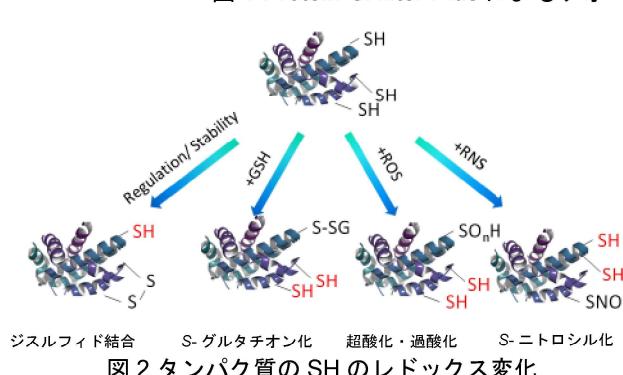
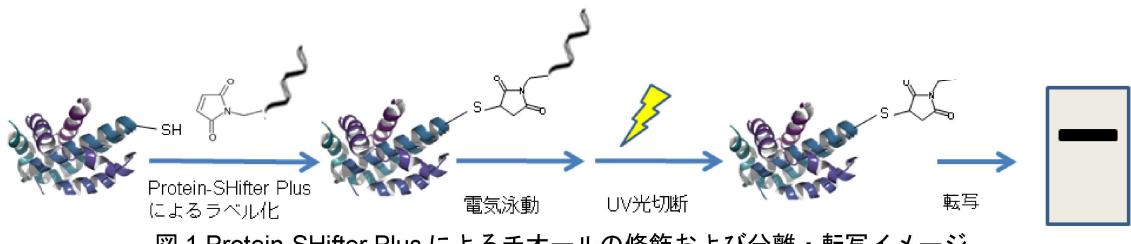
# - SulfoBiotics -

## Protein Redox State Monitoring Kit Plus Technical Manual

### はじめに

タンパク質のチオール基修飾は、代表的な翻訳後修飾の一つであり、生体内のレドックス変化に応答して生じます。チオール基の翻訳後修飾によるタンパク質の機能制御を理解するためには、個々のチオール基の酸化還元状態を検出することが必要不可欠です。

- SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus を用いて、タンパク質のチオール基の数を電気泳動法により可視化することが可能です。マレイミド基を有する Protein-SHifter Plus はタンパク質のチオール基と結合し、1 分子の Protein-SHifter Plus が結合することで、ラベル化されたタンパク質は分子質量約 15 kDa 増加したバンドとして分離・検出されます。更に、Protein-SHifter Plus は光分解機能を有するため、電気泳動後のゲルに UV 光を照射することで、ラベル化されたタンパク質から切り離されます。そのため、ラベル化する前と同様にウェスタンプロットに適用できます。（\* ラベル化の操作は動物細胞用に最適化されています。）



### キット内容

	20 samples
Protein-SHifter Plus	× 20
Reaction Buffer A	× 4
Reaction Buffer B	× 4
Lysis Buffer	× 4

### 保存条件

0 - 5 °Cにて保存してください。

### 必要なもの (キット以外)

- マイクロピペット (10 µl、100-200 µl)
- マイクロチューブ (1.5 ml)
- 10 (w/v) % TCA (トリクロロ酢酸) 水溶液
- 電気泳動関連試薬類 [ゲル、Loading Buffer、タンパク質染色試薬 (CBB:Coomassie Brilliant Blue など) ]
- ウェスタンプロット関連試薬類 [転写装置、PVDF 膜、光切断装置 (トランシルミネーター) など]
- PBS、遠心装置 (サンプル調製用)
- 70 (v/v) % EtOH 水溶液
- アセトン
- インキュベーター (37 °C)

### 使用上のご注意

- ・輸送中の振動等により、内容物がチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がありますので、遠心してからご使用ください。
- ・Reaction Buffer B は内容物が析出している場合があります。その際は、40-50°Cで加温溶解して使用してください。
- ・ラベル化の操作は動物細胞用に最適化されています。

### 使用方法

#### サンプル調製方法 (付着細胞用)

1. 細胞数として  $5 - 10 \times 10^5$  cells/well (6-well プレート) を用意する。  
※サンプルのタンパク質濃度は 0.1 - 1 mg/ml、またはチオール濃度として 100 µmol/l 以下を推奨します。推奨範囲を超える場合には十分なラベル化ができない可能性があります。  
※ DTNB を用いたチオール濃度の定量方法は、ホームページ (SB12 の Q&A[ 使用するサンプルの濃度 ] ) をご参照ください。
2. 培地を吸引除去し、冷却した PBS 500 µl/well で 2 回洗浄する。
3. 冷却した 10 % TCA 水溶液を 500 µl/well 加え、プレートを氷浴上で 30 分間静置する。  
※本操作により、タンパク質チオール基の酸化防止および小分子チオール化合物 (グルタチオンなど) の除去を行います。
4. スクレーパーで細胞を剥がし、チューブに回収する。
5. 1,000 × g、3 分間遠心し、上清を除去する。
6. 冷却したアセトン 500 µl/tube を加え、再度 1,000 × g、3 分間遠心し、上清を除去する。(2 回行う。)
7. 冷却した 70% EtOH 水溶液を 500 µl/tube 加え、再度 1,000 × g、3 分間遠心し、上清を除去する。
8. Lysis Buffer 100 µl/tube を加え、超音波により細胞ペレットを溶解する。  
※細胞溶解に用いる Lysis Buffer は実験系に応じてプロテアーゼインヒビターを加えてください。  
※溶解後のサンプルはすぐに Protein-SHifter Plus によるラベル化反応に使用してください。

### サンプル調製方法(浮遊細胞用)

- 細胞数として  $5 - 10 \times 10^5$  cells/tube を用意する。  
※サンプルのタンパク質濃度は 0.1 - 1 mg/ml、またはチオール濃度として  $100 \mu\text{mol/l}$  以下を推奨します。推奨範囲を超える場合には十分なラベル化ができない可能性があります。
- DTNB を用いたチオール濃度の定量方法は、ホームページ (SB12 の Q&A [ 使用するサンプルの濃度 ]) をご参照ください。
- $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去する。
- 冷却した  $500 \mu\text{l}$  PBS を加え、ピペッティングで搅拌後  $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去する。
- 冷却した 10% TCA 水溶液を  $500 \mu\text{l}$  加え、ピペッティングで搅拌後、チューブを氷浴上で 30 分間静置する。  
※本操作により、タンパク質チオール基の酸化防止および小分子チオール化合物 (グルタチオンなど) の除去を行います。
- $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去する。
- 冷却したアセトン  $500 \mu\text{l}$  を加え、再度  $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去する。(2 回行う。)
- 冷却した 70% EtOH 水溶液を  $500 \mu\text{l}/\text{tube}$  加え、再度  $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去する。
- Lysis Buffer  $100 \mu\text{l}/\text{tube}$  を加え、超音波により細胞ペレットを溶解する。  
※細胞溶解に用いる Lysis Buffer は実験系に応じてプロテアーゼインヒビターを加えてください。  
※溶解後のサンプルはすぐに Protein-SHifter Plus によるラベル化反応に使用してください。

### ラベル化及び解析方法

- Protein-SHifter Plus に Reaction Buffer A を  $4 \mu\text{l}$  加え、ピペッティングでよく混合する。  
※ Protein-SHifter Plus を Reaction Buffer A,B で溶解すると、マレイミド基の分解が進みます。溶解後はすぐにラベル化操作を行ってください。
- 上記で調製したサンプル  $2 \mu\text{l}$  を加え、ピペッティングでよく混合する。
- Reaction Buffer B を  $4 \mu\text{l}$  加え、ピペッティングでよく混合する。  
※ Reaction Buffer B を混合することで白濁することがあります。その場合、40-50°Cで加温溶解してください。  
※溶液が泡立った場合は、 $7,000 \times g$ 、1-2 分間遠心にかけて消泡してください。
- $37^\circ\text{C}$ 、30 分間反応させる。  
※ラベル化したサンプルはすぐに電気泳動実験にご使用ください。
- 操作 4 のサンプル溶液に Loading buffer を適量添加し、ゲル電気泳動に使用する。  
※ Loading buffer は本キットに含まれていません。(5x) Loading buffer を使用する場合には、サンプル溶液  $10 \mu\text{l}$  に対し、(5x) Loading buffer  $2 \mu\text{l}$  を添加後、全量をゲルにアプライしてください。
- ゲルをトランスイルミネーターで 10 分間 UV(302 nm) 光を照射する。  
※ゲルが乾燥しないように、ガラスに挟んだ状態で操作を行ってください。
- 操作 6 のゲルを PVDF 膜に転写した後、抗体を用いて目的タンパク質を検出する。

### 実験例

#### HeLa 細胞中 GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) の酸化剤に対する応答

- HeLa 細胞を 6-well プレートに  $5 \times 10^5$  cell/well 播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで一晩培養した。
- 培地を吸引除去し、PBS ( $37^\circ\text{C}$ )  $500 \mu\text{l}/\text{well}$  を加え洗浄し、吸引除去した。
- 1 mmol/l Diamide [1,1'-Azobis(*N,N*-dimethylformamide)] または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を  $500 \mu\text{l}/\text{well}$  添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 10 分間静置した。
- 溶液を吸引除去し、冷却した 10% TCA 水溶液を  $500 \mu\text{l}/\text{well}$  加え、プレートを氷浴上で 30 分間静置した。
- スクレーパーで細胞を剥がし、 $1.5 \text{ ml}$  マイクロチューブに回収した。
- $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去した。
- 冷却したアセトンを  $500 \mu\text{l}/\text{tube}$  加え、 $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去した。
- 操作 7 をもう一度繰り返した。
- 冷却した 70% EtOH 水溶液を  $500 \mu\text{l}/\text{tube}$  加え、再度  $1,000 \times g$ 、3 分間遠心し、上清を除去した。
- Lysis Buffer (1% プロテアーゼインヒビター含)  $100 \mu\text{l}$  を加え、超音波により細胞ペレットを溶解した。
- Protein-SHifter Plus に Reaction Buffer A を  $4 \mu\text{l}$  加え、ピペッティングでよく混合した。
- 操作 10 の溶液  $2 \mu\text{l}$  を操作 11 の溶液に加え、ピペッティングでよく混合した。
- Reaction Buffer B  $4 \mu\text{l}$  を操作 12 の溶液に加え、ピペッティングでよく混合した。
- $37^\circ\text{C}$ 、30 分間反応させた。
- Loading Buffer (10 (w/v) % sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 (v/v) % glycerol, 0.2 mol/l Tris-HCl (pH 6.8), 0.05 (w/v) % bromophenol blue)  $2 \mu\text{l}$  を操作 14 の溶液に加え、ピペッティングでよく混合した。
- 操作 15 の溶液を SDS-ポリアクリルアミドゲル (15%) 電気泳動に使用した。
- 電気泳動後のゲルをトランスイルミネーターで 10 分間 UV (302 nm) 照射した。
- ゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写した。
- PVDF 膜に転写された GAPDH を抗 GAPDH 抗体を用いて検出した。

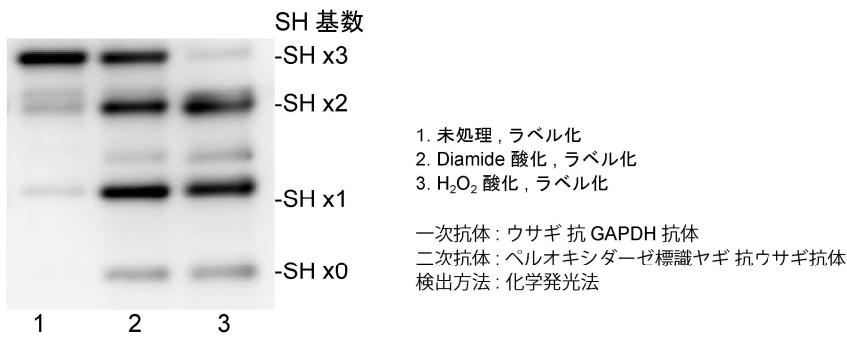


図 4 HeLa 細胞中の GAPDH タンパク質の SH 状態の可視化

### 参考文献

- Satoshi Hara, Tatsuya Nojima, Kohji Seio, Masasuke Yoshida, Toru Hisabori, "DNA-maleimide: An improved maleimide compound for electrophoresis-based titration of reactive thiols in a specific protein" *Biochim. Biophys. Acta*, **2013**, 1830(4) 3077.
- Satoshi Hara, Yuki Tatenaka, Yuya Ohuchi, Toru Hisabori, "Direct determination of the redox status of cysteine residues in proteins *in vivo*", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, 456(1) 339.

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.

30W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850 U.S.A.

Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687

URL: [www.dojindo.com](http://www.dojindo.com)

<委託製造元>

株式会社 同仁化学研究所

熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202

Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:[www.dojindo.co.jp/](http://www.dojindo.co.jp/)

ドージン・イースト (東京) Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650