

Code.No.160-0479-0

Z-drive refold screening kit

説明書

1. はじめに

組換えタンパク質を産生する系には、大腸菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞などを用いる、様々な系が知られています。この中で、大腸菌産生系は簡便に大量のタンパク質が得られるという長所がありますが、可溶性のタンパク質が生成するとは限らず、菌体内で封入体（インクルージョンボディ）と呼ばれる不溶性の凝集物を形成することがよくあります。このような場合、タンパク質変性剤である塩酸グアニジンを含むバッファーで封入体を可溶化した後、タンパク質のリフォールディングを行うために、透析や希釈が行われています。リフォールディング効率が低い場合、手間と時間をかけてバッファー条件などのリフォールディング条件を設定する必要があります。

本キットは、ゼオライトに可溶化した封入体（変性タンパク質）を結合させ、ゼオライトから遊離させる際にタンパク質のリフォールディングを行います。ゼオライトは結晶中に細孔を持つアルミノ珪酸塩で、塩酸グアニジン溶液のようなイオン強度が高い溶液中でもタンパク質を速やかに吸着・保持する性質を有します。原理は、封入体を塩酸グアニジン含有バッファーで可溶化した後、ゼオライトと混合することによって、タンパク質をゼオライトに吸着させます。ゼオライトは固体であるので、タンパク質の吸着したゼオライトを少量のバッファーで洗浄することによって、簡単に塩酸グアニジンを除去することができます。ゼオライトに吸着したタンパク質は、ポリエチレングリコールを含む緩衝液によって溶出されます。また、リフォールディングは、ポリエチレングリコールの立体的な排除効果により、タンパク質がゼオライトから遊離する際に起こります。

効率的にリフォールディングを行うことのできる緩衝液の最適化を迅速かつ簡便に行うことができます。本製品1キットで8通りの条件検討ができます。特長として、リフォールディングの前に変性剤を除去するため、タンパク質を高濃度で回収できます。また、ゼオライトは安定な為、リフォールディング促進剤などを添加することも可能です。

2. 内容（8回分、もしくは8条件分）

①. 1 M Tris-HCl (pH7.5)	1.5 mL
②. 1 M Tris-HCl (pH8.5)	0.5 mL
③. 10% PEG 20000	1 mL
④. 2 M アルギニン (pH7.5)	1.6 mL
⑤. 2 M アルギニン (pH8.5)	1.6 mL
⑥. 10% Tween 20	0.5 mL
⑦. 4 M NaCl	1.5 mL × 2 本
⑧. 4 M DTT	0.1 mL
⑨. 8 M 塩酸グアニジン	1.5 mL × 6 本
⑩. 200 mM システイン / 20 mM シスチン溶液	0.6 mL
⑪. ゼオライト入りチューブ	8 本

蒸留水（超純水）の準備をお願いします。

溶解後、沈殿が生じた場合は、37°Cに加温して完全に沈殿を溶解してからご使用下さい。

特に塩酸グアニジンなど、溶解しづらいものは Vortex ミキサー等を使用して溶解させて下さい。

3. 保存

-20°C 保存

4. 方法

【封入体の可溶化】

1. 変性バッファーを調製する。
変性バッファーの最終組成は、50 mM Tris-HCl (pH7.5), 500 mM NaCl, 6 M 塩酸グアニジン, 10 mM DTT です。よって、10 mL の変性バッファーを調製する場合、①. 1 M Tris-HCl (pH 7.5) を 500 μ L、⑦. 4 M NaCl を 1.25 mL、⑨. 8 M 塩酸グアニジンを 7.5 mL、⑧. 4 M DTT を 25 μ L を取り分け、これに蒸留水を加えて 10 mL とする。
2. 封入体を変性バッファーに懸濁する。変性バッファー 1 mL に封入体 0.2~1 mg (0.2~1 mg/mL) が目安となります。よって変性バッファーは 8 回分のためには約 10 mL 必要となります。
3. 室温で一晩ゆっくり攪拌する。
4. 25,000 \times g で 15 分間遠心し、上清を変性タンパク質溶液として回収する。

【可溶化した変性タンパク質のゼオライトへの吸着】

5. 洗浄バッファーを調製する。
洗浄バッファーは、5 mM Tris-HCl (pH7.5) になります。①. 1 M Tris-HCl (pH7.5) から 250 μ L を取り分け、これに蒸留水を加え 50 mL とします (200 倍希釈する)。
6. ゼオライト入りチューブをスピンドアウンして粉末を落とす。
7. 1 mL の変性タンパク質溶液をゼオライト入りチューブに加えて懸濁後、ローテーター等でゆっくり攪拌しながら室温で、1 時間インキュベーションする。
8. 1 分間 (15,000 \times g) 遠心する。
9. 上清を捨て、1 mL の洗浄バッファーを加えた後、ゼオライトをよく懸濁する。
10. 上記洗浄作業を計 5 回繰り返す。
11. 最後の洗浄作業後、チューブを再遠心して残った上清を可能な限り除く。

【リフォールディング】

12. 1.5 mL チューブを 8 本用意し、表 1 に従ってリフォールディングバッファーを調製する (1.2 mL ずつ)。
13. 1 mL のリフォールディングバッファーをサンプルの入ったチューブに加え、ゼオライトを懸濁後、4°C で一晩、ローテーター等でゆっくり攪拌しながらインキュベートする。
14. 4°C で 5 分間遠心 (15,000 \times g) し、上清を回収する。

表1. リフォールディングバッファー組成

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8
1 M Tris-HCl pH 7.5	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l				
1 M Tris-HCl pH 8.5					60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l
10 % PEG 20000	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l
2 M アルギニン pH 7.5	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l				
2 M アルギニン pH 8.5					300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l
10 % Tween 20			60 μ l	60 μ l			60 μ l	60 μ l
4 M NaCl	150 μ l		150 μ l		150 μ l		150 μ l	
1 M DTT*	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l
8 M 塩酸グアニジン		150 μ l		150 μ l		150 μ l		150 μ l
ddH ₂ O	570 μ l	570 μ l	510 μ l	510 μ l	570 μ l	570 μ l	510 μ l	510 μ l

*キット添付の⑧. 4 M DTT を 40 倍希釈してご使用下さい。また、DTT が不要な場合もあり得ます。その際は蒸留水の量で総量を調整して下さい。目的タンパク質がジスルフィド結合を含む場合は、0.1 M DTT の代わりに 200 mM システイン/20 mM シスチン溶液を 60 μ L 加えて下さい。

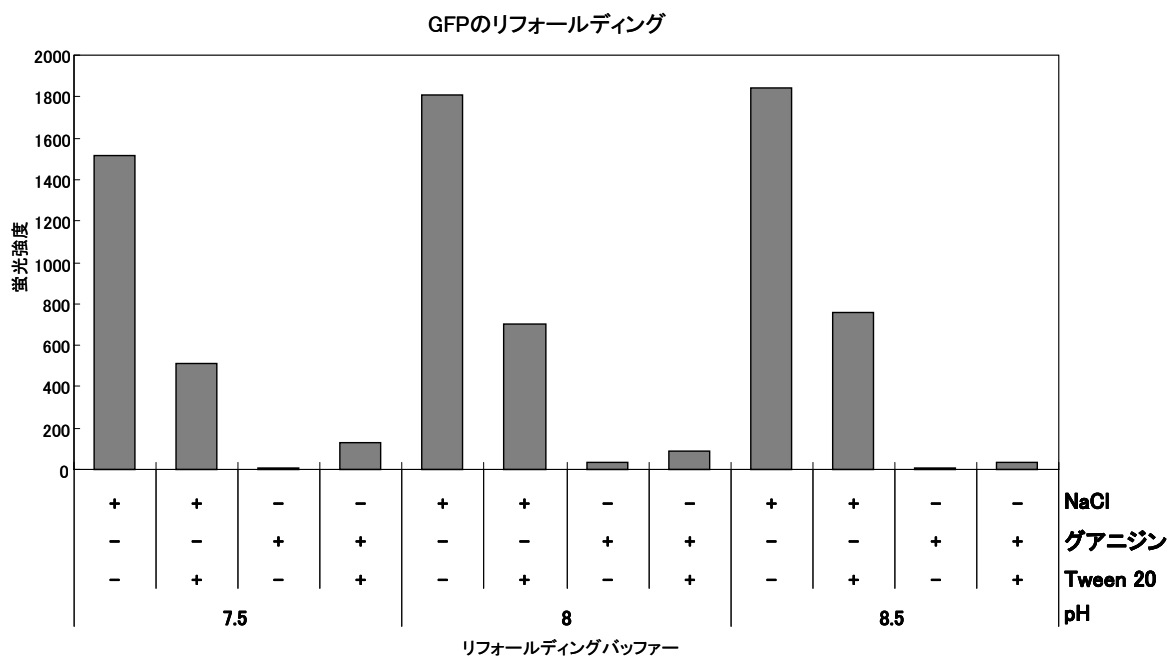
**目的タンパク質が金属イオンを含む場合、対応する金属イオン(～1 mM)を加えて下さい。

(注、金属イオンは付属しておりません)。

5. 実施例

a. GFP のリフォールディング

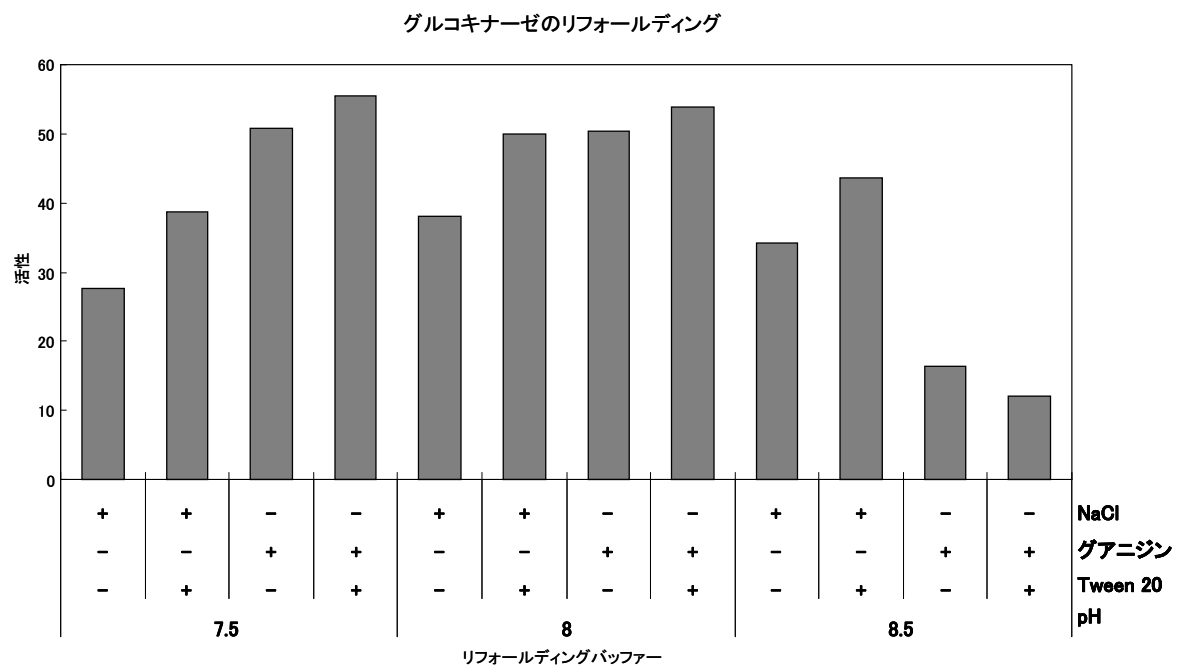
GFP を大腸菌で発現させ、封入体を得た。6 M 塩酸グアニジンを含むバッファーで可溶化後、1 mg の変性 GFP をゼオライトに吸着、洗浄後、種々のリフォールディングバッファーを用いてリフォールディングを行い、活性を測定した。



pH8.0~8.5、0.5 M アルギニン、0.5% PEG 20000 および 0.5 M NaCl を含むバッファーにて溶出(リフォールディング)した時、最大の活性が得られた。

b. グルコキナーゼのリフォールディング

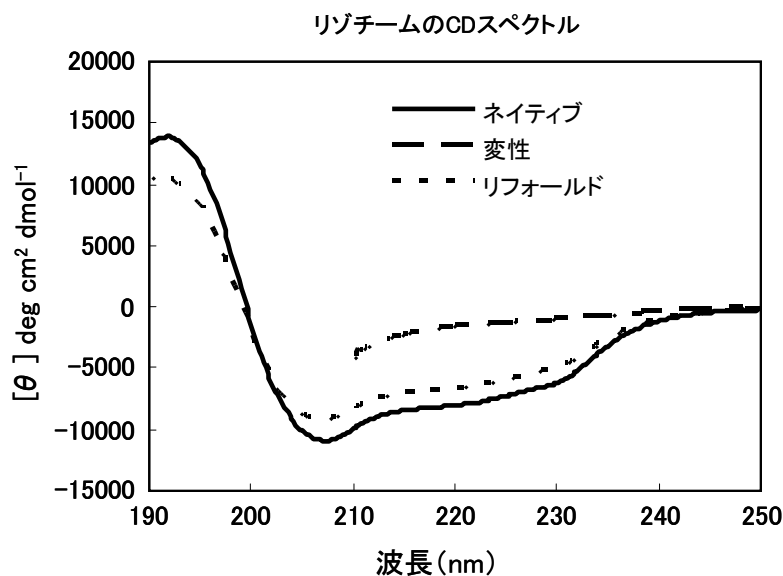
グルコキナーゼを大腸菌で発現させ、封入体を得た。6 M グアニジン塩酸塩を含むバッファーで可溶化後、1 mg の変性グルコキナーゼをゼオライトに吸着、洗浄後、種々のリフォールディングバッファーを用いてリフォールディングを行い、活性を測定した。



pH7.5~8.0、0.5 M アルギニン、0.5% PEG 20000、1 M 塩酸グアニジンおよび 0.5% Tween 20 を含むバッファーで最大の活性が得られた。

c. リゾチームのリフォールディング

6 M 塩酸グアニジンおよび 50 mM DTT を含む溶液で、完全に変性還元させたリゾチーム 1 mg をゼオライトに吸着させた。ゼオライトを洗浄後、0.5 M アルギニン、1 M 塩酸グアニジン、0.5% PEG 20000、10 mM シスチン/1 mM シスチンを含むリフォールディングバッファー(pH8.5) 1 mL を加え、4°Cで一晩インキュベートして溶出(リフォールディング)を行い、回収量、比活性、円偏光二色性スペクトル (CD スペクトル)を測定した。



リフォールドさせたリゾチームの回収率は約 50%で、ネイティブのものと同様に活性を比較したところ、100%の比活性を示した。更に、CD スペクトルを測定したところ、ネイティブと同様な二次構造を取っていた。

6. 参考文献

- 1) Chiku H., Kawai A., Ishibashi T., Takahara M., Yanai T., Mizukami F., Sakaguchi K. (2006) *Anal. Biochem.* 348:307-314
- 2) Nara T.Y., Togashi H., Sekikawa C., Kawakami M., Yaginuma N., Sakaguchi K., Mizukami F., Tsunoda T. (2009) *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 68:68-73
- 3) Togashi H., Nara T., Sekikawa C., Kawakami M., Yaginuma N., Tsunoda T., Sakaguchi K., Mizukami F. (2009) *Biotechnol. Prog.* 25:200-206
- 4) Nara T.Y., Togashi H., Sekikawa C., Sakaguchi K., Mizukami F., Tsunoda T. (2009) *Biotechnol. Prog.* 25:1071-1077

7. ライセンス

本製品は研究用途でのみご使用下さい。本製品は、独立行政法人 産業技術総合研究所よりライセンスを受けています。産業化、商業化には産業技術総合研究所とのライセンス契約が必要となります。

8. 特許

- ・特開 2005-281267 「タンパク質巻き戻し形成体」
- ・特開 2005-220121 「タンパク質巻き戻し材料」
- ・特開 2005-192452 「タンパク質巻き戻し用キット」
- ・特開 2005-029531 「不活性タンパク質の機能賦活方法」

9. 製品についてのお問い合わせ先



大阪府箕面市稲4丁目1番7号

TEL: 072-749-3020