

水溶性モノマータンパク質用リフォールディング試薬

Super Refolding mono

使用説明書

【 特徴 】

- 本品は封入体 (inclusion body) など正しい立体構造を保持していないタンパク質を、正常な立体構造へと巻き戻すための試薬セットです。
- 独自の SR 試薬により、多くの水溶性モノマータンパク質に対して、煩雑な条件探索なしに効率的なリフォールディングを行うことができます。SR 試薬は低分子化合物で構成されているため、ゲルろ過クロマトグラフィーや透析等で除去することができます。
- 本品は水溶性モノマータンパク質用に最適化されています。膜タンパク質、オリゴマータンパク質に対する性能は未確認です。なお、全ての水溶性モノマータンパク質において性能を保証するものではなく、標的タンパク質によっては期待した結果を得られないことがあります。
- 各 SR 試薬 1 本で 1~3 mg 程度のタンパク質を処理することが可能です。

本品は試験・研究用以外には使用しないで下さい。

ライセンスについてはお問い合わせ下さい。(特許出願中)

【 試薬構成 】

品名	Cat No.	SR 試薬 A	SR 試薬 B
トライアルセット	SR-1010	1 本	1 本
スタンダードセット A	SR-1020	4 本	—
スタンダードセット B	SR-1030	—	4 本

※ 各 SR 試薬は 1 本 1.0mL 入りです。

※ 各 SR 試薬 1 本で 1~3mg のタンパク質が処理可能です。

※ バルク供給についてはお問い合わせ下さい。

【 本品以外に準備するもの 】

- 超純水 (比抵抗値 18 MΩ 以上)
- Urea もしくは 塩酸ゲアニジン
- Tris (またはそれに準ずる緩衝剤)
- 塩酸・水産化ナトリウム (pH 調整用; 必要な場合)
- DTT (ジチオスレイトール; 必要な場合)
- GSSG (酸化型グルタチオン; 必要な場合)
- GSH (還元型グルタチオン; 必要な場合)
- EDTA などのキレート剤 (必要な場合)
- 標的タンパク質の立体構造形成に必要な補酵素や金属イオンなどの補助因子 (必要な場合)
- マイクロチューブ
- 電子天秤および pH メーター
- 室温および 37 °C の恒温槽等
- 卓上遠心分離機
- ディスポーザブルの手袋

【 使用期限 】

1 年 (未使用 4°C 保存の場合)

※ 開封後はなるべくお早めにご使用下さい。開封後、異物混入や微生物の増殖、変色、pH の変化等が認められた場合は直ちに使用を中止して下さい。

※ SR 試薬は蓋をしっかりと閉めて保存して下さい。成分の揮発等により、早期劣化の原因となります。

※ SR 試薬は高濃度の塩を含むため、保存中に塩が析出することがあります。その場合、70~80°C の湯に浸すなどして塩を溶解してからご使用下さい。

【 試薬調製 】

- 変性溶液: 4 °C で 1 週間保存可能
6~8M Urea, 100 mM Tris-HCl (pH 8.2)
- DTT 溶液 (必要な場合): 用時調製
1 M DTT, 100 mM Tris-HCl (pH 8.2)
- GSSG 溶液 (必要な場合): 用時調製
0.5M GSSG

※ 本プロトコールでは様々な試薬を使用しますので、作業の際はなるべく手袋や化学防護メガネをご着用下さい。

※ できる限りグレードの高い試薬をご使用ください。

【 基本プロトコール 】

A. 標的タンパク質の可溶化

- 1) 変性溶液を調製する。標的タンパク質がシステイン残基を含有する場合、DTT 溶液を調製し、変性溶液: DTT 溶液 = 9:1 で混合する。
- 2) 標的タンパク質が 50mg/ml 程度となるように、1) で作製した変性溶液 (または、変性溶液+DTT) を加え、溶解する。
- 3) 37 °C で 2 ~ 3 時間静置
- 4) 遠心分離 (10,000rpm, 5 分間) を行って上清を回収し、タンパク質濃度が 20~50 mg/ml となるように調製する (可溶化サンプル溶液)。

B. 標的タンパク質のリフォールディング

- 1) SR 試薬 190 μl に対し、前工程で調製した可溶化サンプル溶液 10 μl を添加
- 2) 標的タンパク質がシステイン残基を含有する場合、GSSG 溶液を 2 μl 添加
- 3) 室温で一晩 (14 ~ 20 時間) 静置
- 4) 各タンパク質に適した方法でリフォールディング収率の確認を行う。

【トラブルシューティング】

本製品を用いてリフォールディングを行っても期待した結果が得られなかった場合、下記を参考にしてください。

1. GSSG と GSH の共存

標的タンパク質によっては、GSSG 溶液に適度な割合で GSH を共存させるとジスルフィド交換反応が促進される場合があります。その場合は、GSSG と GSH を足して 0.5M となるように調製してください。また特に、触媒中心にチオールが存在するタンパク質は、GSH を多めに入れると良い結果が得られる場合もあります。

2. 標的タンパク質の変性が不十分

他の変性剤を試して下さい。塩酸グアニジンは Urea よりも強い変性作用が期待できます。その他、非イオン性界面活性剤やトリフルオロエタノールなどでも変性させることができます。

3. 変性剤の変性能が強すぎる

標的タンパク質によっては、変性剤の変性能が強すぎるとリフォールディングの妨げとなる場合があります。その場合には、酸やアルカリ、1M 程度の低濃度 Urea による変性を試して下さい。また、プロトコール B のステップ 1 において、可溶性サンプル溶液の希釈倍率を上げてみて下さい。

4. リフォールディング時の pH が不適切

ジスルフィド交換反応のためには、pH が 8 以上である必要があります。可溶性サンプル溶液の調製を本説明書に記載の方法以外で行った場合、プロトコール B のステップ 3 において pH が 8 以上となっているかご確認下さい。また、ジスルフィド結合の再生が必要ない標的タンパク質であれば、緩衝液の pH を標的タンパク質の等電点から遠ざけることで非特異的な凝集が抑制され、リフォールディング収率が向上する場合があります。

5. リフォールディング時間が短い

リフォールディングに必要な時間はジスルフィド結合の有無や、ネイティブ状態の安定性などにより大きく異なります。そのためリフォールディング収率が思わしくない場合は、リフォールディング時間を長めにすることで改善される場合があります。

6. リフォールディング収率の評価系への影響

SR 試薬は高濃度の塩を含むため、活性測定等に影響を及ぼす可能性があります。その場合、透析などによる脱塩を試みて下さい。

7. リフォールディング後の脱塩

SR 試薬を透析等で除くと多量の凝集が見られる場合があります。その場合、SR 試薬の濃度を段階的に下げていく方法が考えられます（各 SR 試薬はバルク供給が可能です）。また、置換する緩衝液の pH は標的タンパク質の等電点付近を避けて下さい。

8. SR 試薬の劣化

SR 試薬は保証期限内の未開封品であっても、高温や直射日光への暴露など、保存状態によっては品質の劣化が見られる場合があります。必ず定められた保存方法に従って保存して下さい。特に、SR 試薬の pH が酸性になっている場合、品質が劣化していますので、直ちに使用を中止してください。また、開封後は蓋をしっかりと閉めて保存し、なるべくお早めにご使用下さい。異物混入や微生物の増殖、変色、pH の変化等が認められた場合、直ちに使用を中止して下さい。

9. その他

pH、Tris-HCl 濃度などは、まずは本説明書に記載の条件でお試し下さい。また、リフォールディング時のタンパク質濃度は本説明書に記載の濃度を推奨します。特に、タンパク質濃度が低すぎると期待した結果が得られないことがあり、その場合には SR 試薬を 100 mM Tris-HCl (pH 8.2) で 2 倍程度に希釈して使用すると改善される可能性があります。



株式会社ファーマフーズ アプロサイエンスグループ

〒770-0865 徳島県徳島市南末広町4-53 エコービル4階

■Tel:088-678-6372 ■Mail:bio@apro-s.com

■Url:https://apro-s.com/

本社 〒615-8245 京都府京都市西京区御陵大原1-49