

タンパク精製における細胞可溶化方法の工夫

瀬尾めぐみ^{#1} 牧(黒田)由紀子^{#1} 住友日香^{#1} 大島玲子^{#1} 三ツ井貴夫^{#1}

#1 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地 1354 番地

受付 2023. 3. 1 受理 2023. 3. 10 出版受託 2023. 3. 25

要旨

病態を解明する上で、リコンビナント蛋白を精製し、蛋白の機能を調べることは大変重要である。しかし、リコンビナント蛋白の精製は臨床現場の研究室では難易度が高い。その要因の1つに細胞の可溶化が容易ではないことがあげられる。そのためさまざまな可溶化バッファーや、粉碎機がある。ジルコニアは、歯の詰め物として知られている一方、細胞への研磨能力が大きく、研磨効率が通常のセラミックスより2~3倍ほど高いことが知られている。今回、私達はよく使われている RIPA バッファー可溶化剤に、ソニケーションとジルコニアビーズを組み合わせて細胞破碎を行い、タンパク精製した成功例を紹介する。Expi293細胞に GFP 結合蛋白、His 結合蛋白をそれぞれ発現させ、RIPA バッファーで可溶化した後にソニケーションで粉碎し、その上ジルコニアビーズを加えてボルテックスを行い、細胞粉碎を行った。さらに Ni-NTA アフィニティーカラム、抗 GFP 抗体カラムで IP し、蛋白精製を行った。RIPA バッファーで細胞懸濁した後に、ソニケーション200V 6分、ジルコニアビーズを可溶化バッファーの10%量を加えて、30分攪拌した。さらに可溶化バッファーを再度加えて120分振とうさせ、遠心したのちに上清成分をレジンと反応させると、ジルコニアを使用しなかった時と比べて飛躍的に目的蛋白の収量は向上した。ジルコニアは強度が強く、歯の詰め物として使用しているだけでなく、細胞破碎にも貢献していることを改めて知り、今後も毎日の生活の中でも使えそうな物に気を配り、日々の業務に取り組みたい。

キーワード： ソニケーション, ジルコニアビーズ

背景と目的

病態を解明する上で、リコンビナント蛋白を精製し、蛋白の機能を調べることは大変重要である。しかし、リコンビナント蛋白の精製は臨床現場の研究室では難易度が高い。私達も四苦八苦しており、その体験を報告する。

材料および方法

Expi293細胞に GFP 結合蛋白、His 結合蛋白をそれぞれ発現させ、RIPA バッファーで可溶化した後にジルコニアビーズを加えてボルテックスを行い、その後ソニケーションで粉碎し、細胞溶解を行った。¹⁾さらに Ni-NTA アフィニティーカラム、抗 GFP 抗体カラムで IP し、蛋白精製を行った。

結果

- ①RIPA Buffer/ジルコニア使用前の蛋白精製
図1にプロトコールを示した。CBB 染色では、レーン 2 で目的のバンドが検出されず、Immuno Blot でも抗 GFP 抗体でバンドが確認されず精製は失敗だった。
- ②GFP/His 結合蛋白の新たなプロトコール (図2)
溶解 Buffer を RIPA Buffer へ変更、溶解後にジルコニアビーズを使用して細胞の粉碎を行ったのちにソニケーションでさらに粉碎させた。その結果、GFP 結合蛋白ではレジンは Green になり結合が確認された。
- ③GFP 結合蛋白の Immuno Blot (図3)
Immuno Blot において、CBB 染色でレーン 1, 2 ともに 1 本の目的のバンドが検出され、

Correspondence to: 瀬尾 めぐみ. 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地1354番地 Phone: +81-88-324-2161 Fax: +81-88-324-8661 e-mail: seo.megumi.ey@mail.hosp.go.jp

抗 GFP 抗体でもバンドが確認され精製は成功した。

④His 結合蛋白の Immuno Blot (図 4)
Immuno Blot において、CBB 染色で 52KDa の目的のバンドを確認し、抗 His 抗体でもバンドが検出され精製は成功した。

図 1

RIPA Buffer/ジルコニア使用前は蛋白精製は失敗の連続だった

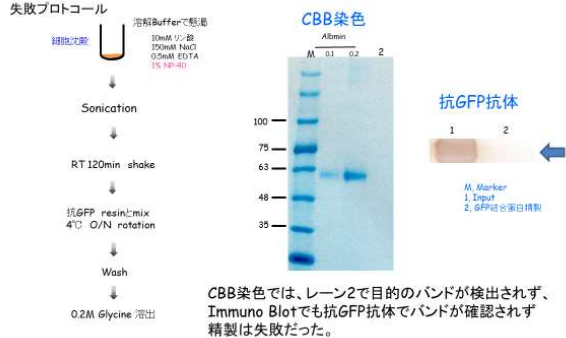


図 3

GFP結合蛋白のImmuno Blot

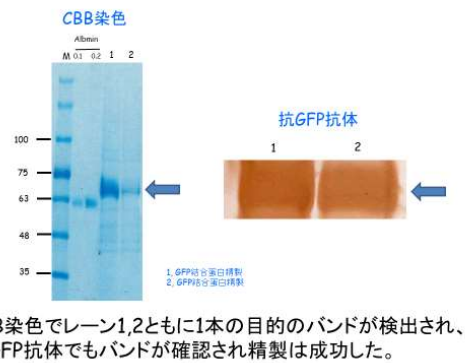


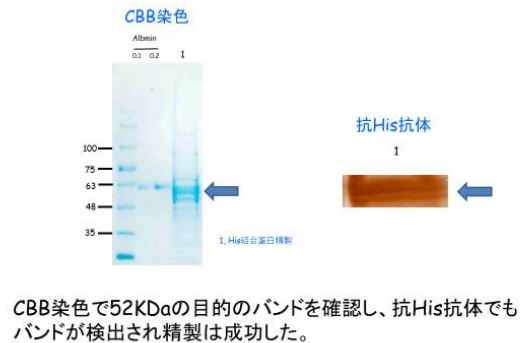
図 2

GFP/His 結合蛋白の精製 プロトコール



図 4

His結合蛋白のImmuno Blot



結論

- ①リコンビナント蛋白精製は、私達にはハードルが高かった。
- ②細胞の粉砕・可溶化も簡単ではないことが分かった。
- ③実家の歯科で使用しているジルコニアが可溶化の役に立ってよかった。
- ④今後も毎日の生活の中でも使えそうなものに気を配り、日々の業務に取り組みたいと考えている。

文献

- 1) Ning YT, Yang WH, Zhang W. et al Developing Two Rapid Protein Extraction Methods Using Focused-Ultrasonication and Zirconia-Silica Beads for Filamentous Fungi Identification by MALDI-TOF MS. Front Cell Infect Microbiol. 2021 687240. eCollection 2021.