

GST 融合タンパク質の精製 (GST-PGAM5 Δ TM を例として)

2018. 9. Ver. 1

By M. Nishikawa & S. Tanimura

1. 大腸菌の培養

【試薬】

LB プレート (+Amp)

LB 液体培地 (+Amp final 50 μ g/mL) 500 mL

Ampicillin (stock 100 mg/mL) を氷上で溶かし、LB 液体培地 500 mL に 250 μ L 加える。

【操作】

大腸菌 (GST-PGAM5 Δ TM-pGEX4T を導入した BL21 株) のグリセロールストックを LB プレート (+Amp) にプレーティングする。

- 37°Cにて一晩培養する。(プレートはパラフィルムをまき4°Cにて数日間保存可能)
- LB 液体培地 (+Amp) 5 mL を培養チューブ (Eiken) に入れたものを4本用意する。
- 爪楊枝で大腸菌のシングルコロニーを拾い培養チューブ (Eiken) に入れる。
- 37°Cにて振とう培養する (15 hr 程度)。

2. IPTG による GST 融合タンパク質の発現誘導

【試薬】

IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (1 M)

【操作】

- 37°Cで振とうした各サンプル 20 mL (5 mL \times 4本) を LB 液体培地 (+Amp) 180 mL に加え、37°Cにてさらに振とう培養する (3 hr)。

[発現確認のための IPTG 誘導前サンプルの回収]

培養チューブから 1.5 mL チューブに培養液 1 mL 移す。

遠心分離 (3,000 rpm \times 3 min, 4°C)

上清を捨て、大腸菌ペレットを-80°Cで冷凍保存する (IPTG 誘導前サンプル)。

- 1M IPTG 100 μ L (final 0.5 mM) を加え、25°Cにて振とう培養する (7 hr) (※注1)。

[発現確認のための IPTG 誘導後サンプルの回収]

培養チューブから 1.5 mL チューブに培養液 1 mL 移す。

遠心分離 (3,000 rpm×3 min, 4°C)

上清を捨て、大腸菌ペレットを-80°Cで冷凍保存する (IPTG 誘導後サンプル)。

- 培養液 (200 mL) を 50 mL 遠沈管に 4 本ずつ分ける。
- 遠心分離 (3,000 rpm×15 min, 4°C)
- 上清を捨てる (上清はオートクレーブをかけて廃棄する)。
- 大腸菌ペレットを-80°Cにて凍結保存する。

※注 1 IPTG の濃度 (final 0.1~1.0 mM が目安)、IPTG 誘導の温度 (低温で誘導するほど可溶化されやすくなることもある) と時間はタンパク質によって異なるため、あらかじめ条件検討が必要となる。

条件検討の際には、上記の 1/10~1/20 程度のスケールで IPTG による発現誘導を確認する。

発現確認のために回収した IPTG 誘導前後サンプルは、以下の Lysis buffer (200 μL 程度) で懸濁、sonication した後に遠心分離し、その上清とペレットを回収する。それぞれの一部を SDS-PAGE で展開した後に、ゲルを CBB 染色することで、目的タンパク質の発現誘導と可溶化の程度を確認する。

3. GSH sepharose ビーズによる GST 融合タンパク質の精製

【試薬】

Lysis buffer

1% Triton X-100/PBS	60 mL
1 mg/mL Aprotinin	300 μL (2000 倍希釈)
100 mM PMSF	600 μL (100 倍希釈)

透析用バッファー 20 mM MES buffer (pH 6.0) (※注 2)

0.1 M MES buffer	420 mL
Milli-Q H ₂ O	1,680 mL

2,100 mL 調製し-4°Cにて保存する (アルミで遮光すること)。

※注 2 透析用バッファーは最終的に使用する実験系に応じて適宜変える。

Glutathione (GSH) sepharose ビーズ

ビーズの洗浄

- 1000 μl の原液 (Glutathione sepharose 4B, GE Healthcare #17-0756-01) を 1.5 mL

- チューブに加える。
- 卓上の遠心機でスピンドウン後、上清をピペットマンで除く。
 - 900 μL の 1×PBS を加え転倒混和
 - 卓上の遠心機でスピンドウン後、ピペットマンで上清を除く。
(この洗浄操作を 5 回行う。)
 - 750 μL の PBS を加えて 50% PBS 懸濁液とし、4°Cにて保存する。

Elution buffer

10 mM Glutathione

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

(0.154 g の還元型グルタチオンを 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 50 mL に溶解する。)

【操作】

大腸菌の破碎溶解

- 大腸菌ペレットに Lysis buffer 7 mL/50 mL 遠沈管を添加する。
- ディスポの 10 mL ピペットを用いてピペッティングし、十分に大腸菌を懸濁する。
 - on ice 30 min 静置する。
 - sonication 用のチューブに 7 mL ずつ移す (sonication 用チューブ 4 本分となる)。
 - sonication (High にて 5 min×20 回程度、懸濁液が半透明になるまで行う。)
 - sonication 後の懸濁液を 50 mL 遠沈管 2 本にまとめる。
 - 遠心分離 (15,000 rpm×20 min, 4°C)
 - 上清を 15 mL 遠沈管に 15 mL ずつ移す (15 mL 遠沈管 2 本分となる)。

GSH sepharose ビーズによるタンパク質の精製

- 上清 15 mL に GSH sepharose ビーズ 200 μL を添加して、4°Cにて転倒混和する (1 hr 以上)。
- サンプルを 7,500 rpm にてスピンドウンする。
- 上清は 15 mL 遠沈管に移して−80°Cにて冷凍保存する (必要に応じて再精製する)。
- ペレットに 1% Triton X-100/PBS 10 mL を添加した後、混和する。
- 7,500 rpm でスピンドウンした後、上清をアスピレータで除去する (洗浄)。
(この洗浄操作を 3 回行う。)
- ペレットに 1% Triton X-100/PBS 500 μL を添加してピペッティングし、15 mL 遠沈管 2 本分をまとめて 1.5 mL チューブ 1 本に移す。
- 7,500 rpm でスピンドウンした後、上清をアスピレータで除去する。
- Elution buffer 300 μL (ビーズ量の 1.5 倍量) をペレットに加える。
- 室温で 10 min 放置する (5 min 毎にタッピングする)。

- 7,500 rpm でスピンドウンした後、上清を 1.5 mL チューブに回収する（溶出）。
（この溶出操作を 3 回行う。）

透析

- 回収した上清（サンプル）を透析チューブに移す。
- アルミホイルで遮光したビーカーに、20 mM MES buffer（700 mL）とスターラーバーを入れ、低温室にセットする。
- 透析チューブに入れたサンプルを入れ、攪拌する（1 hr 以上）。
- 20 mM MES buffer 700 mL を交換した後、一晩攪拌する。
- 20 mM MES buffer 700 mL を交換した後、さらに攪拌する（1 hr 以上）。
- 透析チューブ中のサンプルを取り出して 1.5 mL チューブに回収する。
- 必要に応じてタンパク質濃度を測定、また SDS-PAGE にて分離後 CBB 染色を行うことで、精製の程度を確認する。
また、サンプルは適宜分注して -80°C にて冷凍保存する。

タンパク質の収量の目安（GST-PGAM5 Δ TM の場合）

0.5~0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ （約 7.5 mL）、3.7~6.0 mg 程度のタンパク質を得ることができる。