



タンパク質精製用FastBreak™ 菌体溶解試薬

By Jude Stevens, B.S., and Gary Kobs, B.S., Promega Corporation

アブストラクト

FastBreak™ Cell Lysis Reagent, 10Xはタンパク質精製システムに使用する新しい菌体溶解バッファーです。本試薬は大腸菌培養液に直接添加することができ、遠心や機械的な破碎操作を行わずに10～15分で穏やかに、しかも効率よく菌体を溶解することができます。本稿では、FastBreak™ BufferのMagneHis™ Protein Purification Systemへの適応性をマニュアル、ロボットフォーマットで実証しました。

FastBreak™ Cell Lysis Reagentは、遠心や機械的細胞破碎を必要とせず、培養大腸菌を効率よくかつ穏やかに溶解できるように設計されています。

はじめに

プロテオミクス研究分野で最もよく使用される方法の1つに、大腸菌に発現させたリコンビナントタンパク質の精製が挙げられます。この過程には、最適の条件下での細胞培養、引き続いて行う濃縮または回収（通常、遠心）、そして機械的または化学的細胞溶解が含まれます。少ないサンプルを使用する場合にはこの手順で充分対応できます。しかし、多検体タンパク質精製の必要性が高まり、効率よく処理できるサンプル数に限りがある方法では、最適とはいえません。

我々は多検体処理に適応する溶解を可能にするためにFastBreak™ Cell Lysis Reagentを開発しました。この試薬は、遠心や機械的細胞破碎を必要とせず、効率よくかつ穏やかに大腸菌の溶解が行えるように設計されています。試薬は、10Xの濃縮した形で供給され、溶解を促進させる特殊な非イオン性界面活性剤が含まれています。試薬を大腸菌培養液に直接加えると、短時間のインキュベーションで細胞は破碎されてタンパク質が放出されます。リコンビナントタンパク質は、抽出液のまま直接スクリーニングしたり、または適切なアフィニティマトリックス（例：MagneHis™ Protein Purification System [カタログ番号V8500]）添加により精製することができます。この方法により、マニュアルでも、多検体処理アプリケーションのためのベックマン・コールター社製Biomek® 2000やFXのようなロボットを用いた自動化にも対応します。

マニュアルおよびロボットフォーマットによるHisタグ融合タンパク質の精製

FastBreak™ Cell Lysis Reagentが、マニュアル、自動化の両フォーマットでMagneHis™ Protein Purification Systemを用いたタンパク質精製に利用可能であることを評価しました。2つの方法では同じ菌体ライセートを用いました。61kDaのHisタグ-タンパク質はBL21 (DE3) Star™で発現させました。菌体はアンピシリン含有LB培地、25°Cで培養しました。Hisタグ-タンパク質の発現は、吸光度OD₆₀₀が0.4～0.6の菌体培養液にIPTG（終濃度 1mM）を加えて誘導しました。菌体培養液は、誘導後さらに16時間培養しました。誘導後の培養液900μlにFastBreak™ Cell Lysis Reagent 100μlを添加後、振とうしながら室温で10分間インキュベーションして菌体を溶解しました。

Hisタグ-タンパク質はMagneHis™ Protein Purification Systemのテクニカルマニュアル（#TM060）に従い、マニュアルで精製しました。図1に示されているように、FastBreak™ Reagentは効率よく大腸菌を溶解し、引き続きタンパク質精製に干渉しません。

図2は、ロボットフォーマットにより細胞溶解と精製が一様に行われていることを示しています。MagneHis™ Systemおよびベックマン・コールター社のBiomek® FXを使用した96ウェルフォーマットでHisタグ-タンパク質を精製しました。このメソッドはプロメガ社のホームページ www.promega.com/automethods/ よりダウンロードできます。

菌体溶解、精製の最適化

特定の培養条件や、特定の大腸菌株を宿主として使用し培養を行う際、第2の試薬を添加することで、溶解性とその後の精製度をさらに高めることが可能です。高密度（例えば、O.D.₆₀₀>5）に達した培養液の菌体溶解時や、BL21 (DE3) pLysS大腸菌株の使用時には、ゲノムDNAの放出により、得られるライセートの粘性が高くなることがあります。その場合、DNaseを添加し、シェイカーか回転台の上で10～20分、室温でのインキュベーションを行うことによりこの問題は解決されます。DNase処理後は、ライセートの粘性は低くなります。

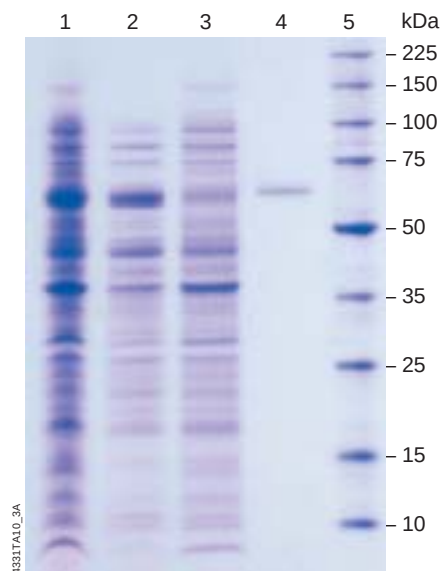


図1. FastBreak™ Cell Lysis ReagentとMagneHis™ Protein Purification Systemを用いた6x Hisタグ-タンパク質のマニュアル精製

レーン1：FastBreak™ Cell Lysis Reagentを添加して溶解した6x Hisタグ-ホタルルシフェラーゼを発現する大腸菌ライセート、レーン2：菌体溶解後の上清（タンパク質が可溶化していることを示している）、レーン3：MagneHis™ Ni-Particles添加後のライセートの流出液、レーン4：溶出された6x Hisタグ-ホタルルシフェラーゼ、レーン5：Broad Range Protein Molecular Weight Markers（カタログ番号V8491）。

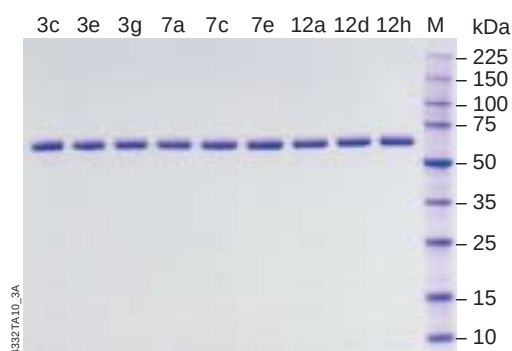


図2. 自動化法による再現性

各レーン、Biomek® FX上でFastBreak™ Cell Lysis Reagentによる菌体の溶解およびMagneHis™ Protein Purification Systemによる精製を行った96ウェルプレート上のウェル番号を示す。レーンM; Broad Range Protein Molecular Weight Markers (カタログ番号 V8491)。

リゾチーム（卵白由来）も菌体の溶解効率を高めるために使用され、FastBreak™ Reagentの存在下でも活性を有しています。リゾチームを使用する場合、TEバッファー（pH7.4）を用いた20 mg/mlのリゾチーム溶液を的事調製します。ライセート1mlあたり10μlのリゾチーム溶液を添加し、10分間インキュベーションします。また、ライセートの粘性を下げるため、溶解処理の後にDNaseを添加することを推奨します。リゾチームはMagneHis™ Ni-Particlesに結合するため、MagneHis™ Protein Purification Systemを使用する場合、DNase処理後にNaCl（最終濃度、0.5M）をライセートに添加します。これにより、Hisタグタンパク質のMagneHis™ Particlesへの結合には影響を与えずに、リゾチームの結合が抑えられます。

おわりに

FastBreak™ Cell Lysis Reagentを用いることにより、培養中でのリコンビナントタンパク質発現菌の溶解を簡便に行うことができます。FastBreak™ Reagentは、効率の高い菌体溶解作用を有しながら、MagneHis™ Systemを用いたその後のタンパク質精製に影響を与えることはありません。

プロトコル

- ◆ FastBreak™ Cell Lysis Reagent, 10X, Product Information Sheet #9PIV857, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/9piv857/9piv857.html)
- ◆ MagneHis™ Protein Purification System Technical Manual #TM060, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tm060/tm060.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
FastBreak™ Cell Lysis Reagent, 10X	10ml	V8571	5,000
	40ml	V8572	15,000
	100ml	V8573	30,000
MagneHis™ Protein Purification System	65 回分	V8500	26,000
	325 回分	V8550	90,000