

熱安定性測定によるタンパク質 保存・精製条件のスクリーニング

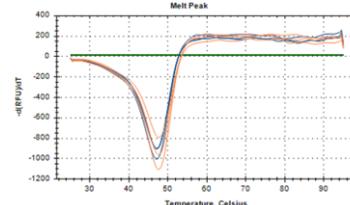
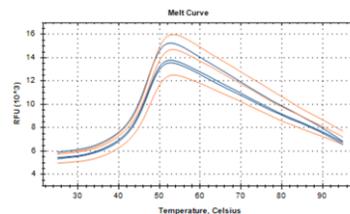
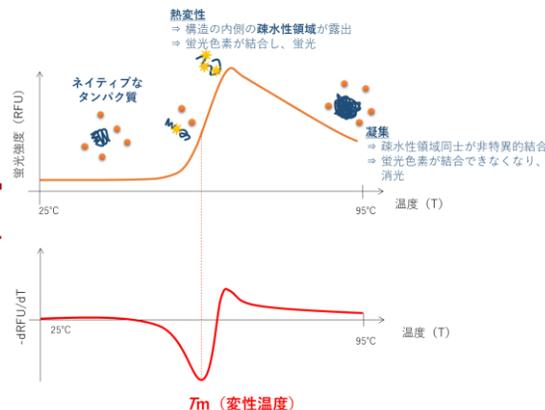
Thermal Shift Assay

■ 原理

蛍光色素の存在下でタンパク質を加温することで、タンパク質のアンフォールディングに伴う疎水領域の露出を蛍光強度で検出します。

蛍光強度は累積するため、**蛍光強度 vs. 温度のグラフを微分**すると、**蛍光強度の変化率が最大となる温度、すなわち変性温度Tm**を容易に得ることができます。

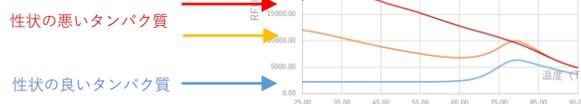
1条件あたり**2 µg程度**のタンパク質で、**約2時間**で**96条件**測定可能です。



■ アプリケーション

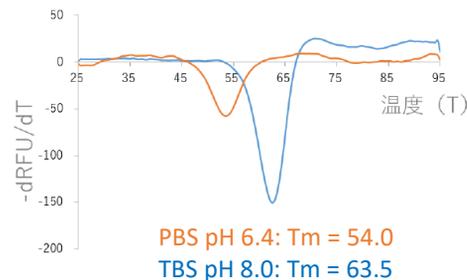
・ タンパク質の性状評価

⇒ 初期蛍光値の比較から、精製タンパク質の性状の良し悪しを評価できます。



・ Buffer条件間・変異体間の安定性比較

⇒ ご希望のBuffer条件範囲あるいは変異体ライブラリに対し、それぞれの構造安定性を比較検証。独自のBuffer Matrixもございます。



例) Premixed Buffer Matrix #1

Stabilization Buffer Matrix	150 mM NaCl						150 mM KCl					
	None	Glycerol	Ethylene glycol	Sucrose	DTT	EDTA	None	Glycerol	Ethylene glycol	Sucrose	DTT	EDTA
50 mM Acetate	4											
	5	25%/v	25%/v	0.2 M	1 mM	2 mM		25%/v	25%/v	0.2 M	1 mM	2 mM
1/10 M chloride buffer	6											
(Phosphate-citrate)	7.5											
	8											
50 mM Tris-HCl	9											
50 mM Tris-HCl	7.5											
50 mM HEPES	7.5											

AIを利用した熱安定性の予測も共同研究中

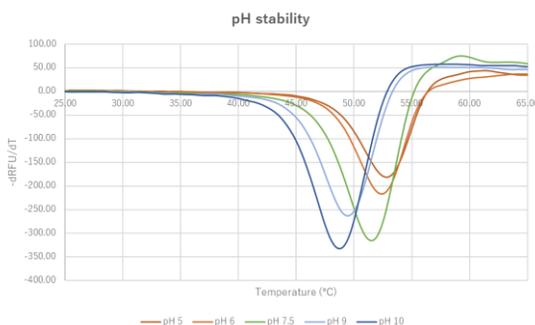


熱安定性測定によるタンパク質 保存・精製条件のスクリーニング

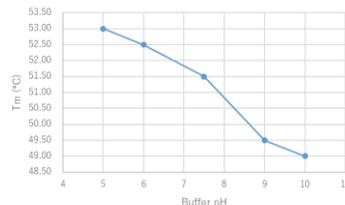
■ データ例

① タンパク質熱安定性のpH依存性検討

酵素を 150 mM NaCl存在下、
50 mM Sodium acetate pH 5.0
50 mM MES pH 6.0
50 mM Tris-HCl pH 7.5,
50 mM Tris-HCl pH 9.0
50 mM Glycine-NaOH pH 10.0
にてそれぞれ評価したところ、
酸性ほどTmが高い（より安定である）
ことが判った。

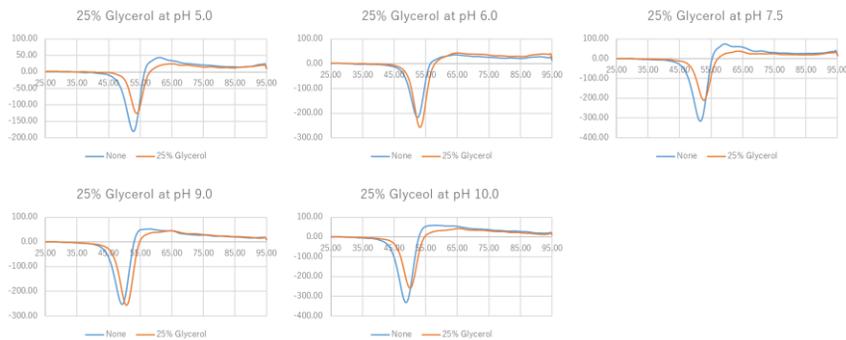


Buffer pH	Tm (°C)
pH 5.0	53.00
pH 6.0	52.50
pH 7.5	51.50
pH 9.0	49.50
pH 10.0	49.00



② 添加剤がタンパク質の安定性に与える影響の検討

球状タンパク質を様々なpH下において、
25% Glycerol存在下/非存在下でそれぞれ評価した
ところ、いずれのpHにおいてもGlycerolの添加
によって安定性が向上することが判った。



Point!

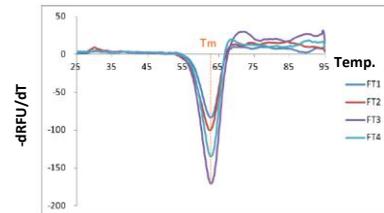
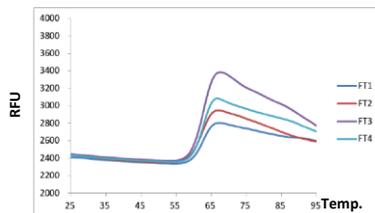
実験上やむを得ず混入する各主成分
(還元剤、キレート剤、有機溶剤等)、
長期保存を視野に入れた際の安定化剤
(糖、PEG、防腐剤)等の影響を
簡便に幅広く評価できます。

③ 凍結融解による劣化の検証

精製タンパク質を4回繰り返し凍結融解し、
それぞれのサンプルを評価したところ、
4回の間に初期蛍光値及びTmが変化しなかった
ことから、凍結融解による劣化がないことが
示唆された。

Point!

活性測定が困難・不可能なタンパク質であっても
容易に凍結融解の影響を検証可能



お困りの際は、まずはお気軽にご相談ください。

最適な実験計画の立案、実施をいたします。

