**rNP-A及びrNP-Bの生産と精製、Image-Jを用いた定量**

**<アミノ酸配列>**

■rNP-A

MHHHHHHHHHHDYKDDDDKLEASQGTKRSYEQMETDGERQNATEIRASVGKMIGGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSLTIERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRVNGKWMRELILYDKEEIRRIWRQANNGDDATAGLTHMMIWHSNLNDATYQRTRALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAVKGVGTMVMELVRMIKRGINDRNFWRGENGRKTRIAYERMCNILKGKFQTAAQKAMMDQVRESRNPGNAEFEDLTFLARSALILRGSVAHKSCLPACVYGPAVASGYDFEREGYSLVGIDPFRLLQNSQVYSLIRPNENPAHKSQLVWMACHSAAFEDLRVLSFIKGTKVLPRGKLSTRGVQIASNENMETMESSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQRASAGQISIQPTFSVQRNLPFDRTTIMAAFNGNTEGRTSDMRTEIIRMMESARPEDVSFQGRGVFELSDEKAASPIVPSFDMSNEGSYFFGDNAEEYDN

Mw: 58818, pI: 9.04

■rNP-B

MHHHHHHHHHHDYKDDDDKLESNMDIDGINTGTIDKAPEEITSGTSGTTRPIIRPATLAPPSNKRTRNPSPERATTSSEADVGRKTQKKQTPTEIKKSVYNMVVKLGEFYNQMMVKAGLNDDMERNLIQNAHAVERILLAATDDKKTEFQKKKNARDVKEGKEEIDHNKTGGTFYKMVRDDKTIYFSPIRVTFLKEEVKTMYKTTMGSDGFSGLNHIMIGHSQMNDVCFQRSKALKRVGLDPSLISTFAGSTLPRRSGATGVAIKGGGTLVAEAIRFIGRAMADRGLLRDIKAKTAYEKILLNLKNKCSAPQQKALVDQVIGSRNPGIADIEDLTLLARSMVVVRPSVASKVVLPISIYAKIPQLGFNVEEYSMVGYEAMALYNMATPVSILRVGDDAKDKSQLFFMSCFGAAYEDLRVLSALTGTEFKPRSALKCKGFHVPAKEQVEGMGAALMSIKLQFWAPMTRSGGNEVGGDGGSGQISCSPVFAVERPIALSKQAVRRMLSMNIEGRDADVKGNLLKMMNDSMAKKTNGNAFIGKKMFQISDKNKTNPVEIPIKQTIPNFFFGRDTAEDYDDLDY

Mw: 66414, pI: 9.24

**※**10×His-tag FLAG tag

**<実験操作>**

# **1 遺伝子組換え大腸菌による組換えNP-A及びNP-B(rNP-A, rNP-B)の生産**

[寒天培養]

(1) C43(DE3) Premium Competent Cell 50 μLを氷中で融解し、rNP-A及びrNP-Bのベクター溶液1 μLを添加し、氷中で15 minインキュベートした。

(2) ブロックインキュベーターを用いて、(1)の溶液を42 °C, 45 secでヒートショックし直ちに氷冷した。

(3) (2)の溶液をLB寒天培地(Amp: 終濃度50 μg/mL)上にプレーティングし、37 °Cで一晩培養した。

[前培養]

(1) 50 mLファルコンチューブにオートクレーブ済み2×YT培地10mL(Amp: 終濃度50

μg/mL)を加えた。

(2) 寒天プレート上のシングルコロニーを植菌し30 ℃, 200 rpmで一晩培養した。

[本培養]

(1) オートクレーブ済みバッフル付き500 mLフラスコにフィルター滅菌済みOvernight Expreps培地50 mL (Amp :終濃度50 μg/mL)を加えた。

(2) 前培養液をOD600 = 0.1となるように加え、30 °C, 200 rpm, 24 hで培養した。

(3) 培養液を50 mLファルコンチューブに回収し、4 °C, 13420 g, 20 minの条件で遠心分離し、培養上清と菌体に分離して回収した。

# **2 rNP-A及びrNP-Bの精製**

(1) 培養液50 mLを 4 °C, 10000 g, 20 minの条件で遠心分離し、得られた菌体にBinding buffer 5 mLを加え、Vortexした後、氷冷しながらOutput 3, Duty 30, 10 min×3回の条件で超音波破砕した。

(2) 4°C, 10000 g, 20 minの条件で遠心分離し、上清を菌体内可溶性画分として回収した。

(3) フィルターによる粗精製を行い精製用のサンプルとした。

(4) Ni-NTA アガロース 1 mL を充填したオープンカラムにMilli Q 5 C.V.×3回を供給し、カラム内を平衡化した。

(5) Table 1及びTable 2に従いrNP-A, rNP-B抗原を精製した。

Table 1 rNP-A抗原の精製プロセス

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Solution | Volume |
| Binding | 50 mM HEPES-500 mM NaCl-50 mM Imidazole, pH8.0 | 5 C.V.×2 |
| Wash 1 | 50 mM HEPES-500 mM NaCl-100 mM Imidazole, pH8.0 | 5 C.V.×1 |
| Eq 1 | 50 mM HEPES-500 mM NaCl, pH8.0 | 5 C.V.×2 |
| Wash 2 | 50 mM HEPES-1.5 M NaCl, pH8.0 | 5 C.V.×2 |
| Eq 2 | 50 mM HEPES-500 mM NaCl, pH8.0 | 5 C.V.×2 |
| Elution 1 | 50 mM HEPES-500 mM NaCl-200 mM Imidazole, pH8.0 | 5 C.V.×1 |
| Elution 2 | 50 mM HEPES-500 mM NaCl-500 mM Imidazole, pH8.0 | 5 C.V.×1 |

Table 2 rNP-B抗原の精製プロセス

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Solution | Volume |
| Binding | 50 mM HEPES-500 mM NaCl-50 mM Imidazole, pH8.0 | 5 C.V.×2 |
| Wash 1 | 50 mM HEPES-500 mM NaCl, pH8.0 | 5 C.V.×1 |
| Wash 2 | 50 mM HEPES-1.0 M NaCl, pH8.0 |  |
| Wash 3 | 50 mM HEPES-1.5 M NaCl, pH8.0 | 5 C.V.×2 |
| Eq | 50 mM HEPES-500 mM NaCl, pH8.0 | 5 C.V.×2 |
| Wash 4 | 50 mM HEPES-500 mM NaCl-100 mM Imidazole, pH8.0 | 5 C.V.×1 |
| Elution 1 | 50 mM HEPES-500 mM NaCl-200 mM Imidazole, pH8.0 | 5 C.V.×1 |
| Elution 2 | 50 mM HEPES-500 mM NaCl-500 mM Imidazole, pH8.0 | 5 C.V.×1 |

(6) NanodropでA280を測定しタンパク質が存在する画分を50 mM HEPES-500 mM NaCl-200 mM Imidazole 1 L中で4 ℃で二晩透析した。

# **3 Image-Jを用いたrNP-A及びrNP-Bの定量**

1. 1 mg BSAを秤量し、50 mM HEPES-500 mM NaCl-200 mM Imidazoleを1 mL加え、1 mg/mLとした。同bufferを用いて750, 500, 375, 250, 187.5, 125, 93.8 μg/mLに調製しStandardとした。
2. 精製、透析後のElution 1-2画分と(1)のStandard 20 μLに対しDTT-2×Sample buffer 20 μLを加え、98 ℃, 10 min加熱し還元した。
3. 12 % Separation gel, 15ウェルコーム, 5 μLアプライでSDS-PAGEを行った。rNP-A及びrNP-Bはn=2でアプライした。
4. 泳動後、ゲルを切り剥がしD.W 30 mL中で5 min×3回洗浄した後に固定化液30 mL中で1 hインキュベートした。
5. D.W 30 mL中で5 min×1回洗浄した後に染色液30 mL中で1 hインキュベートした。
6. D.W 30 mL中で5 min×3回洗浄した後に脱色液40 mL中で16 hインキュベートした。
7. Typhoon FLA 9000 でゲルを撮影し、Image-Qを用いてContrast Low: 80, High: 601.239、明るさ: Medで画像化した。
8. 画像をImage-Jで開き[Image-Type-8 bit]でグレースケール化し、[Edit-Invert]で白黒反転した。
9. [Edit-Selection-Specify]で1000 μg/mL BSAのバンドを基準としてwidth: 43, height: 20, Oval Area: 860の条件でバンドの座標を指定した。何もないエリアを8点測定し、backgroundとした。
10. [Analyze-Tools-ROI manager]でそれぞれのバンドに対し[Add→Measure]でMean gray valueを測定した。
11. Standard BSAのMean gray valueからbackgroundを引き、検量線を作製し、rNP-A及びrNP-BのMean gray valueからbackgroundを引いた値から濃度を算出した。
12. 濃度の定量後、終濃度50 %となるようGlycerolを加え冷凍保存した。

<実験結果>

# **1 rNP-A及びrNP-Bの生産**

　rNP-A及びrNP-Bを大腸菌C43(DE3)を用いて生産し、超音波破砕により調製した菌体内可溶性画分(100 mL culture)からNi-NTAオープンカラムを用いてタンパク質を精製した。Fig. 1にSDS-PAGE及びWestern Blotting により発現確認を行った結果を示す。Elution 1のSDS-PAGEの結果より60 kDa付近に単一バンドが確認できることから菌体内可溶性画分中からrNP-A及びrNP-Bを高純度に回収することが可能であると示された。同様にWestern Blottingにおいても60 kDa付近にバンドが確認されたことから、Ni-NTAカラムを用いて10×His tagを有するrNP-A及びrNP-Bが精製できていることが明らかとなった。



Fig. 1 抗原rNP-A及びrNP-Bの発現確認

(a) rNP-A, SDS-PAGE, (b) rNP-A, Western Blotting

(c) rNP-B, SDS-PAGE, (d) rNP-B, Western Blotting

**2 Image-Jを用いたrNP-A及びrNP-Bの定量**

続いて、Image-Jを用いて精製後のrNP-A及びrNP-Bを定量した。50 mM HEPES-500 mM NaCl-200 mM Imidazoleを用いて調製した1000-93.8 μg/mL BSA及び精製後のrNP-A及びrNP-B(n=2)のSDS-PAGEの結果をFig. 2に、SDS-PAGEのバンドの平均輝度をImage-Jにより定量した結果をTable 3に示す。濃度既知のBSAを用いて検量線を作成し、rNP-A及びrNP-Bの濃度を算出した。それぞれの精製後の濃度はrNP-Aが259.0 μg/mL、rNP-Bが524.6 μg/mLであり、その生産濃度はrNP-Aが2.6 mg/L、rNP-Bが5.2 mg/Lであった。



Fig. 2 SDS-PAGEによるrNP-A及びrNP-Bの定量

(a) rNP-A, (b) rNP-B

Table 3 Image-Jにより定量したSDS-PAGEのバンドの平均輝度

(a) rNP-A, (b) rNP-B

