

# 実験プロトコール 011

## 抗体固定化ビーズを使用した免疫沈降実験

### 1. 準備するもの

#### 1.1 抗体固定化ビーズ、タンパク質溶液

- ・抗体固定化ビーズ  
抗体(-)ビーズおよび抗体(+)ビーズ各0.1 mg  
条件を検討する場合 (タンパク質濃度、結合・洗浄バッファー塩濃度、など) は、  
0.1 mg×条件検討数
- ・タンパク質溶液  
タンパク質濃度5~15 mg/mL (調製上無理な場合はこの限りではない。)  
結合・洗浄バッファーにて希釈 (通常、タンパク質濃度1 mg/mL) して使用する。  
必要量は200 µL×条件数

#### 1.2 試薬

- ・2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸 (HEPES)
- ・水酸化ナトリウム (NaOH)   ・塩化カリウム (KCl)   ・塩化マグネシウム (MgCl<sub>2</sub>)
- ・塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>)   ・エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)   ・グリセロール (グリセリン)
- ・ノニデットP-40 (NP-40)   ・フッ化フェニルメタンスルホニル (PMSF)
- ・ジメチルスルホキシド   ・サンプルバッファー(4×dye)
- ・グリシン   ・トリス (ヒドロキシメタル) アミノメタン (Tris)   ・塩酸 (HCl)
- ・電気泳動 (SDS-PAGE) 用ゲル   ・電気泳動用バッファー   ・銀染色試薬

#### 1.3 機器

- ・微量高速冷却遠心分離機   ・卓上遠心分離機 (スピンドウン用)
- ・磁石スタンド (多摩川精機TAB4899N12など)   ・ローテーター
- ・ヒートブロック   ・スラブゲル電気泳動装置

### 2. 方法

#### 2.1 試薬溶液調製

- 1) 2×150 mM KCl buffer (500 mL): 2.5 M KCl 60 mL, Glycerol 126 g, 1 M HEPES-NaOH (pH 7.9) 20 mL, 1 M MgCl<sub>2</sub> 1 mL, 1 M CaCl<sub>2</sub> 200 µL, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 400 µL, 10% (w/v) NP-40 10 mLを混合し、超純水にて500 mLまでメスアップする。(フィルターろ過後、室温保存)
- 2) 150 mM KCl buffer: 超純水 25 mL, 2×150 mM KCl buffer 25 mLを混合する。  
※使用前に1 M PMSFを10 µL添加する。
- 3) 1 M PMSF: PMSFをジメチルスルホキシドに溶かし、1 M溶液作製する。(-20℃保存)

#### 結合・洗浄バッファー (150 mM KCl buffer) の組成

20 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 0.1% (w/v) NP-40, 0.2 mM PMSF

#### 酸溶出バッファーの組成

0.1 M Glycine-HCl (pH 2.5)

#### 中和用バッファーの組成

1 M Tris-HCl (pH 9.0)

#### 4×dye溶液の組成 (和光純薬工業株): 191-13272)

0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.02% BPB, 8% SDS, 40% glycerol, 20% 2-メルカプトエタノール

## 実験プロトコール 011

### 2.2 手順

#### 2.2.1 準備

- 1) 150 mM KCl buffer、0.1 M Glycine-HCl (pH 2.5) を準備し、氷上に置く。
- 2) 氷上にてタンパク質溶液を150 mM KCl bufferにて目的の濃度 (1 mg/mL、3 mg/mL等) に調製する。
- 3) 1.5 mLマイクロチューブに分注し、遠心分離 (15,000 rpm、4°C、30分以上) を行い不溶物を除く。(遠心分離後のタンパク質溶液の上清を別のチューブへ回収する。)
- 4) 上記遠心分離中に、抗体固定化ビーズを1.5 mLマイクロチューブへ0.1 mg量りとする。(ビーズは事前に十分に分散させておき、均一な懸濁液とする。)
- 5) 150 mM KCl bufferを200  $\mu$ L加え、ビーズを分散させる。
- 6) スピンドアウン後、磁気分離を行い、上清を廃棄する。(磁気分離は全て5分以上行う)
- 7) 5)~6)を更に2回繰り返す。(バッファーによるビーズの洗浄を計3回行う)

#### 2.2.2 結合、洗浄

- 1) 上清を廃棄したビーズの入っている1.5 mLマイクロチューブへ遠心分離後のタンパク質溶液を200  $\mu$ Lずつ添加し、分散させる。
- 2) 4°Cで、ローテーターにて攪拌しながら2時間結合反応を行う。
- 3) 2時間後、スピンドアウンし、磁気分離を行い、上清を廃棄する。
- 4) 150 mM KCl bufferを200  $\mu$ L加え、ビーズを分散させる。
- 5) スピンドアウン後、磁気分離を行い、上清を廃棄する。
- 6) 4)~5)を更に2回繰り返す。(バッファーによるビーズの洗浄を計3回行う)

#### 2.2.3 溶出

##### 2.2.3.1 酸溶出する場合

- 1) 上清を廃棄したビーズへ、0.1 M Glycine-HCl (pH 2.5) を28  $\mu$ L加え、分散させる。
- 2) 氷上に5分静置にて溶出させ、スピンドアウン後、磁気分離を行う。
- 3) 上清 (酸溶出サンプル) を別の1.5 mLマイクロチューブへ回収する。(ビーズは廃棄する)
- 4) 酸溶出サンプルに中和用バッファー2  $\mu$ Lを加え中和する。
- 5) 4 $\times$ dye溶液を10  $\mu$ L加え、混合する。
- 6) 98°Cにて5分間加熱を行う。(ヒートブロックを使用する)

##### 2.2.3.2 加熱溶出する場合

- 1) 上清を廃棄したビーズへ1 $\times$ dye溶液を40  $\mu$ L加え、分散させる。
- 2) 98°Cにて5分間加熱を行う。(ヒートブロックを使用する)
- 3) ビーズ分散液をスピンドアウンし、室温で磁気分離を行う。
- 4) 上清 (加熱溶出サンプル) を別の1.5 mLマイクロチューブへ回収する。(ビーズは廃棄する)

#### 2.2.4 タンパク質の分析

- 1) 電気泳動 (SDS-PAGE) へ進む。(または-20°C冷凍庫にて保存する)
- 2) 溶出サンプルをそれぞれ電気泳動 (SDS-PAGE) する。(例：各10  $\mu$ L)。
- 3) 泳動後のゲルを銀染色し、結果を解析する。

### 3. 捕足

・ビーズの分散は、ガリガリ法にて行うと容易に分散できる。(この際、チューブの蓋が開かないようにキャップロックを用いることが望ましい。)

(FGビーズのホームページ：<http://fgb.tamagawa-seiki.com/technique/affinity.html> に動画あり)



## 実験プロトコール 011

- ・磁気分離は、氷上に磁石スタンドを置いて行う。



磁石スタンド



磁気分離前



磁気分離後

- ・タンパク質溶液はDignam法にて調製した細胞質画分（または核画分、膜画分）を使用することを推奨する。（参考文献：J.D.Dignam, R.M.Lebowitz, and R.G.Roeder, *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475 (1983)）  
但し、Dignam法は細胞数が非常に多く (>10<sup>9</sup> Cells) 必要となる。小スケールで実施の場合は、NP-40 lysis法、市販の細胞抽出液調製試薬も使用可能。

### 4. 注意事項

- ・ビーズへ混合する前の細胞抽出液の遠心分離は必ず行う。遠心分離を行わないと、凍結融解等により生じた不溶性画分が系中に残存し、バックグラウンドの原因となる。
- ・ビーズは遠心分離でなく、磁気分離で回収する。遠心分離を行うと、反応中に生じたタンパク質の不溶性画分もビーズと一緒に回収してしまい、バックグラウンドの原因となる。
- ・洗浄、溶出等でビーズを分散させる際は塊が無いことを確認する。確実に分散していないと洗浄が不十分となり、非特異的なバンドが出現しやすくなる。
- ・ケラチンのコンタミを防ぐため、手袋を着用して実験を行う。

### 5. 製品情報

下記製品をご使用頂くとバッファー調製の手間を削減できます。

製品名	容量	型式
IP Buffer Kit	1Kit	TAB1200N0320
150 mM KCl buffer, PMSF(-) <sup>1)</sup>	75 mL	
0.1 M Glycine-HCl (pH2.5)	1.5 mL	
1 M Tris-HCl (pH 9.0)	0.1 mL	
150 mM KCl buffer, PMSF (-) <sup>1)</sup>	100 mL	TAB1200N0321
0.1 M Glycine-HCl (pH2.5)	100 mL	TAB1200N0322
1 M Tris-HCl (pH 9.0)	100 mL	TAB1200N0323
1 M HEPES-NaOH (pH7.9)	50 mL	TAB1200N0911
2.5 M KCl	100 mL	TAB1200N0912
1 M MgCl <sub>2</sub>	100 mL	TAB1200N0913
1 M CaCl <sub>2</sub>	100 mL	TAB1200N0914
10%(w/v) NP-40	100 mL	TAB1200N0915

1)使用時に、最終濃度が0.2 mMとなるようにPMSFを添加してください。

以上