

実験プロトコール 012

リガンド固定化ビーズを使用したスクリーニング(リガンド結合タンパク質のアフィニティ精製)競合阻害

1. 準備するもの

1.1 リガンド固定化ビーズ、タンパク質溶液

- ・リガンド固定化ビーズ
リガンド固定化量を変化させたビーズ各0.5 mg
リガンド固定化量以外の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、0.5 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
- ・リガンド(競合阻害用)

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(MgCl₂)
- ・塩化カルシウム(CaCl₂) ・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) ・ジチオスレイトール(DTT) ・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)
- ・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(当社 TA4899N12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 × 100 mM KClバッファー(500 mL): 2.5 M KCl 40 mL、グリセロール 126 g、1 M HEPES-NaOH溶液(pH 7.9)20 mL、1 M MgCl₂溶液 1 mL、1 M CaCl₂溶液 200 μL、0.5 M EDTA溶液(pH 8.0)400 μL、10% NP-40溶液 10 mLを混合し、超純水にて500 mLまでメスアップする。(フィルターを過後、室温保存)
- 2) 100 mM KClバッファー: 超純水 25 mL、2 × 100 mM KClバッファー25 mLを混合する。使用前に1 M DTT溶液 50 μL、1 M PMSF溶液を10 μL添加する。
- 3) 1 M KClバッファー: 2.5 M KCl 18 mL、超純水 7 mL、2 × 100 mM KClバッファー25 mLを混合する。使用前に1 M DTT溶液 50 μL、1 M PMSF溶液を10 μL添加する。
- 4) 1 M DTT溶液: DTTを超純水に溶かし、1 M溶液を作製する。(-20°C保存)
- 5) 1 M PMSF溶液: PMSFをジメチルスルホキシドに溶かし、1 M溶液を作製する。(-20°C保存)
- 6) 20 mM リガンド溶液: リガンドをジメチルスルホキシドに溶かし、20 mM溶液を作製する。
- 7) 100 mM リガンド溶液: リガンドをジメチルスルホキシドに溶かし、100 mM溶液を作製する。

結合・洗浄バッファー(100mM KClバッファー)の組成

20 mM HEPES-NaOH(pH7.9), 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF

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

2.2 手順

- 1) 100 mM KClバッファー、1 M KClバッファーを準備し、氷上に置く。
- 2) 氷上にてタンパク質溶液を100 mM KClバッファーにて目的の濃度(1 mg/mL、3 mg/mL等)に調製する。

実験プロトコール 012

- 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) 回収したタンパク質溶液へ競合阻害用リガンド溶液(競合阻害無しのコントロールはDMSOのみ)をDMSO濃度が1%となるように添加する。この時、リガンド濃度は0 mM、0.2 mM、1 mMとなる。
- 5) 4°Cで、ローテーターにて攪拌しながら2時間プレインキュベーションを行う。
- 6) 上記反応中に、リガンド固定化ビーズを1.5 mLマイクロチューブへ0.5 mg量りとり。(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。)
- 7) 100 mM KClバッファーを200 μ L加え、ビーズを分散させる。
- 8) スピンドアウン後、磁気分離を行い、上清を廃棄する。
- 9) 7)~8)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)
- 10) 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プレインキュベーション後のタンパク質溶液を200 μ Lずつ添加し、分散させる。
- 11) 4°Cで、ローテーターにて攪拌しながら4時間結合反応を行う。
- 12) 4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。
- 13) 100 mM KClバッファーを200 μ L加え、ビーズを分散させる。
- 14) スピンドアウン後、磁気分離を行い、上清を廃棄する。
- 15) 13)~14)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)
- 16) 上清を廃棄したビーズへ1 M KCl バッファーを30 μ L加え、分散させる。
- 17) 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。
- 18) 上清(塩溶出サンプル)を別の1.5 mLマイクロチューブへ回収する。
- 19) 残ったビーズへ1 \times dye溶液を40 μ L加え、分散させる。
- 20) 塩溶出サンプルへは4 \times dye溶液を10 μ L加え、混合する。
- 21) ビーズ分散液、塩溶出サンプル共に98°Cにて5分間加熱を行う。(ヒートブロックを使用する)
- 22) 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。
- 23) 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)
- 24) 電気泳動(SDS-PAGE)へ進む。(または-20°C冷凍庫にて保存する)
- 25) 塩溶出サンプル、加熱溶出サンプルをそれぞれ電気泳動(SDS-PAGE)する。(例:各10 μ L)
- 26) 泳動後のゲルを銀染色し、結果を解析する。

3. 補足

・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://www.magneticnanoparticle.jp/jp/htdocs/technique/affinity.html> に動画あり)



実験プロトコール 012

- ・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($>10^9$ 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。

- ・塩溶出は、弱いアフィニティのタンパク質を遊離させるために行う。加熱溶出で全てのタンパク質を溶出できるので、アフィニティの強さで分離溶出する必要のない場合は、塩溶出工程を除く。また、逆に、より強いアフィニティのタンパク質のみを回収したい場合は、塩溶出バッファーのvolume、溶出回数を増やして洗浄工程として使用することで、強いアフィニティのみのタンパク質を精製可能。

- ・塩溶出サンプルは塩濃度が高いため白濁、沈殿が生じることがあるが、結果に影響は無いのでそのまま電気泳動に進む。

- ・競合阻害のリガンド濃度0.2 mM、1 mM(リガンド量40 nmol、200 nmol)は、ビーズへ固定化されている推定リガンド量(4 nmol/0.5 mg)の10倍から50倍程度となるように設定している。

(通常、リガンドの固定化量は1 mg当たり、1~10 nmol程度が最適です。)

競合阻害による標的タンパク質と思われるバンドの消失が確認できない場合は、リガンド濃度を増加させる。リガンドがDMSOに溶け難いためリガンド濃度を増加できない場合は、バッファー希釈時のDMSO濃度を5%まで上げてリガンド量を多くする。

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。

以上