

TsビーズへのHis-Tagタンパク質の固定化

スクリーニングにおいて、まずビーズへのタンパク質固定化量の最適化が必要です。タンパク質固定化量は、固定化反応時のタンパク質濃度により変化させます。本実験プロトコールでは、固定化反応時のタンパク質濃度を0 μM (0nmol/mg), 2 μM (0.4nmol/mg), 10 μM (2nmol/mg), 50 μM (10nmol/mg) の4段階で固定化する場合の方法を示します。

1. 準備するもの

1.1 ビーズ、リガンド (His-Tagタンパク質)

- ・ Tsビーズ (TAS8848N1150) 10mg (2.5mg/条件)
- ・ His-tagタンパク質 2 mg程度

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 ・ 塩化カリウム ・ エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) ・ グリセリン
- ・ トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) 分子量 121.14 ・ 塩酸

タンパク質固定化バッファーの組成

10mM HEPES-NaOH (pH7.9), 50mM KCl, 1mM EDTA, 10% glycerol

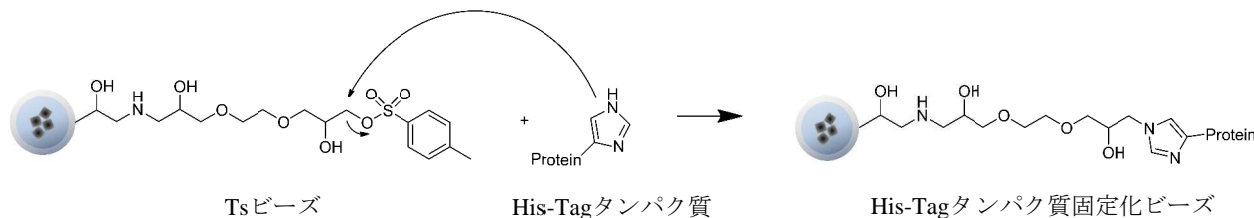
1.3 機器

- ・ 微量高速冷却遠心分離機
- ・ マイクロチューブミキサー (TOMY社 MT-360、など)
- ・ 超音波分散装置
超音波ホモジナイザー (カップホーン付) (多摩川精機TAB4905N10など)
超音波洗浄器 (多摩川精機TAB4905など)

2. 方法

2.1 概要

リガンド固定化の模式図を下記に示す。詳細方法は2.2項を参照下さい。



2.2 手順

- 1) タンパク質固定化バッファーを調製する。
- 2) タンパク質をタンパク質固定化バッファーで希釈し、目的濃度のタンパク質溶液を各500 μL ずつ調製する。(0, 2, 10, 50 μM)
※タンパク質溶液のバッファー組成が異なる場合は、あらかじめタンパク質固定化バッファーに対し透析することをおすすめします。
- 3) Trisを超純水へ溶解し、1 M Tris-HCl溶液 (pH8.0) 3 mLを調製する。(塩酸でpHを調製する。)
- 4) 1.5 mLマイクロチューブ4本へTsビーズを2.5 mgずつとる。
- 5) 遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 6) タンパク質固定化バッファー500 μL を添加し、Tsビーズを超音波にて分散させる。
- 7) 遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 8) 工程6)~7)を2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 9) 工程2) で作製した各濃度のタンパク質溶液を500 μL 加え、ビーズを超音波にて分散させる。
- 10) 4°C、一晚 (16~20時間) マイクロチューブミキサーにて反応させる。
- 11) 反応後、遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を回収する。(タンパク質量)

実験プロトコール 102

- 12) 残ったビーズへ1 M Tris-HCl (pH8.0) を500 μ L加え、分散させる。
- 13) 4°Cで、マイクロチューブミキサーにて攪拌しながら一晩 (16~20時間) 反応させる。
(タンパク質未結合トシル基のマスキング)
- 14) 反応後、遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 15) タンパク質固定化バッファー 500 μ Lを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 16) 遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 17) 工程15)~16)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 18) タンパク質固定化バッファー500 μ Lに分散させ、4°Cにて保存する。
(タンパク質固定化ビーズ濃度 : 0.5mg/100 μ L)

3. 補足

- ・ビーズの分散は超音波ホモジナイザーで容易に分散できるが、それらが無い場合は、超音波洗浄器や試験管立てを使用したガリガリ法でも分散可能。(ガリガリ法では、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)



- ・抗体またはタンパク質固定化後のビーズの分散はガリガリ法にて行う。もし、分散しにくいようなら氷冷した超音波ホモジナイザー、超音波洗浄器で短時間で分散させる。
- ・ビーズの回収は、磁気分離ではなく、遠心分離にて行う。
- ・タンパク質固定化量は、回収した上清のタンパク質量 (Bladford法またはSDS-PAGE) やタンパク質固定化ビーズから直接的にBCA法により算出可能。
- ・タンパク質の固定化量は、タンパク質の仕込み量を増やすことで増加させることができる。
- ・ビーズやタンパク質がマイクロチューブの壁に付着することがあるが、できるだけ分散させるようにする。
- ・固定化するタンパク質溶液中にTrisやBSAが入っている場合はビーズへ固定化されてしまうので固定化反応前に除く。
- ・抗体またはタンパク質固定化ビーズの分散性を上げる場合は保存バッファーの組成を10 mM HEPES (pH7.9)のみにする。

以上