

基本ビーズへの 2 本鎖 DNA の固定化

転写因子などの DNA 結合タンパク質を精製する目的で 2 本鎖 DNA を固定化する実験プロトコールです。このプロトコールは相補的な 1 本鎖 DNA 同士のアニーリング、5' 末端のリン酸化、ライゲーション及びビーズへの固定化を含みます。DNA 突出末端のグアニンのアミノ基とビーズ表面のエポキシ基が反応し、固定化されます。

1. 準備するもの

1.1 ビーズ、リガンド(DNA)

- ・基本ビーズ(型式:TAS8848N1010)20mg (エポキシ基量:約 1 μ mol/mg)
- ・相補的な 1 本鎖 DNA 各 150 μ g 程度

1. 標的配列(例)

5' -AGGGTATGCAAATTAAGAAG-3'

3' -TCCCATACGTTTAATTCTTC-5'

2. 固定化用オリゴヌクレオチドの合成

Sense: 5' -GGGGGAGGGTATGCAAATTAAGAAG-3'

Antisense: 3' -TCCCATACGTTTAATTCTTCCCC-5'

1.2 試薬

- ・T4 Polynucleotide Kinase(タカラバイオ社 2021S など)
- ・T4 DNA Ligase(タカラバイオ社 2011A など)
- ・フェノール/クロロホルム 2 mL ・塩化ナトリウム ・エタノール 10 mL
- ・NICK カラム(GE Healthcare 社 17-0855-02 など)
- ・3M 酢酸ナトリウム(pH5.3) ・2.5M 塩化カリウム ・アガロースゲル
- ・TES バッファー
 - 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
 - 0.3 M KCl
 - 1mM EDTA
 - 0.02 % NaN₃

1.3 機器

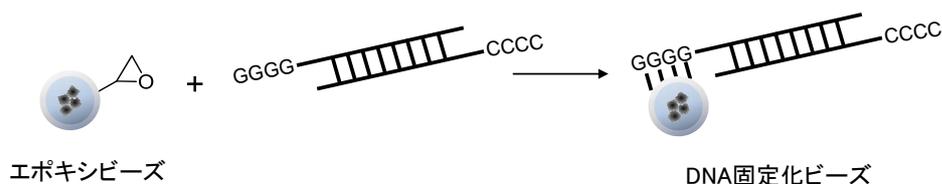
- ・微量高速冷却遠心分離機 ・恒温槽 ・電気泳動装置 ・分光光度計
 - ・UV ランプまたはイメージャー ・ボルテックスミキサー
 - ・超音波分散装置
- 当社では超音波ホモジナイザー:VP-15S カップホーン付(TAITEC社)または超音波分散装置:TA4905(多摩川精機)で動作確認済み。

実験プロトコール 301

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

2.2.1 アニーリング

- 1) 各 1 本鎖 DNA を超純水で希釈し、1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ へ調製する。
- 2) 1.5 mL マイクロチューブへ各 1 本鎖 DNA 水溶液を同量ずつ添加し、混合する。

Sense oligonucleotide	150 μL	(150 μg)
Antisense oligonucleotide	150 μL	(150 μg)
	300 μL	(300 μg)

- 3) 98°Cで 10 分間加熱し、98°Cのお湯 200 mL に浮かべて室温まで冷却する。(一晩)

2.2.2 DNA 末端の PNK (polynucleotide kinase) 処理

(※ 5' 末端をリン酸化した合成オリゴヌクレオチドを使用する場合は、この工程は省略します。)

- 1) アニーリングした DNA を 8 本に小分けし、PNK と混合、37°Cで 60 分間静置にて反応させる。

DNA	35 μL	(35 μg)
10× Kinase buffer	10 μL	
10 mM ATP	10 μL	
H ₂ O	43.2 μL	
T4 Polynucleotide Kinase	1.8 μL	
	100 μL	

実験プロトコール 301

- 2) フェノール/クロロホルムを 100 μ L 添加、30 秒間混合する。(Vortex)
- 3) 15,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離を行い、水層を新しい 1.5 mL マイクロチューブへ移す。
- 4) 3 M 酢酸ナトリウム(pH5.3) 10 μ L、エタノール 250 μ L を添加し、混合する。
- 5) -30°C で 1 時間静置し、エタノール沈殿を行う。
- 6) 15,000 rpm、 4°C で 30 分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 7) 70%エタノール 500 μ L を静かに加え、洗浄(リンス)を行う。
- 8) 15,000 rpm、 4°C で 5 分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 9) 乾燥させる。(真空乾燥等)
- 10) 超純水 10 μ L を加え、溶解する。
- 11) DNA 溶液を 1 本にまとめる。(計 80 μ L)
- 12) DNA 量を定量、濃度を 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ へ調製する。(280 $\mu\text{g}/280 \mu\text{L}$)

2.2.3 ライゲーション(タンデム化)

- 1) DNA を 8 本に小分けし、DNA Ligase と混合する。

DNA	25 μ L	(25 μg)
10 \times Ligation buffer	10 μ L	
H ₂ O	63 μ L	
T4 DNA ligase	2 μ L	
	<hr/>	
	100 μ L	

- 2) スピンドアウン後、 4°C 、静置で一晩反応させる。
- 3) アガロースゲルにて DNA の長さを調べる(目標長さ: 200~400 bp)。
- 4) 超純水 100 μ L を添加する。(液量 200 μ L)
- 5) フェノール/クロロホルムを 200 μ L 添加、30 秒間混合する。(Vortex)
- 6) 15,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離を行い、水層を新しい 1.5 mL マイクロチューブへ移す。
- 7) 3 M 酢酸ナトリウム 20 μ L (pH5.3)、エタノール 500 μ L を添加し、混合する。
- 8) -30°C で 1 時間静置し、エタノール沈殿を行う。
- 9) 15,000 rpm、 4°C で 30 分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 10) 70%エタノール 1 mL を静かに加え、洗浄(リンス)を行う。
- 11) 15,000 rpm、 4°C で 5 分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 12) 乾燥させる。(真空乾燥等)
- 13) 超純水 10 μ L を加え、溶解する。
- 14) DNA 溶液 8 本を 1 本にまとめる。(計 80 μ L)
- 15) NICK カラムにかける。(NICK カラムはあらかじめ超純水で平衡化しておく。)
- 16) 超純水 400 μ L で 4 回溶出する。
- 17) 回収した各フラクションを核酸定量し、最も濃い濃度のサンプル(フラクション 2)を保存する。(DNA 濃度: 約 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

実験プロトコール 301

2.2.4 2本鎖 DNA のビーズへの固定化

- 1) 1.5 mL マイクロチューブ 2 本へ基本ビーズ(型式:TAS8848N1010)を 10mg ずつとる。
- 2) 15,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 3) 超純水 500 μ L を添加し、ビーズを分散させる。
- 4) 15,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 5) 3)~4)を更に 2 回繰り返す。(ビーズの洗浄を計 3 回行う)
- 6) 1 本のチューブにはコントロールのため超純水、もう 1 本のチューブにはライゲーションした DNA 溶液 (250 μ g/mL)を 400 μ L 加え、ビーズを分散させる。(分散しづらい場合は氷冷した超音波ホモジナイザーで短時間で分散させる。)

	-	+	
DNA	0 μ L	400 μ L	(100 μ g)
H ₂ O	400 μ L	0 μ L	

- 7) 50°Cで 24 時間静置にて反応させる。
- 8) 15,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離を行い、上清を回収する。
- 9) 2.5 M 塩化カリウム 400 μ L を添加し、ビーズを分散させる。
- 10) 15,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離を行い、上清を回収する。
- 12) 9)~10)を更に 1 回繰り返す。(ビーズの洗浄を計 2 回行う)
- 13) 超純水 400 μ L を添加し、ビーズを分散させる。
- 14) 15,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離を行い、上清を回収する。
- 15) 13)~14)を更に 1 回繰り返す。(ビーズの洗浄を計 2 回行う)
- 16) TES バッファー400 μ L を添加し、ビーズを分散させる。
- 17) 15,000 rpm、室温で 5 分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 18) 16)~17)を更に 2 回繰り返す。(ビーズの洗浄を計 3 回行う)
- 19) TES バッファー400 μ L に分散させ、4°Cにて保存する。(2本鎖 DNA 固定化ビーズ濃度:25 mg/mL)

※ DNA固定化量は約2 μ g/mg beads (10 pmol/mg)

(Input DNA 量から反応上清、洗浄上清の DNA 量を差し引いて算出する。)

3. 補足

- ・ ビーズの分散は超音波分散装置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。

(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)



以上