

Bisindolylmaleimide X の結合タンパク質の精製

※国内製薬企業との実施

Bisindolylmaleimideは、2つのインドール環がマレイミド基へ結合した構造の化合物のことで、この骨格を持つ Bisindolylmaleimide X (BisX)はプロテインキナーゼ (PKC) 阻害剤として働きます。この実験では、FG beads®へ Bisindolylmaleimide X hydrochlorideを固定化し、細胞抽出液から結合タンパク質を精製しました。

Method 1 Bisindolylmaleimide X hydrochlorideの固定化 (プロトコール 014参照)

NHS beads 20 mg (5 mg×4)

固定化反応

BisX仕込み濃度(mM)	0	0.1	0.3	1
NHS beads (mg)	5	5	5	5
2mM BisX・HCl (uL)	0	50	150	500
4mM Et ₃ N (uL)	0	50	150	500
DMF (uL)	1000	900	700	0
合計 (uL)	1000	1000	1000	1000

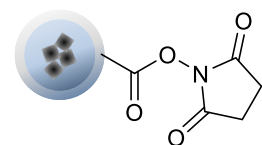
70分, 室温

マスキング 1 M アミノエタノール, 1000 μl

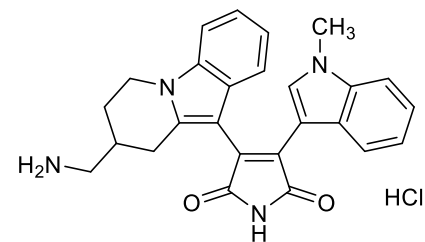
2時間, 室温

洗浄 50% MeOH 1000 μL, 3回

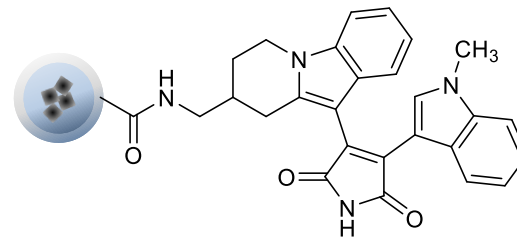
BisX固定化ビーズ (0 mM, 0.1 mM, 0.3 mM, 1 mM) 各 5 mg



NHS beads
(TAS8848N1141)



Bisindolylmaleimide X
hydrochloride



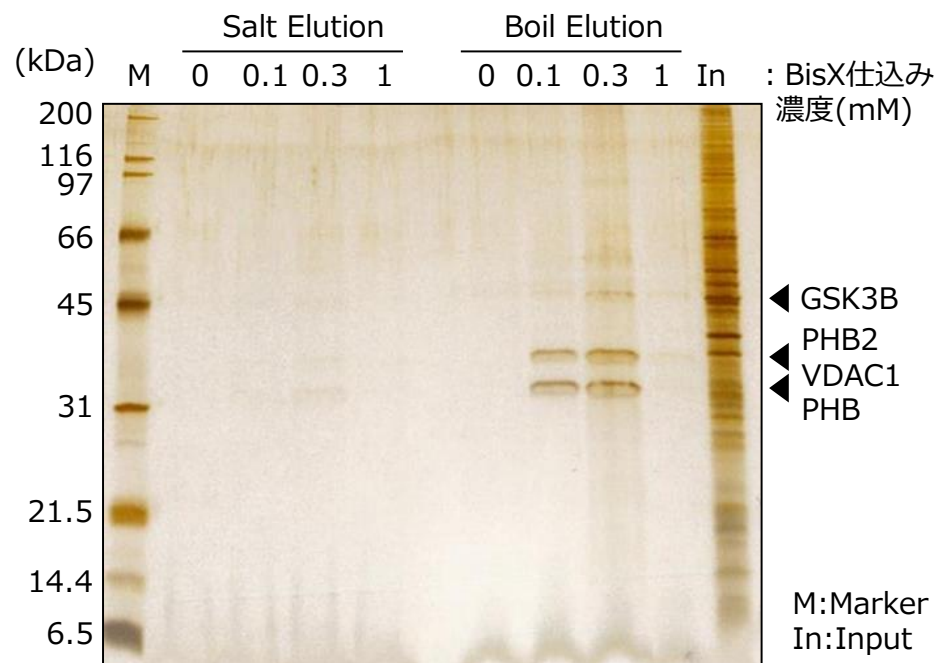
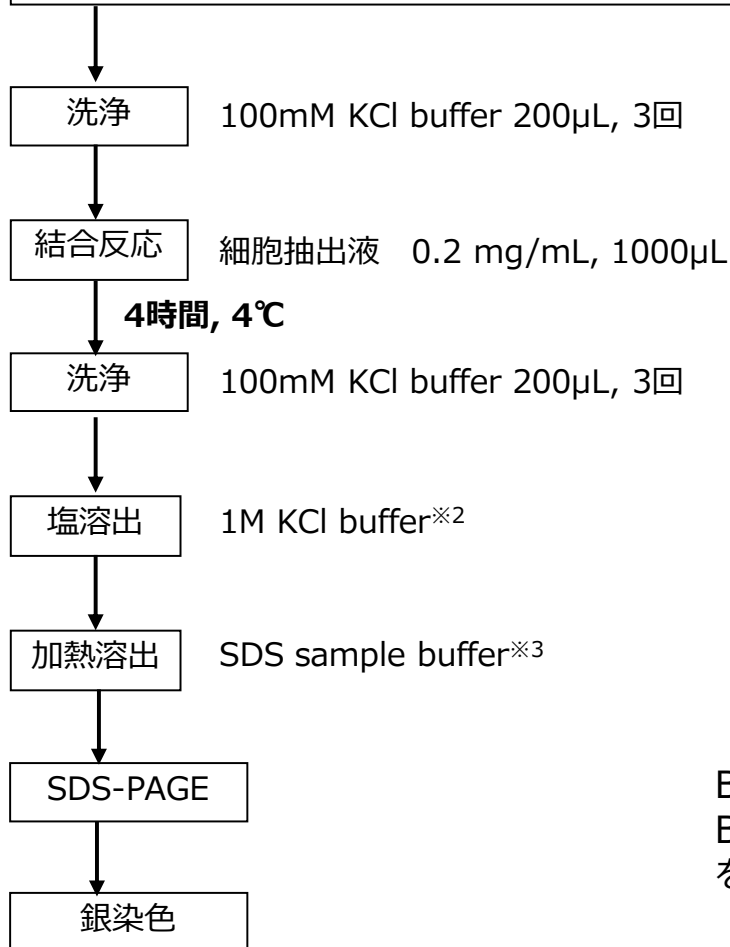
BisX固定化ビーズ

Bisindolylmaleimide X の結合タンパク質の精製

※国内製薬企業との実施

Method 2 Bisindolylmaleimide X 固定化ビーズによるアフィニティ精製 (プロトコール001参照)

BisX固定化ビーズ (0 mM, 0.1 mM, 0.3 mM, 1 mM) 各0.5 mg



BisX固定化ビーズによるアフィニティ精製により、BisX の結合タンパク質 (GSK3 β 、PHB2、VDAC1、PHB) を高純度で精製することができました。

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

※2 : 1 M KCl buffer : 20 mM HEPES-NaOH(pH7.9), 1 M KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF

※3 : SDS sample buffer : 62.5 mM Tris-HCl(pH6.8), 0.005% BPB, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-Mercaptoethanol