

実験プロトコール 001

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)

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

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) ・ノニデットP-40 (NP-40)
- ・グリセリン ・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 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) 2×100 mM KCl buffer (500 mL): 2.5 M KCl 40 mL, Glycerol 126 g, 1 M HEPES-NaOH (pH 7.9) 20 mL, 1 M MgCl₂ 1 mL, 1 M CaCl₂ 200 µL, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 400 µL, 10% 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) 100 mM KCl buffer: 超純水 25 mL, 2×100 mM KCl buffer 25 mLを混合する。使用前に1 M DTT 50 µL, 1 M PMSFを10 µL添加する。
- 3) 1 M KCl buffer: 2.5 M KCl 18 mL, 超純水 7 mL, 2×100 mM KCl buffer 25 mLを混合する。使用前に1 M DTT 50 µL, 1 M PMSFを10 µL添加する。
- 4) 1 M DTT: 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: 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°C保存)

結合・洗浄バッファー (100mM KCl buffer) 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%(w/v) NP-40, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF

塩溶出バッファー (1M KCl buffer) の組成

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

4×dye溶液の組成

0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.02% BPB, 8% SDS, 40% glycerol, 20% 2-Mercaptoethanol

実験プロトコール 001

2.2 手順

- 1) 100 mM KCl buffer、1 M KCl buffer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 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 min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、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) 100 mM KCl bufferを200 μ 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。
- 7) 手順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)
- 8) 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 μ Lずつ添加し、分散させる。
- 9) 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。
- 10) 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。
- 11) 100 mM KCl bufferを200 μ L加え、ビーズを分散させる。
- 12) スピンドアウン後、磁気分離を行い、上清を廃棄する。
- 13) 手順11)~12)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)
- 14) 上清を廃棄したビーズへ1 M KCl bufferを30 μ L加え、分散させる。
- 15) 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。
- 16) 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。
- 17) 残ったビーズへ1 \times dye溶液を40 μ L加え、分散させる。
- 18) 塩溶出サンプルへは4 \times dye溶液を10 μ L加え、混合する。
- 19) 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)
- 20) 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。
- 21) 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)
- 22) 電気泳動 (SDS-PAGE) へ進む。(または-20°C冷凍庫にて保存する)
- 23) 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)
- 24) 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、ガリガリ法にて行く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 001

- ・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。(実験プロトコール401)

参考文献：J.D.Dignam, R.M.Lebovitz, 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、実験プロトコール402を参照。

上記が難しい場合、市販のキット（ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit（MERCK MILLIPORE）、CellLytic M（SIGMA）、等）も使用可。但し、界面活性剤の濃度が1%以上の場合、アフィニティ精製中にリガンドが標的タンパク質に結合するのを妨げる可能性があるので使用前に界面活性剤濃度を0.1%に下げる。

- ・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。

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。

実験プロトコール 001

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
Screening Buffer Kit	1Kit	TAB1200N0330
100 mM KCl buffer, DTT(-), PMSF(-) ¹⁾	75 ml	
1 M KCl buffer, DTT(-), PMSF(-) ¹⁾	2 ml	
100 mM KCl buffer, DTT(-), PMSF(-) ¹⁾	100 ml	TAB1200N0331
1 M KCl buffer, DTT(-), PMSF(-) ¹⁾	100 ml	TAB1200N0332
1 M HEPES-NaOH (pH7.9)	50 ml	TAB1200N0911
2.5 M KCl	100 ml	TAB1200N0912
1 M MgCl ₂	100 ml	TAB1200N0913
1 M CaCl ₂	100 ml	TAB1200N0914
10%(w/v) NP-40	100 ml	TAB1200N0915

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

以上