

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) ドラッグエリ्यूション

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 (ドラッグエリ्यूション用)

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)
- ・塩化カルシウム (CaCl₂)
- ・ノニデットP-40 (NP-40)
- ・ジチオスレイトール (DTT)
- ・電気泳動 (SDS-PAGE) 用ゲル
- ・塩化カリウム (KCl)
- ・エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)
- ・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 (DMSO)
- ・電気泳動用バッファー
- ・塩化マグネシウム (MgCl₂)
- ・グリセロール (グリセリン)
- ・サンプルバッファー (4×dye)
- ・銀染色試薬

1.3 機器

- ・微量高速冷却遠心分離機
- ・磁石スタンド(多摩川精機TAB4899N12など)
- ・ヒートブロック
- ・卓上遠心分離機 (スピンドウン用)
- ・ローテーター
- ・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。(フィルターろ過後、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 DTT溶液 : DTTを超純水に溶かし、1 M溶液を作製する。(-20℃保存)
- 4) 1 M PMSF溶液 : PMSFをDMSOに溶かし、1 M溶液作製する。(-20℃保存)
- 5) ドラッグエリ्यूション用溶出液 : リガンドをDMSOに溶かし、100 mM溶液、500 mM溶液を作製する。結合・洗浄バッファーでDMSO濃度が1%となるように希釈し、0 mM、1 mM、5 mM溶液を作製する。(各30 µL使用する。)

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

実験プロトコール 013

2.2 手順

- 1) 100 mM 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。
- 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) 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量りとする。
(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バッファーを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) 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バッファーを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) 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ドラッグエリユーション用溶出液を30 μ L加え、分散させる。
(0 mM、1 mM、5 mMの3種類行う。)
- 15) 氷上に1時間静置 (時々軽くタッピング) にて溶出させ、スピンドアウン後、磁気分離を行う。
- 16) 上清 (ドラッグエリユーションサンプル) 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) ドラッグエリユーションサンプルへは4 \times dye溶液を10 μ L加え、混合する。
- 19) ビーズ分散液、ドラッグエリユーションサンプル共に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) ドラッグエリユーションサンプル、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://fgb.tamagawa-seiki.com/technique/affinity.html> に動画あり)



実験プロトコール 013

- ・磁気分離は、氷上に磁石スタンドを置いて5分以上行う。



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.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、NP-40 lysis法、市販の細胞抽出液調製試薬も使用可能。
- ・ドラッグエリユーション時のリガンド濃度1 mM、5 mM (リガンド量30 nmol、150 nmol) は、ビーズへ固定化されている推定のリガンド量 (3 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ビーズ1 mg当たり、1~10 nmol程度が最適です。)
推定固定化リガンド量の2倍程度 (0.2 mM) でも結合タンパク質が溶出される場合もある。
- ・結合タンパク質の溶出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に溶解し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