

実験プロトコール 301

Plain beads 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)

- Plain beads (型式 : TAS8848N1010) 20 mg (エポキシ基量 : 約 1 $\mu\text{mol}/\text{mg}$)
- 相補的な 1 本鎖 DNA 各 150 μg 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, 1 mM EDTA, 0.02 % NaN_3

1.3 機器

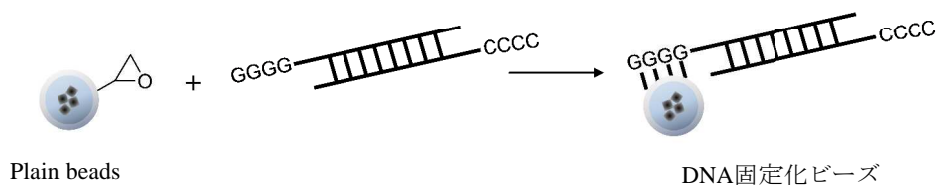
- 微量高速冷却遠心分離機
- 恒温槽
- 電気泳動装置
- 分光光度計
- UV ランプまたはイメージャー
- ボルテックスミキサー
- 超音波分散装置
 - 超音波ホモジナイザー (カップホーン付) (多摩川精機TAB4905N10など)
 - 超音波洗浄器 (多摩川精機TAB4905など)

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 μg/μL 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。(一晚)

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 μL 添加、30 秒間混合する。(Vortex)
- 3) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) 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 μL 、エタノール 250 μL 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) 遠心分離 (15,000 rpm, 4°C , 30 min) を行い、上清を廃棄する。
- 7) 70%エタノール 500 μL を静かに加え、洗浄 (リンス) を行う。
- 8) 遠心分離 (15,000 rpm, 4°C , 5 min) 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 μL を加え、溶解する。
- 11) DNA 溶液を 1 本にまとめる。(計 80 μL)
- 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 μL	(25 μg)
10 \times Ligation buffer	10 μL	
H ₂ O	63 μL	
T4 DNA ligase	2 μL	
	<hr/>	
	100 μL	

- 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 μL を添加する。(液量 200 μL)
- 5) フェノール/クロロホルムを 200 μL 添加、30 秒間混合する。(Vortex)
- 6) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) 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 (pH5.3) 20 μL 、エタノール 500 μL 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) 遠心分離 (15,000 rpm, 4°C , 30 min) 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) 遠心分離 (15,000 rpm, 4°C , 5 min) 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 μL を加え、溶解する。
- 14) DNA 溶液 8 本を 1 本にまとめる。(計 80 μL)
- 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 μL 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

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 Plain beads (型式 : TAS8848N1010) を 10mg ずつとる。
- 2) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 3) 超純水 500 μL を添加し、ビーズを分散させる。
- 4) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 5) 工程 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 400 μL 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。)

実験プロトコール 301

	-	+
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) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) 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) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を回収する。
- 12) 工程 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) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を回収する。
- 15) 工程 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) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 18) 工程 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。(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ブ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)



以上