

## 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 (MgCl<sub>2</sub>)
- ・塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>)      ・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 (スピンドアウン用)
- ・磁石スタンド (当社 TA4899N12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 MgCl<sub>2</sub> 1 mL, 1 M CaCl<sub>2</sub> 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℃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℃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 MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 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 MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 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 (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-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 bufferを200  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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1 M KCl bufferを30  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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://www.magneticnanoparticle.jp/jp/htdocs/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。

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<sup>9</sup> 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。

- ・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に白濁、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。

### 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(-) <sup>1)</sup>	75 ml	
1 M KCl buffer, DTT(-), PMSF(-) <sup>1)</sup>	2 ml	
100 mM KCl buffer, DTT(-), PMSF(-) <sup>1)</sup>	100 ml	TAB1200N0331
1 M KCl buffer, DTT(-), PMSF(-) <sup>1)</sup>	100 ml	TAB1200N0332
1 M HEPES-NaOH (pH7.9)	50 ml	TAB1200N0911
2.5 M KCl	100 ml	TAB1200N0912
1 M MgCl <sub>2</sub>	100 ml	TAB1200N0913
1 M CaCl <sub>2</sub>	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