

実験プロトコール 011

抗体固定化ビーズを使用した免疫沈降実験

1. 準備するもの

1.1 抗体固定化ビーズ、タンパク質溶液

・抗体固定化ビーズ

抗体(-)ビーズおよび抗体(+)ビーズ各0.1 mg

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、0.1 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) ・グリセロール(グリセリン)

・ノニドットP-40(NP-40) ・フッ化フェニルメタンサルホニル(PMSF)

・ジメチルスルホキシド ・サンプルバッファー(4 × dye)

・グリシン ・トリス(ヒドロキシメタル)アミノメタン(Tris) ・塩酸(HCl)

・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 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 × 150 mM KCl buffer (500 mL) : 2.5 M KCl 60 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%(w/v) 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) 150 mM KCl buffer: 超純水 25 mL, 2 × 150 mM KCl buffer 25 mLを混合する。使用前に1 M PMSFを10 μL添加する。

3) 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(150 mM KCl buffer)の組成

20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 0.1%(w/v) NP-40, 0.2 mM PMSF

酸溶出バッファーの組成

0.1 M Glycine-HCl (pH 2.5)

中和用バッファーの組成

1 M Tris-HCl (pH 9.0)

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

2.2 手順

2.2.1 準備

1) 150 mM KCl buffer, 0.1 M Glycine-HCl (pH 2.5)を準備し、氷上に置く。

2) 氷上にてタンパク質溶液を150 mM KCl bufferにて目的の濃度(1 mg/mL, 3 mg/mL等)に調製する。

実験プロトコール 011

- 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、抗体固定化ビーズを1.5 mLマイクロチューブへ0.1 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) 150 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) 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)

2.2.2 結合、洗浄

- 1) 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。
- 2) 4°Cで、ローテーターにて攪拌しながら2時間結合反応を行う。
- 3) 2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。
- 4) 150 mM KCl bufferを200 μ L加え、ビーズを分散させる。
- 5) スピンドアウン後、磁気分離を行い、上清を廃棄する。
- 6) 4)~5)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)

2.2.3 溶出

2.2.3.1 酸溶出する場合

- 1) 上清を廃棄したビーズへ、0.1 M Glycine-HCl(pH 2.5)を28 μ L加え、分散させる。
- 2) 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。
- 3) 上清(酸溶出サンプル)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)
- 4) 酸溶出サンプルに中和用バッファー2 μ Lを加え中和する。
- 5) 4 \times dye溶液を10 μ L加え、混合する。
- 6) 98°Cにて5分間加熱を行う。(ヒートブロックを使用する)

2.2.3.2 加熱溶出する場合

- 1) 上清を廃棄したビーズへ1 \times dye溶液を40 μ L加え、分散させる。
- 2) 98°Cにて5分間加熱を行う。(ヒートブロックを使用する)
- 3) 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。
- 4) 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)

2.2.4 タンパク質の分析

- 1) 電気泳動(SDS-PAGE)へ進む。(または-20°C冷凍庫にて保存する)
- 2) 溶出サンプルをそれぞれ電気泳動(SDS-PAGE)する。(例:各10 μ L)。
- 3) 泳動後のゲルを銀染色し、結果を解析する。

3. 捕足

・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 011

- ・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.Lebowitz, and R.G.Roeder, *Nucleic Acids Res.* 11, 1475(1983)

但し、Dignam法は細胞数が非常に多く(>10⁹ 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。

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
IP Buffer Kit	1Kit	TAB1200N0320
150 mM KCl buffer, PMSF(-) ¹⁾	75 mL	
0.1 M Glycine-HCl (pH2.5)	1.5 mL	
1 M Tris-HCl (pH 9.0)	0.1 mL	
150 mM KCl buffer, PMSF (-) ¹⁾	100 mL	TAB1200N0321
0.1 M Glycine-HCl (pH2.5)	100 mL	TAB1200N0322
1 M Tris-HCl (pH 9.0)	100 mL	TAB1200N0323
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0.2 mMとなるようにPMSFを添加してください。

以上