

## TsビーズへのHis-Tagタンパク質の固定化

スクリーニングにおいて、まずビーズへのタンパク質固定化量の最適化が必要です。タンパク質固定化量は、固定化反応時のタンパク質濃度により変化させます。本実験プロトコールでは、固定化反応時のタンパク質濃度を0  $\mu$ M (0nmol/mg)、2  $\mu$ M (0.4nmol/mg)、10  $\mu$ M (2nmol/mg)、50  $\mu$ M (10nmol/mg) の4段階で固定化する場合の方法を示します。

### 1. 準備するもの

#### 1.1 ビーズ、リガンド(His-Tagタンパク質)

- ・Tsビーズ (TAS8848N1150) 10mg(2.5mg/条件)
- ・His-tagタンパク質 2 mg程度

#### 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 ・塩化カリウム ・エチレンジアミン四酢酸(EDTA) ・グリセリン
- ・トリスヒドロキシメチルアミノメタン 分子量 121.14 ・塩酸

#### タンパク質固定化バッファーの組成

- 10mM HEPES-NaOH(pH7.9)
- 50mM KCl
- 1mM EDTA
- 10% glycerol

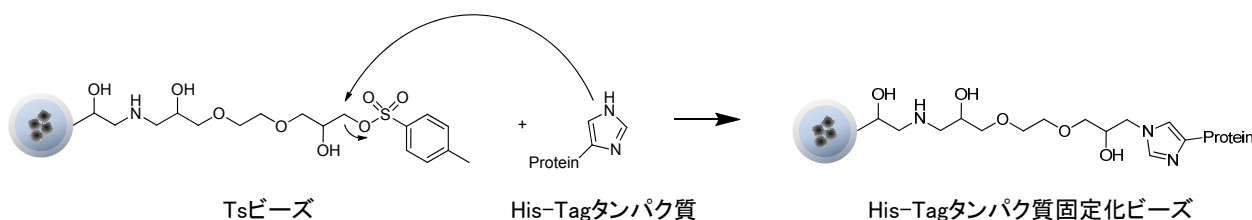
#### 1.3 機器

- ・微量高速冷却遠心分離機 ・マイクロチューブミキサー(TOMY社 MT-360、など)
  - ・超音波分散装置
- 当社では超音波ホモジナイザー:VP-15S カップホーン付(TAITEC社)または超音波分散装置:TA4905(多摩川精機)で動作確認済み。

### 2. 方法

#### 2.1 概要

リガンド固定化の様式図を下記に示す。詳細方法は2.2項を参照下さい。



#### 2.2 手順

- 1) タンパク質固定化バッファーを調製する。
- 2) タンパク質をタンパク質固定化バッファーで希釈し、目的濃度のタンパク質溶液を各500  $\mu$ Lずつ調製する。(0  $\mu$ M、2  $\mu$ M、10  $\mu$ M、50  $\mu$ M)  
※ タンパク質溶液のバッファー組成が異なる場合は、あらかじめタンパク質固定化バッファーに対し透析することをおすすめします。
- 3) トリスヒドロキシメチルアミノメタンを超純水へ溶解し、1M トリスヒドロキシメチルアミノメタン溶液(pH8.0) 3mLを調製する。(塩酸でpHを調製する。)
- 4) 1.5 mLマイクロチューブ4本へTsビーズ(TAS8848N1150)を2.5 mgずつとる。
- 5) 15,000rpm、4°Cで5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 6) タンパク質固定化バッファー 500  $\mu$ Lを添加し、Tsビーズを超音波にて分散させる。
- 7) 15,000rpm、4°Cで5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 8) 6)、7)を2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)

## 実験プロトコール 102

- 9) 作製しておいた各濃度のタンパク質溶液を500  $\mu$ L加え、ビーズを超音波にて分散させる。
- 10) 4°C、一晚(16~20時間)マイクロチューブミキサーにて反応させる。
- 11) 15,000 rpm、4°Cで5分間遠心分離を行い、上清を回収する。(タンパク質量)
- 12) 残ったビーズへ1M トリスヒドロキシメチルアミノメタン(pH8.0)を500  $\mu$ L加え、分散させる。
- 13) 4°Cで、マイクロチューブミキサーにて攪拌しながら一晚(16~20時間)反応させる。(タンパク質未結合トシル基のマスキング)
- 14) 15,000rpm、4°Cで5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 15) タンパク質固定化バッファー 500  $\mu$ Lを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 16) 15,000rpm、4°Cで5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 17) 15)~16)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 18) タンパク質固定化バッファー500  $\mu$ Lに分散させ、4°Cにて保存する。  
(タンパク質固定化ビーズ濃度:0.5mg/100  $\mu$ L)

### 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)



- ・ 抗体またはタンパク質固定化後のビーズの分散はガリガリ法にて行う。もし、分散しにくいようなら氷冷した超音波ホモジナイザー、超音波洗浄器で短時間で分散させる。
- ・ ビーズの回収は、磁気分離ではなく、遠心分離にて行う。
- ・ タンパク質固定化量は、回収した上清のタンパク質量(Bladford法またはSDS-PAGE)やタンパク質固定化ビーズから直接的にBCA法により算出可能。
- ・ タンパク質の固定化量を増やしたい場合はタンパク質の仕込み量を増加させる。
- ・ ビーズやタンパク質がマイクロチューブの壁に付着することがあるが、できるだけ分散させるようにする。
- ・ 固定化するタンパク質溶液中にTrisやBSAが入っている場合はビーズへ固定化されてしまうので固定化反応前に除く。

以上