



MagneHis™ Protein Purification Systemを用いたポリ-ヒスチジンタグタンパク質の自動精製

By Michael Bjerke, M.S., Laurie Orr, B.S., Christopher Cowan, Ph.D., and Becky Godat, M.A., Promega Corporation

アブストラクト

プロメガのMagneHis™ Protein Purification Systemを用いた自動化ハイスループットタンパク質精製は、菌体で発現したポリヒスチジンタグタンパク質を手間をかけず（“walk away”）、迅速に精製する信頼性のあるシステムを提供します。この自動化法は、様々なワークステーションを用いて1mlの菌体培養液からタンパク質を精製するために開発されました。MagneHis™ によるタンパク質精製技術は、様々なサンプル量に合わせてスケールを自由に調整することができます。

本製品は、磁性を持ち流動性のある固相を利用することにより、自動化された手間の掛からない“walk away”方式を可能にした菌体培養液からのポリヒスチジンタグタンパク質を精製するシステムです。

はじめに

新規なタンパク質を迅速に探索するためには、使いやすくハイスループットが可能な質の高いタンパク質精製システムが必要です。ポリヒスチジンタグを用いた組換えタンパク質の発現と精製は、大量の特異性の高い高純度タンパク質を得るために一般的に使用されている手法です。プロメガでは、磁性を持ち流動性のある固相を利用した、自動化された手間の掛からない“walk away”方式で菌体培養液からポリヒスチジンタグタンパク質を精製するシステムを開発しました。手順とサンプル処理量をセットし、精製工程を自動化することにより、研究者はサンプル調製の労力をデータ分析に用いることができます。

プロメガのMagneHis™ Protein Purification Systemに添付されるユニークなCell Lysis Reagentは自動化を容易にします。この構成により菌体ペレットを効率的に懸濁、溶解することができ、他のHis-タグタンパク質精製システムとは異なり、ソニケーションや遠心操作(1)が不要です。本稿では、いくつかの自動化ワークステーションによる標準的な96ウェルプレートフォーマットを用いて得られたデータを示します。使用する自動化プラットフォームによっては、収量を増加させるために簡単にサンプル量をスケールアップすることができます。

自動化ワークステーション

自動化法は、ローからハイスループットまで4種類の装置について開発されています。Thermo Labsystems Kingfisher®, Beckman Biomek® 2000 Laboratory Automation Workstation, Tecan Genesis® RSPおよびBiomek® FX Laboratory Workstationです。Biomek® 2000、Biomek® FXおよびTecan Genesis® RSPは96フォーマットを処理できる液体分注装置で、工程中にプレートの移動や液体の分注操作を自動的に行います。Thermo Labsystems Kingfisher®は、予めマニュアルでライセート、洗浄バッファー、溶出用試薬を分注したプレートを用いて、液体ではなく、磁性体粒子の移動を制御するユニークな装置です。Kingfisher®は、この異なるフォーマットにより1回の自動化プログラムで最大24サンプルを処理する能力を持ちます。

自動化法

18~123kDaのHisタグタンパク質をJM109およびBL21(DE3)pLysS大腸菌株で発現させ、MagneHis™ Protein Purification Systemを用いて精製しました。精製したタンパク質は、RNaseH1、ヒューマニズシ

たウミシイタケルシフェラーゼ、RNasin® Ribonuclease Inhibitor、耐熱性ルシフェラーゼ、メチオニルtRNA合成酵素およびβ-ガラクトシダーゼなどです。菌体の培養は、96ウェルディープウェルスクエアプレート（1ウェルあたり1mlのLB培地を含む）を用いて、37°C（RNasin® Ribonuclease Inhibitorの場合は25°C）で2.0 OD₆₀₀まで培養しました。菌体は遠心によりペレット状にしました。各自動化ワークステーションは精製工程のステップに合わせて最適化しました。ユニークな機械的操作によるKingfisher®の工程は、Biomek® 2000、Biomek® FXおよびTecan Genesis® RSPとは大きく異なります。

菌体ペレットの再懸濁と溶解

Biomek® 2000、Biomek® FXおよびTecan Genesis® RSPでは、まず菌体ペレットの入った96ウェルディープウェルスクエアプレートに1ウェルあたり200μlのCell Lysis Reagentが分注されます。菌体ペレットは、チップミキシングと旋回式シェーカーにより5分間再懸濁されます。菌体の効率的な再懸濁にはチップミキシングとシェーキングの両方が必要です。

Kingfisher®による操作では、菌体ペレットは200μlのCell Lysis Reagentでマニュアル操作により懸濁し、Kingfisher®精製プレートのB列に分注します。

MagneHis™ Ni-Particlesへのタンパク質の結合

Greiner社 U底マルチウェルプレートに、菌体培養液1ml分に使用する30μlのMagneHis™ Ni-Particlesを分注し、次に再懸濁した菌体ライセートを加えました。旋回式シェーカーで完全に攪拌した後、His-タグタンパク質が選択的に結合したMagneHis™ Ni-ParticlesをMagnaBot® 96 Magnetic Separation Device（カタログ番号V8151）で補足しました。フロースルーに含まれる非結合タンパク質は後の分析用に保存しました（オプション）。このサンプル量とプレートタイプの場合、ウェル数に限りがあり、1度に処理するライセート量を半分にする必要があります。

洗浄

MagneHis™ Binding/Wash Buffer 100μlによる洗浄3回で夾雑物や残存する非結合物が除去されます。MagneHis™ Ni-Particlesの効果的な拡散を促すために、旋回式シェーカー上で各洗浄ステップを行います。

溶出

各サンプルに対してMagneHis™ Elution Buffer 100μlを加え、サンプルは旋回式シェーカー上で再懸濁されます。シェーキング後、サンプルを磁力で分離し、分析のために上澄を新しい96ウェルプレートに保存しました。

結果

自動化プログラム終了後、精製された溶出タンパク質20μlをSDS-PAGEで分析しました。図1と図2ではBiomek® FX（図1、パネルA）、Biomek® 2000（図1、パネルB）、Tecan Genesis® RSP（図1、パネルC）およびKingfisher®（図2）を用いたHis-タグ耐熱性ルシフェラーゼの精製結果を示しています。各装置で精製したタンパク質は96ウェルを通して安定した収量が得られました。MagneHis™ Protein Purification

Systemで精製した18~123kDaのサイズ幅のその他のタンパク質も同様の結果になりました（データは示していません）。

装置の配置と処理量の考察

Biomek® FXワークステーションでは、96チャンネルPODにより96サンプルを同時に処理することができるため、大量のサンプルを処理することができます。8 standard fixed tipsを搭載したTecan Genesis® RSP 150 modelは、Biomek® 2000同様に1度に8サンプルを分注できるため、1回分のプログラム中に処理するサンプル数を柔軟に変更できますが、全体的なサンプルの処理量は少なくなります（表1）。Tecan Genesis® RSPにTeMo 96 channel pipetting toolを組み合わせればBiomek® FXと同程度の処理量を実現できます。

ロボットによる処理量は装置や仕様に依存します。Biomek® 2000やTecan Genesis® RSPよりも速くマニュアルでサンプルを処理できても、マニュアルで1度に96サンプルを処理することは退屈で面倒な作業であり、エラーが起きやすい傾向があります。

Thermo Labsystems Kingfisher®は、少数のサンプルを手間無く自動で迅速に処理する場合に適した実用的な装置です（表1）。12サンプルずつ2枚のプレートで同時に処理することができます。プログラムを進行させる前に、各プレートに以下の試薬を分注しておく必要があります。

A列：MagneSil™ Ni-Particles

B列：Cell Pellets resuspended in MagneSil™ Cell Lysis Reagent

C列：MagneSil™ Binding/Wash Buffer

D列：MagneSil™ Binding/Wash Buffer

E列：MagneSil™ Binding/Wash Buffer

F列：MagneSil™ Elution Buffer

結論

いくつかの自動化ワークステーションを用いてHis-タグタンパク質を迅速に精製する自動化MagneHis™ Protein Purification Systemを開発しました。革新的なMagneSil™ Cell Lysis Reagentは、手作業を必要とせず（精製工程中のソニケーションや遠心操作）、実質的な“walk away”タンパク質精製を実現できます。Biomek® FX、Biomek® 2000、Tecan Genesis® RSPおよびKingfisher®向けの方法を開発しました。これらの方法は、実験室でのスタートアップが迅速で、利用者にいくつもの利点を提供します。利点として、ハイスループットアプリケーションのために様々なプラットフォームで簡単に自動化できるシンプルな工程、大量のサンプルを処理するためのスケールアップを容易にする精製方法、バックグラウンドバンドがほとんど見られない高純度タンパク質の精製などがあります。

表1. MagneHis™ Protein Purification Systemの自動化による処理量

方法	所要時間/ 96ウェルプレート	所要時間/ サンプル	8時間シフトでの 処理量
Biomek® FX	25分間	15秒	20プレート
Biomek® 2000	90分間	60秒	5プレート
Genesis® RSP	90分間	60秒	5プレート
Kingfisher®	N/A ¹	50秒	6プレート ²
マニュアル	45分間 ³	30秒	8プレート

¹ 自動化プログラム1回で、12サンプルをそれぞれ含む2枚のKingfisher®プレートを同時に20分以内に処理。

² 8時間シフトで、12サンプルをそれぞれ含むプレート48枚（全576サンプル分）を処理。96ウェルプレートで6枚分に相当。

³ おおよその時間

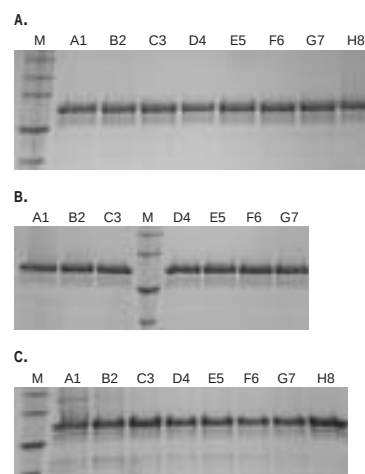


図1. MagneHis™ Protein Purification Systemを用いたHis-タグ耐熱性ルシフェラーゼの自動精製

Biomek® FX（パネルA）、Biomek® 2000（パネルB）、Tecan Genesis® RSP（パネルC）を用い、96ウェルフォーマットで菌体培養液からルシフェラーゼを精製した。図中のA1~H8はプレート中のウェル番号を示す。レーンM: Broad Range Protein Molecular Weight Markers（カタログ番号 V 8491）。

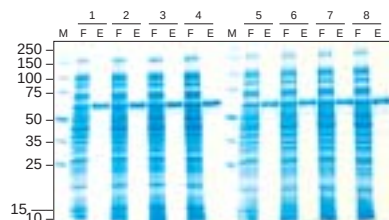


図2. MagneHis™ Protein Purification Systemを用いたKingfisher®によるHis-タグ耐熱性ルシフェラーゼの自動精製

His-タグ耐熱性ルシフェラーゼを発現する菌体サンプルを8つ培養した。各サンプルについて精製タンパク質をMagneHis™ Ni-Particlesから溶出し（レーンE）、MagneHis™ Ni-Particlesで補足されなかったタンパク質のフロースルー画分も採取した（レーンF）。レーンM: Broad Range Protein Molecular Weight Markers（カタログ番号 V 8491）。

参考文献

- Godat, B. et al. (2003) *Promega Notes* **83**, 2–5

プロトコール

- ◆ *MagneHis™ Protein Purification System Technical Manual #TM060*, Promega Corporation (www.promega.com/tbs/tm060/tm060.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
MagneHis™ Protein Purification System	2ml	V8500	26,000
	10ml	V8550	90,000
MagneHis™ Ni-Particles	2ml	V8560	19,000
	10ml	V8565	65,000
MagnaBot® 96 Magnetic Separation Device	1 個	V8151	96,000
MagnaBot® Adapter T1	1 個	V8481	30,000