

免疫沈降物の DIA プロテオーム解析 検体調製方法の推奨プロトコル

【細胞の溶解】

IP Lysis Buffer 組成

Mammalian Lysis Buffer (Promega) 10ml

PhosStop (Sigma) 1 錠

cComplete, ULTRA, EDTA free, mini (Sigma) 1 錠

Benzonase (Merck) 40ul

1M MgCl (Sigma) 10uL

※あくまで当ラボで使用している Buffer です。

※既に使用されている IP 用の Lysis Buffer がおありでしたら、それをご使用いただいで問題ありません。

1. 細胞に IP Lysis Buffer を加え、ピペッティング and Vortex
2. 氷中で 30 分インキュベート
3. Vortex
4. 遠心 15000g 15min 4℃
5. 上清回収
6. タンパク質定量
7. タンパク質濃度を 1~5ug/ul 程度に希釈

【ビーズ処理】

1. Protein G もしくは A ビーズ(ビーズ量は 2-3ug 程度の IgG が結合できる量が目安)
・当受託で検証した適したビーズ量
Sera-Mag SpeedBeads Protein A/G (Cytiva)懸濁液 4uL (おすすめ)
Sure Beads Protein G or A (バイオラット) 懸濁液 10uL
Dynabeads Protein G or A (ベリタス) 懸濁液 12uL
(必要以上にビーズ増やすとプロテオーム解析では逆に結果が悪くなります。ここは重要なポイントになります。)
2. ビーズを洗う TBST or PBST 500uL x2 回 (液を捨てて、次のステップ)
3. TBST or PBST 100uL を加える
4. 4ug の抗体を加える
(ビーズの IgG 結合キャパシティより多めの量を入れる)

5. ローテーター or ゆっくりな mixing 室温 30 分
(ビーズが散乱することを確認)
6. ビーズを洗う TBST or PBST 500uL x3 回 (液を捨てて、次のステップ)
7. ライセートを加える
(ターゲットのタンパク質の量に応じて加える量は考える必要があるが、タンパク量 500ug 程度と反応させておけば概ね問題ない)
8. ローテーター 室温 1~2 時間 (液を捨てて、次のステップ)
(オーバーナイトで反応させるプロトコルもあるが、長時間の反応は非特定な吸着も多くなるのであまり推奨しない。1~2 時間程度の方がプロテオーム解析を行うには適している場合が多い)
9. ビーズを洗う TBST or PBST 500uL x3 回 (液を捨てて、次のステップ)
10. 50mM Tris-HCl pH8.0 100uL を加え、ビーズをピペッティングで懸濁させた後、新しいチューブにビーズごと移し(チューブにも非特定なタンパク質が付いているため、新しいチューブに移す)、液を捨てる
(50mM Tris-HCl pH8.0 は、必ず当受託で準備したものを使用してください。移すチューブはオートクレーブ処理などをしてないエッペンドルフの 1.5ml セーフロックチューブを必ず使用してください。弊社からご提供も可能ですのでお申し付けください。)
11. 50mM Tris-HCl pH8.0 100uL を加えて、ビーズが液に浸っていることを確認
12. サンプルが転倒ないようにラックに入れて、冷蔵便でサンプルを発送
(凍結はしないように。すぐに送れない場合も 4℃ 保存)

お問い合わせ先

株式会社かずさゲノムテクノロジーズ

〒 292-0818

千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7

Tel: 0438-52-2001

Fax: 0438-52-2002

E-mail: otoiawase@kazusagt.com