

免疫沈降物の DIA プロテオーム解析 サンプル調製方法の推奨プロトコル

【細胞の溶解】

IP Lysis Buffer 組成

Pierce IP Lysis Buffer (Cat: 87787, Thermo) 10ml

PhosStop (Sigma) 1 錠

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

※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て問題ありません。

1. 細胞に作成した IP Lysis Buffer を加える(細胞 50mg に対して 500uL 程度が目安)
2. 氷中で 10 分インキュベート (最初と 5 分後と最後に Vortex)
3. 遠心 15000g 30min 4°C
4. 上清回収
5. タンパク質定量
6. タンパク質濃度を 1~4ug/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)

・当受託で推奨しているビーズに対するビーズ量

Sera-Mag SpeedBeads Protein A/G (Cytiva)懸濁液 4uL (おすすめ)

Pierce Protein A/G Magnetic Beads (Thermo) 懸濁液 4uL (おすすめ)

(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. ビーズの入っているチューブに TBST or PBST 100uL を加える
4. ビーズの入っているチューブに抗体 5ug 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. ゆっくりな mixing or ローテーター 室温 30 分
(ビーズが散乱してることを確認)
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

8. (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)
9. ローテーター 室温 1~2 時間 (液を捨てて、次のステップ)
10. ビーズを洗う TBST or PBST 500uL x3 回 (液を捨てて、次のステップ)

ステップ 11 以降から必ずオートクレーブ処理していないチップとチューブを必ず使用してください(オートクレーブ処理によって MS で汚れが検出され、分析の妨げとなる)。当受託ではエッペンドルフ社のスタンダードなチップとチューブの利用を推奨しております。

11. 50mM Tris-HCl pH8.0 100uL を加え、ビーズをピペティングで懸濁させた後、新しい 1.5ml セーフロックチューブ(エッペンドルフ)にビーズごと移して、液を捨てる
* 受託のご依頼時に 50mM Tris-HCl pH8.0 とエッペンドルフ社の 1.5ml セーフロックチューブを無償でお送りしますので、必ず当受託で準備したものを使用してください。
12. 50mM Tris-HCl pH8.0 100uL を加えて軽く攪拌後に液を捨てる
13. 再度、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
14. 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
(推奨のビーズであれば凍結しても問題ないことを確認している)