

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

※参考までに、かずさDNA 研究所プロテオミクスラボで使用している Lysis Buffer を掲載しています。すでにご使用中の IP 用 Lysis Buffer をお持ちの場合は、そちらをご使用いただいで問題ありません。

1. 細胞に作製した IP Lysis Buffer を加える(細胞 50mg に対して 500~1000 μ L 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 1~2 μ g/ μ l 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 2-3 μ g 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 2.5 μ L (おすすめ)
 - Pierce Protein A/G Magnetic Beads (Thermo) 懸濁液 2.5 μ L (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 500 μ L x1 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 100 μ L を加える
4. ビーズの入っているチューブに抗体 5 μ g 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. 軽いミキシング or ローテーター 室温 30 分
 - *ビーズが散乱していることを確認
6. ビーズを洗う TBST or PBST 500 μ L 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 500 μ g 程度と反応させておけば概ね問題ない)

8. 軽いミキシング or ローテーター 室温 1~2 時間 (液を捨てて、次のステップ)
*ビーズが散乱していることを確認
9. ビーズを洗う TBST or PBST 500 μ L x3 回 (液を捨てて、次のステップ)

ステップ 10 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。

10. Tris-HCl (pH8.0)-0.001%LMNG 500 μ L 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(できるだけ残液がないように)
* 受託のご依頼時に Tris-HCl (pH8.0)-0.001%LMNG 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。
11. Tris-HCl (pH8.0)-0.001%LMNG 500 μ L を加えて軽く攪拌後に液を捨てる(できるだけ残液がないように)
* Tris-HCl (pH8.0)-0.001%LMNG による洗いは TBST や PBST に入っていた界面活性剤を除くことが目的です。LC-MS 適性のない界面活性剤は LC-MS 分析に悪影響を及ぼします。もし、非磁性ビーズなどの利用でギリギリまで液を取り除くことができない場合は Tris-HCl (pH8.0)-0.001%LMNG 500 μ L の Wash を追加でもう 1 度行ってください。
12. Tris-HCl (pH8.0)-0.001%LMNG 80 μ L を加えて、ビーズが液に浸っていることを確認
13. サンプルが転倒し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)