

植物からのタンパク質抽出(GFP アフィニティ精製 MS)v.2.1

基生研トランスオミクス解析室

1. 試薬／器具／試料

- シロイヌナズナ(～3 週齢) ～1 g (～50 個体)
- 乳棒, 乳鉢 サンプル毎に各 1 組
- 抽出バッファー: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2% (v/v) Triton X-100 植物 1 g あたり 3 mL
- 洗浄バッファー: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 溶出バッファー: 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50 mM ジチオスレイトール (dithiothreitol; DTT),
1% (w/v) SDS, 1 mM EDTA
- miracloth (5 cm x 5 cm) サンプル毎に 1 枚
- プロテアーゼ阻害剤 (cOmplete™, Mini, EDTA-free) 50 mL あたり 1-2 錠
- 核酸分解酵素 (Benzonase®) 植物 1 g あたり 1 µL
- コニカルチューブ (遠沈管)
- エッペンドルフチューブ (1.5 mL)
- 葉さじ
- 実験用グローブ (ラテックス、ニトリル等)
- 液体窒素保存容器
- 液体窒素用デュワー瓶
- 遠心機 (50 mL チューブが回せるもの)
(GFP カラム精製)
- µMACS™ Anti-GFP MicroBeads (Miltenyi Biotec) 植物 1 g あたり 10 µL
- µ Columns (Miltenyi Biotec) サンプル毎に 1 個
- µMACS™ Separator 1 台
(S-Trap™ カラム精製)
- S-Trap™ 蛋白質前処理カートリッジ (S-Trap micro units) サンプル毎に 1 個
- 2x lysis buffer: 10% SDS, 100 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB) pH 8.5
- 120 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) 用事調製
- 250 mM iodoacetamide (IAA) 用事調製／暗所
- Phosphoric acid diluted to 27.5% with water
- Binding/wash buffer: 100 mM TEAB (pH 7.55, adjusted with H₃PO₄) in 90% methanol
- Trypsin stock solution (1 µg/µL)
- Digestion buffer: 50 mM TEAB containing sufficient trypsin stock solution
e.g. 50 ng trypsin in 20 µL 50 mM TEAB
- Elution buffer 1: 50 mM TEAB (pH 8.5)
- Elution buffer 2: 0.2% ギ酸
- Elution buffer 3: 50% acetonitrile

※バッファー類や使用する阻害剤は目的に合わせて変更／最適化。

2. 方法

(注意事項)ケラチンの混入を防ぐため、常に実験用グローブをして実験を行う。

チップ類は原則フィルタチップを用いる。操作はできる限り氷上で行う。

1. コニカルチューブに 25~50 mL の抽出バッファーに入れ、プロテアーゼ阻害剤 1 錠を加え、氷上で溶解する(20~30 分)。同時に、wash 用の抽出バッファー(プロテアーゼ阻害剤なし)を、別のチューブに 25 mL 程度準備しておく。
2. 植物 1 g あたり 3 mL の抽出バッファー(1.で準備した阻害剤あり)を、コニカルチューブに分注する。
3. 寒天培地から植物体を引き抜き、おおよその重量を量る。
(-80℃保存し、後日、再開可。)
4. デュワー瓶に液体窒素を汲み取る。
5. 乳鉢に植物体を入れ、液体窒素を加えながら乳棒で破碎する。液体窒素がなくなったら追加し、破碎する作業を 4 回程度繰り返す。
6. 葉さじを用いて、破碎サンプルを抽出バッファー入りのチューブ(2.で準備)に素早く移す。全て移したら、よく混合する。だまを溶かすめ、5 分おきによく混合し、氷上で 30 分間置く。
7. 新しいコニカルチューブに 1 枚の miracloth をセットし、溶液(全量)をろ過する。
8. 植物 1 g あたり 1 μ L の Benzonase(核酸分解酵素)を加え、穏やかに混和する。氷上で 2 時間静置する。
9. 5,000 x g, 4℃で 10 分間遠心し、上清をピペットマンでエッペンドルフチューブ(1.5 mL)に移し取る(必要本数)。
10. 20,000 x g, 4℃で 20 分間遠心し、上清をピペットマンで新しいコニカルチューブに移し取る。
11. 一部(10 μ L 程度)をエッペンドルフチューブに取り、Bradford 法などでタンパク質濃度を測定する。または、簡易的に分光光度計(NanoDrop)を用いて測定する。測定結果に基づき、濃度の濃いサンプルの液量を減らすことで、アフィニティ精製に供する総タンパク質量を揃える。
(液体窒素により瞬間的に凍結させた後、-80℃保存し、後日、再開可。)

——ここまで前日準備。以下、トレーニングコース当日の工程。——

【GFP カラム精製】

12. 植物 1 g あたり 10 μ L の anti-GFP Microbeads を加え、穏やかに混和して、氷上で 30 分間静置する。
13. その間に、あらかじめ組み立てておいたスタンドに μ Column を固定し、200 μ L の抽出バッファーで洗浄する。
14. タンパク抽出溶液(12.で準備)を全量 μ Column に流し、等量(~2 mL)の抽出バッファーで洗浄する。
15. 100 μ L の洗浄バッファーで洗浄する。
16. 事前に 95℃で加熱しておいた溶出バッファー20 μ L を μ Column に加え、5 分間静置する。
17. 溶出バッファーを更に 50 μ L 加えて、タンパク質を溶出する。
(S-Trap カラムによる精製を続けて行わない場合は、溶出バッファーを適切なものに修正し、95℃で 3 分間処理して変性させ、-30℃で保存する。)
18. (オプション)一部(1 μ L 程度)をエッペンドルフチューブに取り、Bradford 法などでタンパク質濃度を測

定する。または、簡易的に分光光度計(NanoDrop)を用いて測定する。

【S-Trap カラム精製】

19. 5 μ L の溶出液(タンパク質量:< 50 μ g)に、6.5 μ L の溶出バッファーを加える。
(MS にアプライするペプチド量から逆算して、処理するタンパク質溶液量を調整する。残りは-20℃保存。)
20. 等量(11.5 μ L)の 2x lysis buffer を加える。
(製品のプロトコルに従い、適宜、スケールアップ／ダウンを行う。)
21. 【還元】 1 μ L の 120 mM TCEP 溶液(FC: 5 mM)を加え、55℃で 15 分間置く。
22. 【アルキル化】 1 μ L の 250 mM IAA 溶液(FC: 10 mM)を加え、暗所、室温で 20 分間置く。
23. 【pH 調整】 2.5 μ L の 27.5% リン酸溶液(FC: ca. 2.5%)を加え、vortex でよく混合する。
24. 165 μ L の binding/wash buffer を加え、混合する。
25. S-Trap カラムを 1.5 mL のチューブ(廃液用)にセットし、サンプルを入れる。
26. 4,000 x g, 室温で 30 秒間遠心し、タンパク質をトラップする。
27. 150 μ L の binding/wash buffer を加え、4,000 x g, 室温で 30 秒間遠心する。
28. 27.を計 3 回繰り返す。
29. 4,000 x g, 室温で 1 分間遠心し、バッファーを完全にのぞく。
30. S-Trap カラムを新しい 1.5 mL のチューブに移す。
31. 20 μ L の digestion buffer (incl. 50 ng trypsin)を加え、ゆるめに蓋をし、47℃で 1~2 時間置く。
32. 20 μ L の elution buffer 1 を加え、4,000 x g, 室温で 1 分間遠心する。
33. 20 μ L の elution buffer 2 を加え、4,000 x g, 室温で 1 分間遠心する。
34. 20 μ L の elution buffer 3 を加え、4,000 x g, 室温で 1 分間遠心する。
35. 溶出したペプチド溶液を濃縮遠心する。必要に応じて、乾固し-80℃で保存する。