

タンパク質複合体研究の為の Dynabeads[®]

2010~2011

APPLICATION NOTE

タンパク質の機能および相互作用の研究は、現在注目されている研究分野です。タンパク質の構造をみることにより、補因子や他の分子がどのような形で酵素反応またはタンパク質活性に影響しているかを確認できます。

タンパク質複合体の分離は、以前からタンパク/タンパク間での弱いイオン相互作用が遠心等による機械操作により壊されてしまうため、難しいとされていました。

このアプリケーションノートでは、Dynabeadsを使って効率的にタンパク質複合体を分離する為のアプリケーション例をご紹介します。



Traditional methods

従来のタンパク質複合体の分離に使用されるセファロースビーズとスピнкаラムにはいくつかの欠点があります。

- ビーズ表面が広いため非特異結合を拾い易い
- タンパク質にとって過激な遠心操作
- スピнкаラムでの溶出の際の過剰な希釈
- プレクリアのステップが必要

さらに、セファロースビーズを使ってプレクリアした後も非特異的結合が解消されず、バックグラウンドが高くなるという欠点もあります。

Dynabeads を使うことで、これらの欠点を解消することができます。

The Dynabeads® methods

特異的な抗体やタグに結合する分子を Dynabeads に結合させてターゲットのタンパク質複合体を分離・精製します。

Dynabeads と反応させたサンプルを磁石に近づけビーズをチューブ側に引き寄せることにより、ターゲットタンパク質が結合したタンパク質複合体を回収することができます。

Dynabeads を用いた方法は、遠心操作を伴わない穏やかな操作で、短時間で実行するため、タンパク質複合体が維持されその機能も保たれます。

精製されたタンパク質複合体は少量のバッファーで再懸濁して Mass 解析やウエスタンブロットティングなどのアッセイに使用できます。

Dynabeads の利点

- タンパク質複合体の状態および機能を維持して分離可能
- プレクリアのステップが不要
- 非特異結合の除去
- 自動化に対応
- 短時間で簡単に行うことができる

Dynabeads はターゲットの抗体やタンパク質によって最適なものをお選び頂けます。Dynabeads は、ProteinA や ProteinG がビーズ表面に結合されているものや、Dynabeads M270 Epoxy/Dynabeads Streptavidin のようにお手持ちの抗体やタグのついたタンパクを結合させることも可能です。

Dynabeads のタンパク質複合体分離における使用例

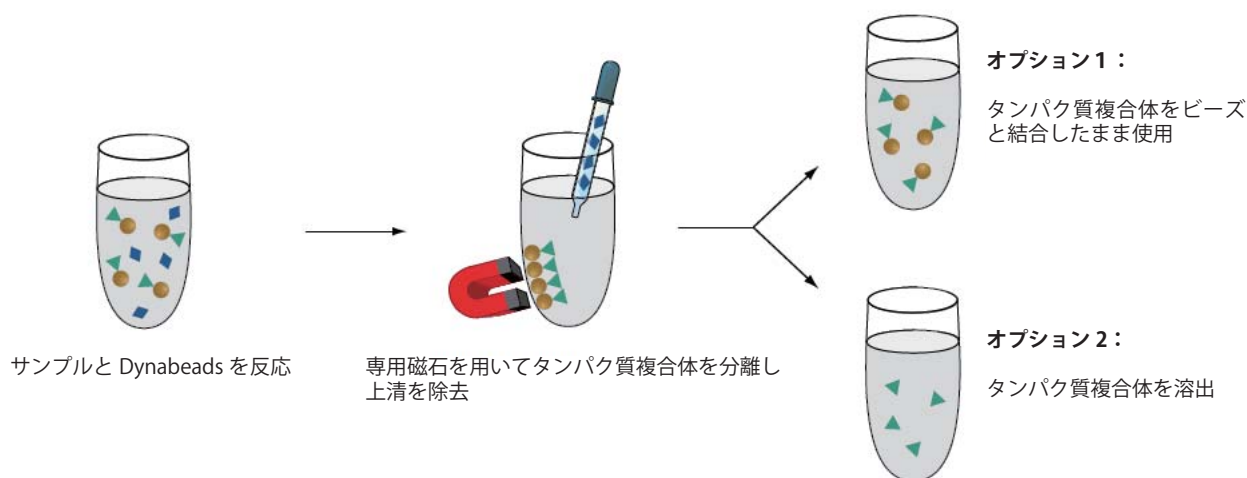
ロックフェラー大学の Cristea らは、タンパク質に GFP でタグをつけることで、生きた細胞内でのタンパク質およびその相互作用を可視化しました。この論文で DynabeadsM-270 Epoxy と抗 GFP 抗体を使用した精製は、短時間で効率がよく、タンパク質複合体は構造を保っており、非特異的な結合が最小限であることが証明されました。著者らは、細胞の機能を理解するにあたって Dynabeads を使うことは大変有用であると考えています。

Dynabeads M-270 Epoxy を抗 GFP ポリクローナル抗体または IgG とインキュベーションし、可溶化された細胞溶解液に加えます。これらの抗体がついた Dynabeads はターゲットのタンパク質に結合し、その後マグネットにセットすることで回収します。

Dynabeads を洗浄後、ターゲットタンパク質を溶出し、液体窒素で凍結させて vacuum centrifugation にて一晚乾燥させます。

Mass 解析の前にペレットを SDS-PAGE buffer 上で precast 1-D を使い分離させます。

このプロトコールはウイルスやバクテリア、酵母、哺乳類組織、培養細胞、マウスなどのサンプルで使用可能です。



カリフォルニア大学の Devos らは核膜孔複合体 (NPC) で核膜での高分子輸送のメカニズムについて研究を行っています。著者らはコンピューターおよび生化学的解析により NPC の部分複合体の一つにおける 7 つのタンパク質を解析しました。7 つの酵母 Nup 抽出物を使い、ドメインの境界とループの位置で NPC を構成するタンパク質のマッピングを行っています。Protein A のタグつき Nup はタンパク質分解抵抗性のタグつき Dynabeads M-270 Epoxy を使うことによりマグネットによる精製が可能になります。エンドプロテアーゼを加えることで、ペプチド結合を加水分解し、ビーズ上のタンパク質フラグメントを SDS-PAGE にて分離させます。また、エドマン分解法またはフラグメントの分子量解析を行うことにより切断部位を決定しています。

ロンドン大学ユニバーシティー・カレッジの Khalili らはプリオン病の脳内で正常プリオン (PrP) がどのように異常プリオン (PrP^{Sc}) に変換されるかについて研究を行っています。著者らは病気および正常の脳組織のホモジネートからの PrP^{Sc} と Glycoform の免疫沈降の為にモノクローナル抗体を製作し IP を行いました。Direct IP はマウス IgG が結合した Dynabeads Protein A またはビオチン化抗体が結合した Dynabeads M-280 Streptavidin、モノクローナル抗体を架橋させた Dynabeads を使用し、行っています。Indirect IP は抗体抗原複合体を捕捉する為に、抗 PrP モノクローナル抗体 IgG および Dynabeads ProteinG が使われました。本研究により異なって糖鎖付加された未変性の PrP^{Sc} が一緒に免疫沈降され、疾患との関連が示唆されました。

Products

Product	Volume	Cat.no.	Choose for:
Dynabeads®Protein A	1mL	DB10001	For use with: • Human IgG1,2,3 • Mouse IgG2a,2b,3 • Rat IgG2c • Bovine IgG2 • Canine IgG • Goat IgG2 • Guinea Pig IgG • Monkey IgG • Porcine IgG • Rabbit IgG • Sheep IgG2
	5mL	DB10002	
Dynabeads®Protein G	1mL	DB10003	For use with: • Human IgG1,2,3,4 • Mouse IgG1,2a,2b,3 • Rat IgG2a,2c • Bovine IgG1,2 • Goat IgG1,2 • Guinea Pig IgG • Hourse IgG • Monkey IgG • Porcine IgG • Rabbit IgG • Sheep IgG1,2
	5mL	DB10004	
Dynabeads®M-270 Epoxy	60mg	DB14301	For gentle binding of structurally intact and active peptides,proteins, and enzymes- hydrophilic surface.
	300mg	DB14302	
Dynabeads®M-280 Tosylabttivated	2mL(30mg/mL)	DB14203	For easy coupling of antibodies for affinity capture of proteins- hydrophobic surface.
	10mL(30mg/mL)	DB14204	
	10mg(100mg/mL)	DB30101	
Dynabeads®M-280 Streptavidin	2mL	DB11205	For use with biotinylated proteins. For general protein purification,sequence-specific DNA/ RNA capture,and biopanning. Needs BSA blocking.
	10mL	DB11206	
	100mL	DB60210	
Dynabeads®MyOne Streptavidin T1	2mL	DB65601	Ideal for manual or automated protocols- low-charged and neutral beads optimal for proteins,peptides,and antibodies.
	10mL	DB65602	
	100mL	DB65603	
Dynabeads®M-280 Sheep anti-Mouse IgG	2mL	DB11201	For use with mouse IgG1,IgG2a,and IgG 2b,not IgG3. Fc reactive.
	10mL	DB11202	
Dynabeads®M-280 Sheep anti-Rabbit IgG	2mL	DB11203	For use with any rabbit IgG antibody.
	10mL	DB11204	

Featured papers:

1. Cristea, I.M. et al. (2005) Fluorescent Proteins as Proteomic Probes. *Molecular & Cellular Proteomics* 4(12): 1933–1941.
2. Devos, D. et al. (2004) Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture. *PLoS Biol* 2(12): e380.
3. Khalili-Shizari, et al. (2005) PrP glycoforms are associated in a strain-specific ratio in native PrPSc. *J General Virology* 86: 2635–2644.

Other relevant articles:

1. Aartsen, W.M. et al. (2006) Mpp4 recruits Psd95 and Veli3 towards the photoreceptor synapse. *Human Molecular Genetics* 15 (8): 1291–1302.
2. Blethrow, J. et al. (2007) Modular mass spectrometric tool for analysis of composition and phosphorylation of protein complexes. *PLoS ONE* 2 (4): e358.
3. Catrein, I. et al. (2005) Experimental proof for a signal peptidase I like activity in *Mycoplasma pneumoniae*, but absence of a gene encoding a conserved bacterial type I SPase. *FEBS Journal* 272: 2892–2900.
4. Cristea, I.M. et al. (2006) Tracking and elucidating alphavirus-host protein interactions. *J Biol Chem* 281: 30269–30278.
5. Drouet, J. et al. (2006) Interplay between Ku, Artemis and the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit at DNA ends. *J Biol Chem* 281: 27784–27793.
6. Gudz, T.I. et al. (2006) Glutamate stimulates oligodendrocyte progenitor migration mediated via an alphaV integrin/myelin proteolipid protein complex. *J Neuroscience* 26 (9): 2458–2466.
7. Hara, T. et al. (2007) Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing Actinin-4 in prostate cancer cells. *Molecular and Cellular Proteomics* 6: 479–491.
8. Harrison, M. et al. (2006) Some *C. elegans* class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-365 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex. *Proc Natl Acad Sci, USA* 103(45): 16782–16787.
9. Hayes, M.J. et al. (2006) Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20-independent interaction with the APC/C. *Nature Cell Biology* 8(6): 607–614.
10. Kantardzhieva, A. et al. (2006) MPP3 is recruited to the MPP5 protein scaffold at the retinal outer limiting membrane. *FEBS Journal* 273: 1152–1165.
11. Kawai, T. et al. (2006) Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins T1A-1 and HuR. *Molecular and Cellular Biology* 26 (8): 3295–3307.
12. Maeda, Y. et al. (2006) PARP-2 interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant Protein-B. *J Biol Chem* 281 (14): 9600–9606.
13. Mazan-Mamczarz, K. et al. (2006) Translational repression by RNA-binding protein TIAR. *Molecular and Cellular Biology* 26(7): 2716–2727.
14. Ogawa, C. et al. (2007) Gemin2 plays an important role in stabilizing the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem* 282 (15): 11122–11134.
15. Pinsky, B.A. et al. (2006) Glc7/protein phosphatase 1 regulatory subunits can oppose the IPI1/Aurora protein kinase by redistributing Glc7. *Molecular and Cellular Biology* 26 (7) 2648–2660.
16. Reimers, K. et al. (2006) Sequence analysis shows that Lifeguard belongs to a new evolutionarily conserved cytoprotective family. *Int J Molecular Medicine* 18: 729–734.
17. Renvoise, B. et al. (2005) Distinct domains of the spinal muscular atrophy protein SMN are required for targeting to Cajal bodies in mammalian cells. *J Cell Science* 119: 680–692
18. Schulze, W.X. et al. (2005) Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 1: 2005.0008.
19. Usui, K. et al. (2005) Protein-protein interactions of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Genome Biology* 6:R98.
20. Wang, C.W. et al. (2006) Exomer: a coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J Cell Biology* 174 (7): 973–983.
21. Zawacka-Pankau, J. et al. (2007) Protoporphyrin IX interacts with Wild-type p53 Protein in vitro and induces cell death of human colon cancer cells in a p53-dependent and-independent manner. *J Biol Chem* 282 (4): 2466–2472.
22. Zissimopoulos, S. et al. (2007) Redox sensitivity of the ryanodine receptor interaction with FK506-binding protein. *J Biol Chem* 282 (10): 6976–6983.
23. Suzuki, H. et al. (2004) In vitro pull-down assay without expression constructs. *BioTechniques* 37 (6): 918–919.

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL.03-3593-3211 (代) FAX.03-3593-3216
E-mail: veritas@veritastk.co.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>

RDBF-3042