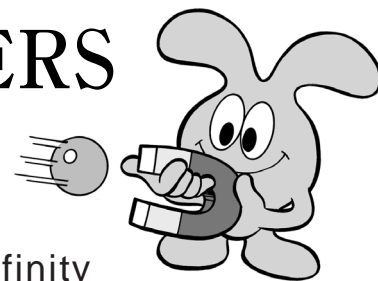


# DYNABEADS LETTERS



## Dynabeads M-280 streptavidin を使ったDNA affinity precipitation assay (DNAP assay)

東京大学医科学研究所・細胞化学研究部

鈴木健之・吉田光昭

### 1 .目的

特定のDNA塩基配列を認識して結合するDNA-蛋白複合体を検出する。

### 2 .原理

ビオチン化DNAと蛋白の複合体をDynabeads M-280 Streptavidin に固定化し、磁力によりDNA-蛋白質複合体を回収する。

### 3 .用意するもの

- ・ 細胞の核抽出液または蛋白溶液
  - 一般的な方法(例えばDignamらの方法)に従って、核蛋白質を抽出する。
  - 核抽出液はDNAP buffer(後述)に対して透析しておくことが望ましい。
- ・ ビオチン化DNAプローブ
  - ビオチン化プライマーを用いたpolymerase chain reaction(PCR)により、ビオチン化DNAプローブを調製。(後述)
- ・ DNAP buffer
  - DNAと蛋白質を結合させるときのbufferで、下記の組成のものを使用している。

20mM	HEPES-KOH Ph7.9
80mM	KCl
1mM	MgCl <sub>2</sub>
0.2mM	EDTA
0.5mM	DTT
10%(W/V)	glycerol
0.1%	tritonX-100

  - 使用直前にfinal 0.1mMになるようにPMSFを加える。
- ・ Dynabeads M-280 streptavidin
- ・ Dunal MPC-E
  - 1.5mlチューブを立てるMagnet付ラックでDynabeadsを回収するために使う。
- ・ poly dl・dC
- ・ SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロットティングを行うのに必要な試薬・装置

### 4 方法 <sup>1</sup>

#### 1 ビオチン化DNAプローブの調製

目的の塩基配列をもつオリゴヌクレオチドを合成し、アニーリングして2本鎖にした後(必要に応じtandemに数回繰り返してligationする)、ベクターにクローニングする。この挿入部位の両側のベクター部分の配列をプライマーとして用いる。この2つのプライマーの5'末端にビオチンが共有結合したものをを用いる。

#### 2 DNAP assay

##### 1) 結合反応(1.5mlチューブ)

核抽出液	100µg蛋白
ビオチン化DNA	1µg
Poly dl・dC	15µg
DNAP buffer	X 1
<hr/>	
H <sub>2</sub> Oで	500µl

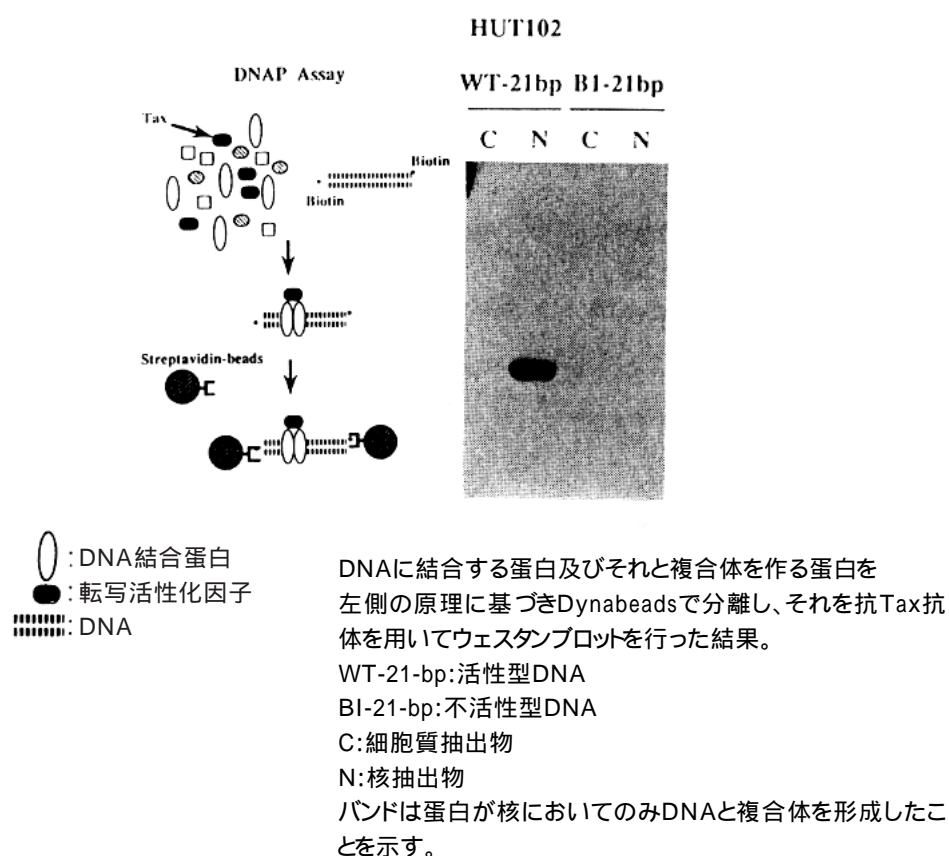
混合し、氷上、30分間インキュベートする。

- 2) 別のチューブにDynabeads M-280 streptavidinを50 $\mu$ l取り、DynaMPC-Eにチューブを立て、30秒間放置した後、上清を取り除く。
- 3) 2)のチューブに1)の反応液を加え、4 で30分間チューブを回転混合してDynabeadsにDNAプローブを固定化する。
- 4) Dynal MPC-Eにチューブを立て、30秒～1分後上清を取り除く。
- 5) DNAP buffer 500 $\mu$ lを加え、4 で10分間回転混合する。
- 6) 4)、5)の操作をあと2回繰り返す。
- 7) Dynal MPC-Eにチューブを立て、上清を取り除いた後、SDSゲル用のsample buffer を20 $\mu$ l加え、2分間、100 処理する。
- 8) このサンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。
- 9) 通常の方法によりウェスタンブロットティングを行い、回収されたDNA結合蛋白質を解析する。

## 5. 備考

- ・ この方法により、DNAに直接結合する蛋白質はもちろん、間接的に結合する蛋白質も検出することができる。
- ・ 我々は通常、回収されたDNA結合蛋白質の検出を抗体を用いたウェスタンブロットティングで行っている。<sup>35</sup>S-Metなどで放射標識した核抽出液を用いれば、抗体を使わないで検出が可能である。
- ・ 結合蛋白のDNA配列特異性は、変異体DNAプローブを用いてテストする。
- ・ DNAとDNA結合蛋白質の結合条件は、各自で検討する必要がある。検討すべき条件として、DNAP bufferの組成(特に塩濃度triton X-100の濃度)、poly dl·dCの量、反応温度、washの回数などがあげられる。

<sup>1</sup> Suzuki, T., Fujisawa, J., Tokita, M. and Yoshida, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. in press.



お問合せは 日本総代理店

株式会社

**ペリダス**

〒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