



一般研究用

TR-TUBE — Trypsin Resistant Tandem Ubiquitin-binding Entity —

TR-TUBE プロトコール例

Cat. No.: TIP001 Product Name: FLAG-TR-TUBE plasmid
Cat. No.: TIP001M Product Name: FLAG-TR-TUBE mutant plasmid
Cat. No.: TIP002 Product Name: HA-TR-TUBE plasmid

メーカー略号：CSR

2017年10月1日作成

www.cosmobio.co.jp

プロトコール例

哺乳類細胞のトランスフェクション

1. 10 cm φ ディッシュに 1.3×10^6 の 293T 細胞を 24 時間培養後、3.5 μg FLAG-TR-TUBE 発現ベクターと 3.5 μg ユビキチンリガーゼ発現ベクターを 21 μl PEI 溶液 (1mg/ml Polyethylenimin, linear (Polysciences 社製) pH7.4) を用いてトランスフェクションする。
2. コントロールとして、FLAG-TR-TUBE 発現ベクターとドミナントネガティブ変異型ユビキチンリガーゼ、FLAG-TR-TUBE 変異体発現ベクターとユビキチンリガーゼ発現ベクター、及び FLAG-TR-TUBE 発現ベクターと空ベクターをトランスフェクションした細胞を用意する。

ポリユビキチン化タンパク質の分離

1. トランスフェクション後、48 時間培養した細胞 (~1.5 mg/ml) を、1.5 ml 容サンプルチューブに移す。
2. 2,000 rpm, 3 分の遠心分離で細胞を集め、培地を除去し、1 ml PBS を加え細胞を懸濁後、2,000 rpm, 3 分の遠心分離で細胞を集め、上清を除去する。
3. 氷冷したタンパク質抽出バッファー (25mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5%NP-40, complete-EDTA free (Roche 社製)) 1 ml を加え、激しくボルテックスをし、10 分氷上し、15,000 rpm, 20 分の遠心分離を行う。
4. 新しい 1.5 ml 容サンプルチューブに 15 μl FLAG-Agarose (Sigma FLAG-M2 agarose, もしくは MBL 社抗 DDDDK-tag アガロース) を分注し、3. で得られた遠心上清を移し、4°C、1 時間ローテーターで穏やかに混和する。

ユビキチン化タンパク質の同定

1. 免疫沈降したビーズを、1 ml TBS-N(25 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl) で5回洗浄後、1 ml 50 mM 重炭酸アンモニウムで2回洗浄する。
2. 上清を完全に除いた後、20 μ l 200 μ g/ml FLAG ペプチド (Sigma 社製) を加え、ビーズを懸濁後 10 分置く。この際、2 分おきにタッピングにより懸濁する。上清を新しい 1.5 ml 容サンプルチューブに移す。同様にさらに 2 回溶出操作を繰り返し、60 μ l の FLAG-TR-TUBE 結合タンパク質溶液を集める。(→質量分析にも使用可)
3. このうち、10 μ l を用いて、SDS-PAGE 電気泳動を行い、銀染色でタンパク質の有無を確認する。

ウェスタンブロットティングによるユビキチン化の検出

1. 免疫沈降したビーズを、1 ml TBS-N で5回洗浄後、SDS-PAGE サンプルバッファーを 50 μ l 加え、95°C 5 分間処理する。(トランスフェクションに使用している細胞に内在している目的の基質タンパク質を認識できる抗体を用いてユビキチン化を検出する。コントロールでは検出されない高分子のスミアが FLAG-TR-TUBE とユビキチンリガーゼを発現させた検体でのみ検出される。)

di-Gly ペプチドの精製と質量解析

トリプシン消化

1. 上記 50 μ l の FLAG-TR-TUBE 結合タンパク質溶液に、5 μ l 50 mM Tris (2-carboxy-ethyl)phosphine hydrochloride (TCEP、Sigma 社製) を添加し、60°C、30 分処理した後、2.5 μ l 200 mM Methyl Methanethiosulphoate (MMTS、和光純薬社製) を添加し室温で 10 分おく。50 μ g Trypsin Gold (Promega 社製) を添加し、37°C、16 時間反応する。

di-Gly ペプチドの精製と質量解析

1. 上記トリプシン消化物に、20 μ l 25x complete-EDTA free と 102.5 μ l の純水を加える。PTMScan Ubiquitin Remnant Motif (K- ϵ -GG) kit (Cell Signaling 社製) に付属の 10x IAP Buffer を 20 μ l 添加した 200 μ l の溶液 (pH を必ず確認することが必要) に、予め PBS で洗浄した 15 μ l の PTMScan Ubiquitin Remnant Motif (K- ϵ -GG) antibody Bead Conjugate を加え、ローターを用いて、4°C、2 時間穏やかに混和する。1x IAP Buffer で 2 回ビーズを洗浄後、純水で 3 回洗浄する。上清を完全に除いた後、20 μ l 0.15% Trifluoroacetic acid で 3 回抽出する。抽出物より ZipTip (Millipore 社製) や StageTips (Thermo 社製) などの C18 カラムを用いて精製したペプチドを質量分析により解析する。

本商品をご利用になられた文献、発表データを募っております。

本商品をご利用いただき投稿された論文、学会発表/パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法

郵 送 〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
コスモ・バイオ株式会社 開発部 宛

E-mail cosmobio_BD@cosmobio.co.jp ※ PDF ファイルにてお送りください。

