

ストレプトアビジンビーズ、ニュートラアビジンビーズへのビオチン標識物固定化

1. 準備するもの

1.1 ビーズ、ビオチン標識物溶液

- ・ ストレプトアビジンビーズ（またはニュートラアビジンビーズ） 2.0 mg
 (2.0 mgのうち1.0 mgはビオチン標識物を反応させない (-) ビーズとして用いる)
 Streptavidin beads, HM-Streptavidin beads, FF Streptavidin beads, FS Streptavidin beads,
 NeutrAvidin™ beads, HM- NeutrAvidin™ beads
- ※磁気を含まないビーズを使用する場合は、遠心分離（15,000 rpm、4℃、5min）でビーズを回収する。
- ・ 使用するビオチン標識物溶液（化合物、抗体、タンパク質、DNA、RNA など）
 - 1) ビオチン標識化合物：4~12 mM
 (容量はビーズ1 mgにつき10μL用意、PBSに溶解出来ない場合はDMSOに溶解する)
 - 2) ビオチン標識タンパク質または抗体：0.4 mg/mL (容量はビーズ1 mgにつき120μL用意)
 - 3) ビオチン標識DNAまたはRNA：0.4 mg/mL (容量はビーズ1 mgにつき120μL用意)

1.2 試薬

- ・ 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸（HEPES）
- ・ 水酸化ナトリウム（NaOH） ・ 塩化カリウム（KCl） ・ エチレンジアミン四酢酸（EDTA）
- ・ グリセリン（グリセロール） ・ 塩化ナトリウム（NaCl）
- ・ リン酸水素二ナトリウム ・ リン酸二水素カリウム
- ・ トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Tris） ・ 塩酸（HCl）
- ・ ジメチルスルホキシド（DMSO）

バッファー組成

- 1) ビオチン標識タンパク質または抗体、ビオチン標識化合物を結合させる際の結合バッファー
 PBS(-)
- 2) ビオチン標識DNAまたはRNAを結合させる際の結合バッファー
 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl
- 3) 洗浄・保存バッファー
 10mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 50mM KCl, 1mM EDTA, 10% glycerol

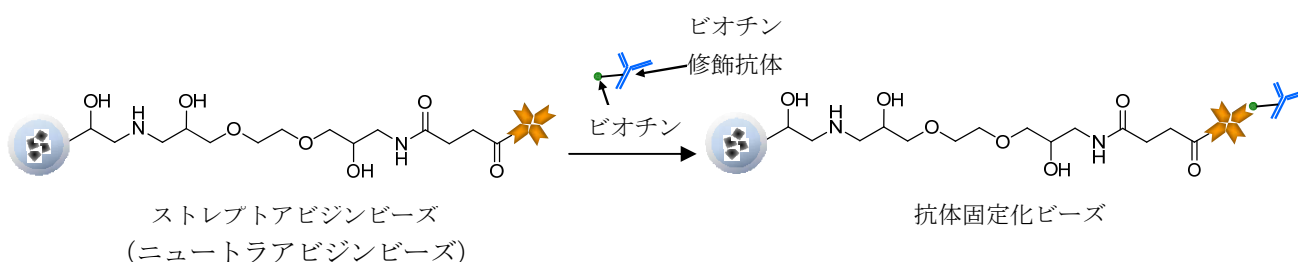
1.3 機器

- ・ 卓上遠心分離機（スピンドアウン用） ・ マイクロチューブミキサー（TOMY社 MT-360、など）
- ・ 磁気分離スタンド ・ 微量高速冷却遠心分離機

2. 方法

2.1 概要

リガンド固定化の模式図（例：抗体）を下記に示す。詳細方法は2.2項を参照下さい。



実験プロトコール 108

2.2 手順

- 1) 結合バッファーを氷上に置き冷却する。
- 2) ビオチン標識物を結合バッファーにて目的の濃度（1-1参照）に調製する。
- 3) 1.5 mLマイクロチューブを2本用意し、ストレプトアビジンビーズ1 mg（50 μ L）をそれぞれに添加する（1本はビオチン標識物を添加しないコントロールビーズとする）。
- 4) 結合バッファーを200 μ L加え、ビーズを分散させる（ガリガリ法）。
- 5) スピンドウン後、磁気分離を行い、上清を廃棄する。
- 6) 4)~5)を更に2回繰り返す。（バッファーによるビーズの洗浄を計3回行う）
- 7) 上清を廃棄したビーズの入っている1.5 mLマイクロチューブへ結合バッファーを添加し、ガリガリ法にて分散させる。その後、各種ビオチン標識物を添加する。
添加する結合バッファーとビオチン標識物の量は以下の通り。
 - a) ビオチン標識タンパク質とビオチン標識DNAの場合：100 μ Lの結合バッファー添加後にガリガリ法にて分散、そこへ100 μ Lのビオチン標識タンパク質溶液を添加し全量200 μ Lとする。
 - b) ビオチン標識化合物の場合：195 μ Lの結合バッファーを添加後にガリガリ法にて分散、そこへ5 μ Lのビオチン標識化合物を添加し全量200 μ Lとする。
- 8) マイクロチューブミキサーで攪拌しながら4°Cで1時間結合反応を行う。
- 9) 1時間後、スピンドウンし、磁気分離を行い上清を回収する。（固定化量定量）
- 10) 洗浄・保存バッファーを500 μ L加え、ビーズをガリガリ法で分散させる。
- 11) スピンドウン後、磁気分離を行い、上清を廃棄する。
- 12) 10)~11)を更に2回繰り返す。（バッファーによるビーズの洗浄を計3回行う）
- 13) 200 μ Lの洗浄・保存バッファーを加えてガリガリ法で分散後、4°C保存する。
(ビオチン標識物固定化ビーズ濃度：0.1 mg/20 μ L)

3. 補足

- ・ビーズを分散させる場合、ガリガリ法にて行う。（この際、チューブの蓋が開かないようにキャップロックを用いることが望ましい。）もし、分散しにくいようなら氷冷した超音波ホモジナイザー、超音波洗浄器で短時間で分散させる。

(FGビーズのホームページ：<http://www.magneticnanoparticle.jp/jp/htdocs/technique/affinity.html> に動画あり)



- ・タンパク質及び抗体固定化量は、回収した上清のタンパク質量（Bladford法またはSDS-PAGE）より算出可能。
- ・DNA固定化量は、回収した上清の核酸定量により算出可能。
- ・固定化量を増やしたい場合は仕込み量を増加させる。

以上