

## Streptavidin beads、NeutrAvidin beads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

- Streptavidin beads (またはNeutrAvidin beads) 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コントロール(-)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 (FS beads) を使用する場合は、遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 5 min) でビーズを回収する。
- ※FG beadsは5分以上、HM beadsは1分以上磁気分離を行う。

- 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

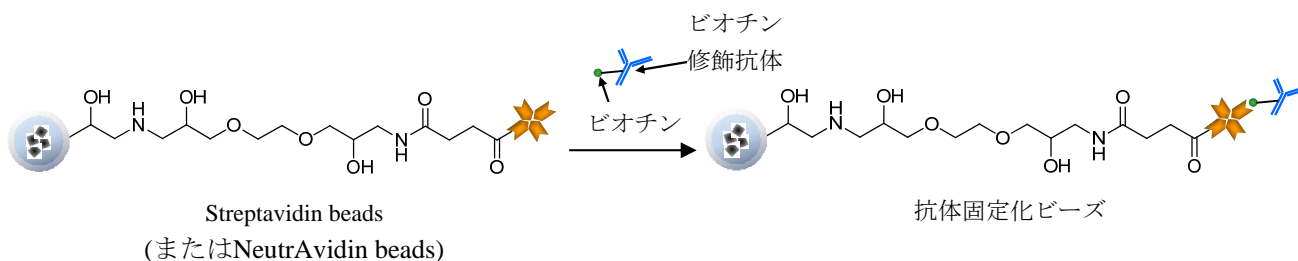
#### 1.3 機器

- 卓上遠心分離機 (スピンドウン用)      マイクロチューブミキサー (TOMY社 MT-360、など)
- 磁石スタンド (当社TAB4899N12など)      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。



## 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、Streptavidin beads (またはNeutrAvidin beads) 1 mg (50  $\mu$ 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  $\mu$ 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) 工程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  $\mu$ Lの結合バッファー添加後にガリガリ法にてビーズを分散、そこへ100  $\mu$ Lのビオチン標識タンパク質溶液を添加し全量200  $\mu$ Lとする。
  - b) **ビオチン標識化合物の場合：**  
195  $\mu$ 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  $\mu$ Lのビオチン標識化合物を添加し全量200  $\mu$ 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  $\mu$ 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) 工程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  $\mu$ 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  $\mu$ L)

## 3. 補足

- ・ビーズの分散は超音波分散装置で容易に分散できるが、それらが無い場合は、超音波洗浄器や試験管立てを使用したガリガリ法でも分散可能。(ガリガリ法では、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。)
- (FGビーズのホームページ：<http://fgb.tamagawa-seiki.com/technique/affinity.html> に動画あり)



- ・タンパク質または抗体固定化量は、回収した上清のタンパク質定量 (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