

Protein A beads、Protein G beadsへの抗体の固定化

1. 準備するもの

1.1 ビーズ、リガンド (抗体)

- ・ Protein A beadsまたはProtein G beads : 2.0 mg
(2.0 mgのうち1.0 mgは抗体を固定化しないコントロール(-)ビーズとして用いる)
Protein A beads, HM-Protein A beads,
Protein G beads, HM-Protein G beads, FF Protein G beads, FS Protein G 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。
- ・ 抗体溶液 0.5 mg/mL (容量はビーズ1 mgにつき120 μL程度用意)
(抗体固定化量を増やしたい場合は濃度を上げる。)

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) ・ 塩化ナトリウム (NaCl) ・ 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)
- ・ リン酸水素二ナトリウム ・ リン酸二水素カリウム

バッファー組成

1) 結合バッファー

PBS(-)

2) 洗浄・保存バッファー

10 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol

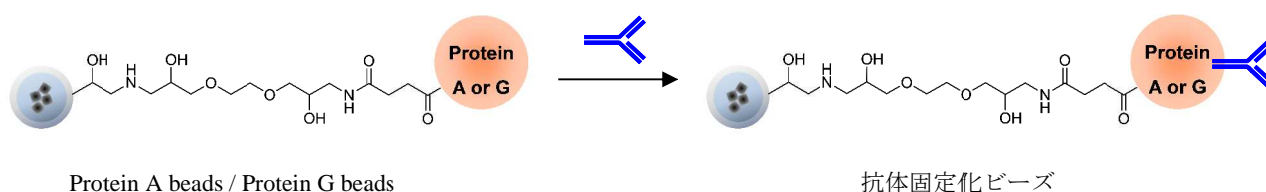
1.3 機器

- ・ 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 ・ ボルテックスミキサー

2. 方法

2.1 概要

リガンド固定化の模式図を下記に示す。詳細方法は2.2項を参照下さい。



2.2 手順

- 1) 抗体結合バッファー (PBS) を氷上に置き冷却する。
- 2) 抗体を抗体結合バッファーにて目的の濃度 ((1.1)参照) に調製する。
- 3) ビーズをボルテックス等で十分に分散させた後、1.5 mLマイクロチューブへビーズを1 mgずつ添加する。(ビーズ濃度20 mg/mLの場合 : 50μL)
(添加濃度を検討する場合は、適宜マイクロチューブの本数を増やす。)
- 4) 抗体結合バッファー200 μLを加え、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1回繰り返す (バッファーによるビーズの洗浄を計2回行う)。

実験プロトコール 110

- 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抗体結合バッファーを100 μ Lずつ添加し、ガリガリ法にて分散させる。その後、工程2)で調製した抗体溶液100 μ Lを添加する。
- 8) 室温で30分反応させる (マイクロチューブミキサー)。
- 9) 30分後、スピンドウンし、室温で磁気分離を行い、上清を廃棄する。(定量する場合は保存しておく。)
- 10) 洗浄・保存バッファーを500 μ L加え、ビーズを分散させる。
- 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) 洗浄・保存バッファー200 μ Lを加えてガリガリ法で分散後、4°C保存する。
(抗体固定化ビーズ濃度：0.1 mg/20 μ 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ブ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)



- ・抗体固定化量は、回収した上清のタンパク質量 (Bradford法またはSDS-PAGE) より算出可能。
- ・固定化量を増やしたい場合は仕込み量または濃度を増加させる。

以上