

Protein Aビーズ、Protein Gビーズへの抗体の固定化

1. 準備するもの

1.1 ビーズ、リガンド(抗体)

- ・Protein AビーズまたはProtein Gビーズ: 2.0 mg
(2.0 mgのうち1.0 mgは抗体を固定化しない(-)ビーズとして用いる)
- ・抗体溶液 0.5 mg/mL(容量はビーズ1 mgにつき120 μ L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) ・グリセリン(グリセロール)
- ・水酸化ナトリウム(NaOH) ・塩化ナトリウム(NaCl) ・塩化カリウム(KCl)
- ・リン酸水素二ナトリウム ・リン酸二水素カリウム ・エチレンジアミン四酢酸(EDTA)

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

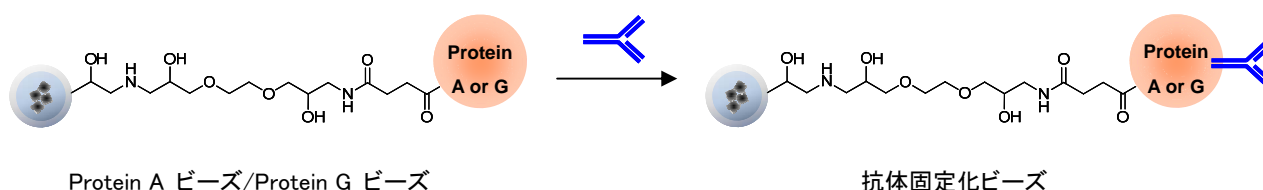
1.3 機器

- ・卓上遠心分離機(スピンドアウン用) ・磁気分離スタンド
- ・マイクロチューブミキサー(TOMY社 MT-360、など) ・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 1 mg(20 mg/mLビーズ濃度: 50 μ L)をそれぞれに添加する。
(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) スピンドアウン後、磁気分離を行い、上清を廃棄する。
- 6) 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)。
- 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添加し、ガリガリ法にて分散させる。その後、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)。

実験プロトコール 110

- 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) 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。
(抗体固定化ビーズ濃度: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)



- ・ 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。
- ・ 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