

FF/FS beads : Linker beadsへの抗体またはタンパク質の固定化

1. 準備するもの

1.1 ビーズ、リガンド (抗体)

- ・ FF Eu Linker beads (TAB8849N2110) またはFS Eu Linker beads (TAB5849N2110) 1 mg
- ・ 抗体またはタンパク質 50 µg程度

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)

タンパク質固定化・保存バッファー: 10mM HEPES-NaOH (pH7.9)

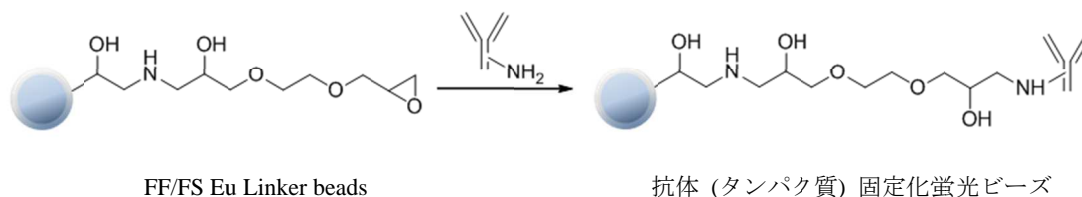
1.3 機器

- ・ 微量高速冷却遠心分離機
- ・ マイクロチューブミキサー (TOMY社 MT-360、など)
- ・ 超音波分散装置
超音波ホモジナイザー (カップホーン付) (多摩川精機TAB4905N10など)
超音波洗浄器 (多摩川精機TAB4905など)

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) タンパク質固定化・保存バッファーを調製する。
- 2) 抗体をタンパク質固定化・保存バッファーで希釈し、50 µg/50 µLの抗体溶液を50µL以上 (50 µL吸引できるように少し余分に調製) 作製する。
- 3) 1.5 mLマイクロチューブへFF/FS Eu Linker beadsを1 mgとる。
- 4) 遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 5) タンパク質固定化・保存バッファー 50 µLを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 6) 遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 7) 手順5)~6)を2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 8) タンパク質固定化・保存バッファー 50 µLを添加しビーズを超音波にて分散させる。
- 9) 抗体またはタンパク質溶液 50 µLを添加する。
- 10) 37°C、一晚 (16~20時間) マイクロチューブミキサーにて反応させる。
- 11) 翌日、遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を回収する。(タンパク質量)
- 12) タンパク質固定化・保存バッファー 200 µLを添加し、ビーズを分散させる。
- 13) 遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 14) 手順12)~13)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 15) タンパク質固定化・保存バッファー 100 µLに分散させ、4°C、暗所にて保存する。
(抗体固定化ビーズ濃度 : 10 mg/mL)

実験プロトコール 501

3. 補足

- ・蛍光強度の低下を防ぐため、保存はビーズ濃度10 mg/mL以上とする。
- ・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)



- ・抗体またはタンパク質固定化後のビーズの分散はガリガリ法にて行う。分散しにくい場合は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。
- ・ビーズの回収は、磁気分離ではなく、遠心分離にて行う。
- ・抗体及びタンパク質固定化量は、回収した上清のタンパク質定量 (Bladford法またはSDS-PAGE) やタンパク質固定化ビーズから直接的にBCA法により算出可能。
- ・抗体及びタンパク質の固定化量を増やしたい場合は抗体及びタンパク質の仕込み量を増加させる。
- ・固定化するタンパク質溶液中にTrisやBSAが入っている場合はビーズへ固定化されてしまうので固定化反応前に除く。

以上