

COOH 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 (抗体またはタンパク質)

- ・ COOH beads (TAS8848N1140) 1 mg (COOH基量: 約200 nmol/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
- ・ 塩化カリウム ・ エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) ・ グリセリン
- ・ モルホリノエタンスルホン酸 (MES) ・ メタノール
- ・ N,N'-ジメチルホルムアミド (DMF) ・ N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) (分子量115.09)
- ・ 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC・HCl) (分子量191.70)
- ・ アミノエタノール (分子量61.08) ・ 塩酸 ・ イソプロピルアルコール (IPA)
- ・ Nonidet P-40 (NP-40)

タンパク質固定化バッファの組成

- 25 mM MES-NaOH (pH6.0) ・ ・ ・ ・ 抗体
- 25 mM HEPES-NaOH (pH7.0) ・ ・ ・ ・ その他のタンパク質

タンパク質固定化ビーズ洗浄・保存バッファの組成

- 10 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol

マスキング溶液 (pH8.0) の組成

- 1 M アミノエタノール, 0.1% NP-40
- ※塩酸でpHを調製

1.3 機器

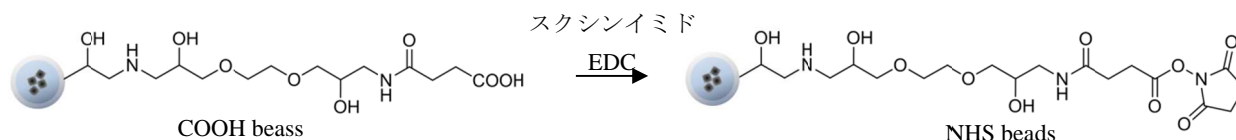
- ・ 微量高速冷却遠心分離機 ・ マイクロチューブミキサー (TOMY社 MT-360、など)
- ・ 超音波分散装置
- 超音波ホモジナイザー(カップホーン付) (多摩川精機TAB4905N10など)
- 超音波洗浄器 (多摩川精機TAB4905など)

2. 方法

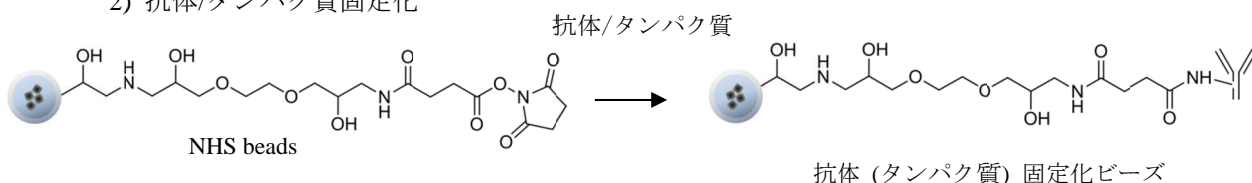
2.1 概要

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。

1) NHS化



2) 抗体/タンパク質固定化



実験プロトコール 101

2.2 手順

- 1) タンパク質固定化バッファー、洗浄・保存バッファー及びマスキング溶液を調製する。
- 2) NHS 28.8 mgをDMF250 μ Lへ溶解し、1 M NHS溶液を調製する。
- 3) 抗体またはタンパク質をタンパク質固定化バッファーで希釈し、50 μ g/50 μ Lの抗体溶液を50 μ L以上 (50 μ L吸引できるような少し余分に調製) 作製する。
- 4) 1.5 mLマイクロチューブへCOOH beads (TAS8848N1140) を1 mgとる。
- 5) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 6) DMF 100 μ Lを添加し、COOH beadsを超音波にて分散させる。
- 7) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 8) 手順6)、7)を2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 9) 別の1.5 mLマイクロチューブへEDC \cdot HCl 7.68 mg (40 μ mol)を量り取る。
- 10) COOH beadsへDMF 160 μ Lを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 11) 1 M NHS溶液を40 μ L添加し、混合する。
- 12) COOH beads-NHS溶液 200 μ Lを手順9) で秤量したEDCに添加し、超音波にて分散させる。
- 13) 室温、2時間、マイクロチューブミキサーにて反応させる。
- 14) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 15) DMF 100 μ Lを添加し、ビーズ (NH beads) を超音波にて分散させる。
- 16) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 17) 手順15)、16)を4回繰り返す (ビーズの洗浄を計5回行う)。
- 18) DMF 100 μ Lを添加し、ビーズ (NHS beads) を超音波にて分散させる。(NHS beads濃度:1 mg/100 μ L) (NHS beadsの状態でも保存する場合はIPAに完全に置換後、-30 $^{\circ}$ Cで保存する。)
- 19) 1.5 mLマイクロチューブへNHS beadsを1 mgとる。
- 20) 遠心分離 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 21) メタノール 50 μ Lを添加し、NHS beadsを超音波にて分散させる。
- 22) 遠心分離 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 23) タンパク質固定化バッファー50 μ Lを添加しビーズを超音波にて分散させる。
- 24) 抗体またはタンパク質溶液50 μ Lを添加する。
- 25) 4 $^{\circ}$ C、30分、マイクロチューブミキサーにて反応させる。
- 26) 遠心分離 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min) を行い、上清を回収する。(タンパク質量)
- 27) マスキング溶液 250 μ Lを添加し、ビーズをガリガリ法にて分散させる。
- 28) 4 $^{\circ}$ 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。
- 29) 遠心分離 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
※チューブへのビーズの付着が生じた場合は遠心分離前にガリガリ法にてビーズを分散させる。
- 30) タンパク質固定化ビーズ洗浄・洗浄バッファー200 μ Lを添加し、ビーズを分散させる。
- 31) 遠心分離 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 32) 手順30)、31)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 33) タンパク質固定化ビーズ洗浄・洗浄バッファー200 μ Lに分散させ、4 $^{\circ}$ Cにて保存する。
(抗体またはタンパク質固定化ビーズ濃度 : 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)

実験プロトコール 101



- 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。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。
- ビーズの回収は、磁気分離ではなく、遠心分離にて行う。
- 抗体またはタンパク質固定化量は、回収した上清のタンパク質量（Bladford法またはSDS-PAGE）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。
- 抗体またはタンパク質の固定化量は、抗体またはタンパク質の仕込み量の増加や反応時間を長くすることで増加させることができる。
- 固定化の際は抗体またはタンパク質溶液の組成をタンパク質固定化バッファーの組成に近づける（バッファー置換など）ことで反応効率が向上する。
- EDC・HClは吸湿しやすいので水分のコンタミに注意する。
- DMFは脱水品を使用。水分が存在するとスクシンイミドが遊離してしまい、タンパク質がうまく固定化されないことがある。
- 水中ではNHS（スクシンイミド）の遊離が早いので4℃条件下、できるだけ迅速に作業を行う。
- 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除く。
- 抗体またはタンパク質固定化ビーズの分散性を上げる場合は保存バッファーの組成を10 mM HEPES (pH7.9)のみにする。

以上