

## NHS 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)

- ・ NHS beads (型式 : TAS8848N1141) 1 mg (イソプロピルアルコールに懸濁)  
 ※官能基量 : 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-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸 (HEPES)
- ・ モルホリノエタンスルホン酸 (MES)    ・ 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    ・ メタノール
- ・ アミノエタノール (分子量61.08)    ・ 塩酸    ・ Nonidet P-40 (NP-40)

#### タンパク質固定化バッファーの組成

- 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・保存バッファーの組成

- 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

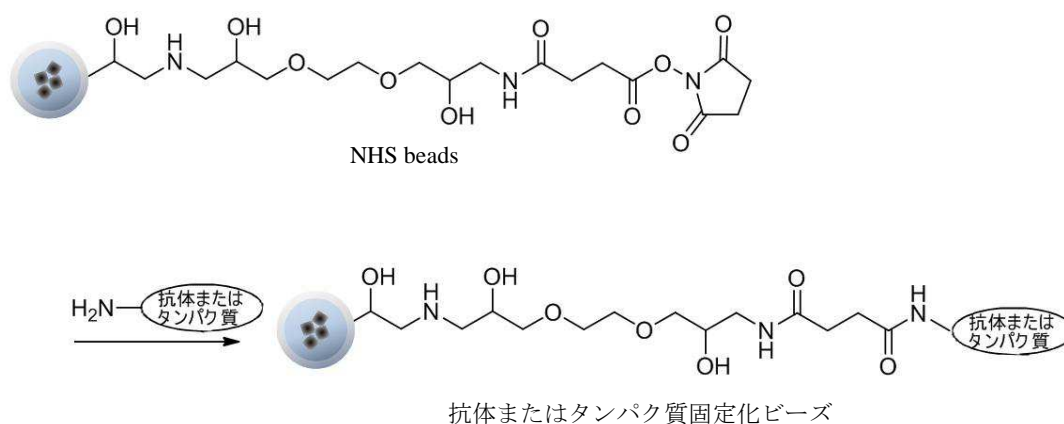
### 1.3 機器

- ・ 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。



## 実験プロトコール 105

### 2.2 手順

- 1) タンパク質固定化バッファー、タンパク質固定化ビーズ洗浄・保存バッファーを調製する。
- 2) 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 µg/50 µLの抗体またはタンパク質溶液を作製する。
- 3) 1.5 mLマイクロチューブへNHS beads (TAS8848N1141) 1 mg (50 µL) を分注する。
- 4) 遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 5) メタノール 50 µLを添加し、NHSビーズを分散させる。
- 6) 遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 7) タンパク質固定化バッファー50 µLを添加しビーズを分散させる。(超音波使用可)
- 8) 抗体またはタンパク質溶液50 µLを添加する。
- 9) マイクロチューブミキサーを使用し、4°Cで30分間反応させる。
- 10) 30分後、遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を回収する (タンパク質量)。
- 11) 残ったビーズへマスキング溶液 250 µLを添加し、ビーズをガリガリ法にて分散させる。
- 12) マイクロチューブミキサーを使用し、4°Cで 一晚 (16~20時間) 反応させる。  
(タンパク質未結合NHS基のマスキング)
- 13) 遠心分離 (15,000rpm, 4°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。
- 14) タンパク質固定化ビーズ洗浄・保存バッファー 200 µLを添加し、ビーズを分散させる。
- 15) 遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する
- 16) 手順14)~15)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 17) タンパク質固定化ビーズ洗浄・保存バッファー200 µLに分散させ、4°Cにて保存する。  
(タンパク質固定化ビーズ濃度 : 0.1mg/20 µL) (タンパク質量)

### 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。
- ・水中ではNHS (スクシンイミド) の遊離が早いので4°C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