

リンカービーズ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)

- ・リンカービーズ (TAS8848N1110) 1 mg (エポキシ基量: 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

タンパク質固定化バッファーの組成

10 mM HEPES-NaOH (pH7.9)

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

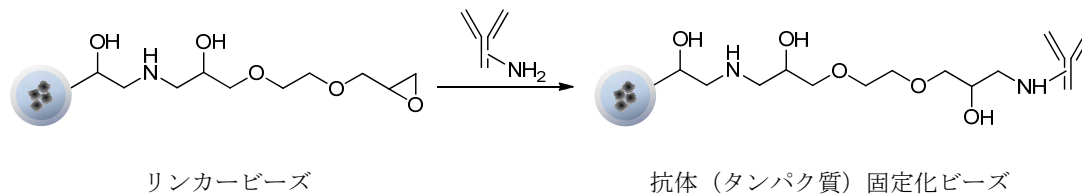
1.3 機器

- ・ 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TA4905N10など)
超音波洗浄器 (多摩川精機TA4905など)

2. 方法

2.1 概要

リガンド固定化の様式図を下記に示す。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の抗体溶液を50 µL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リンカービーズを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) タンパク質固定化バッファー50 µLを添加し、リンカー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) 工程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) 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)
- 12) タンパク質固定化ビーズ洗浄・保存バッファー500 µLを添加し、ビーズを分散させる。
- 13) 遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 14) 工程12)～13)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)

実験プロトコール 106

15) 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。

(抗体固定化ビーズ濃度：0.1 mg/20 μL)

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を増やしたい場合は抗体または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。
- ・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