

Streptavidin beads、NeutrAvidin beadsへのビオチン標識物固定化

1. 準備するもの

1.1 ビーズ、ビオチン標識物溶液

- Streptavidin beads (またはNeutrAvidin beads) 2.0 mg
(2.0 mgのうち1.0 mgはビオチン標識物を反応させないコントロール(-)ビーズとして用いる)
Streptavidin beads, HM-Streptavidin beads, FF Streptavidin beads, FS Streptavidin beads,
NeutrAvidin™ beads, HM-NeutrAvidin™ beads
- ※磁気を含まないビーズ (FS beads) を使用する場合は、遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 5 min) でビーズを回収する。
- ※FG beadsは5分以上、HM beadsは1分以上磁気分離を行う。
- 使用するビオチン標識物溶液 (化合物、抗体、タンパク質、DNA、RNA など)
 - 1) ビオチン標識化合物 : 4~12 mM
(容量はビーズ1 mgにつき10μL用意、PBSに溶解出来ない場合はDMSOに溶解する)
 - 2) ビオチン標識タンパク質または抗体 : 0.4 mg/mL (容量はビーズ1 mgにつき120μL用意)
 - 3) ビオチン標識DNAまたはRNA : 0.4 mg/mL (容量はビーズ1 mgにつき120μL用意)

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) • 塩化カリウム (KCl) • エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)
- グリセリン (グリセロール) • 塩化ナトリウム (NaCl) • リン酸水素二ナトリウム
- リン酸二水素カリウム • トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris)
- 塩酸 (HCl) • ジメチルスルホキシド (DMSO)

バッファー組成

- 1) ビオチン標識タンパク質または抗体、ビオチン標識化合物を結合させる際の結合バッファー
PBS(-)
- 2) ビオチン標識DNAまたはRNAを結合させる際の結合バッファー
5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl
- 3) 洗浄・保存バッファー
10mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 50mM KCl, 1mM EDTA, 10% glycerol

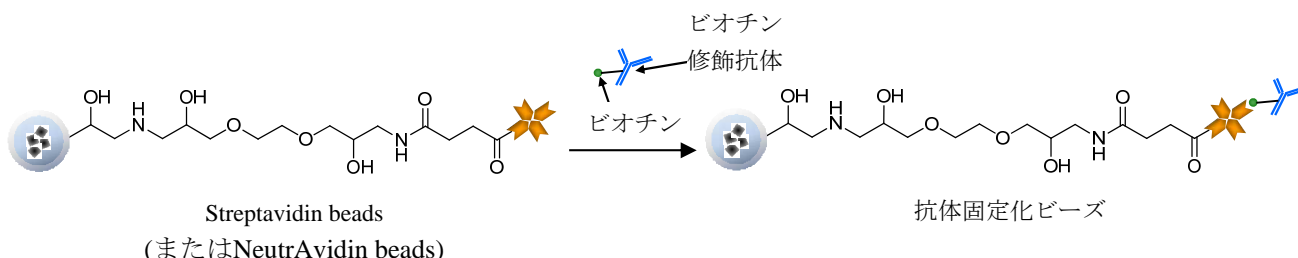
1.3 機器

- 卓上遠心分離機 (スピンドウン用) • マイクロチューブミキサー (TOMY社 MT-360、など)
- 磁石スタンド (当社TAB4899N12など) • 微量高速冷却遠心分離機

2. 方法

2.1 概要

リガンド固定化の模式図 (例：抗体) 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) 結合バッファーを氷上に置き冷却する。
- 2) ビオチン標識物を結合バッファーにて目的の濃度 (1-1参照) に調製する。
- 3) 1.5 mLマイクロチューブを2本用意し、Streptavidin beads (またはNeutrAvidin beads) 1 mg (50 μ L) をそれぞれに添加する (1本はビオチン標識物を添加しないコントロールビーズとする)。
- 4) 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) スピンドウン後、磁気分離を行い、上清を廃棄する。
- 6) 工程4)~5)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)
- 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結合バッファーを添加し、ガリガリ法にて分散させる。その後、各種ビオチン標識物を添加する。
添加する結合バッファーとビオチン標識物の量は以下の通り。
 - a) **ビオチン標識タンパク質とビオチン標識DNAの場合:**
100 μ Lの結合バッファー添加後にガリガリ法にてビーズを分散、そこへ100 μ Lのビオチン標識タンパク質溶液を添加し全量200 μ Lとする。
 - b) **ビオチン標識化合物の場合:**
195 μ Lの結合バッファーを添加後にガリガリ法にて分散、そこへ5 μ Lのビオチン標識化合物を添加し全量200 μ Lとする。
- 8) マイクロチューブミキサーで攪拌しながら4°Cで1時間結合反応を行う。
- 9) 1時間後、スピンドウンし、磁気分離を行い上清を回収する。(固定化量定量)
- 10) 洗浄・保存バッファーを500 μ L加え、ビーズをガリガリ法で分散させる。
- 11) スピンドウン後、磁気分離を行い、上清を廃棄する。
- 12) 工程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。
(ビオチン標識物固定化ビーズ濃度: 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)



- ・タンパク質または抗体固定化量は、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。
- ・DNA固定化量は、回収した上清の核酸定量により算出可能。
- ・固定化量を増やしたい場合は仕込み量を増加させる。

以上