

FF/FS beads : 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)

- ・ FF COOH beads (TAB8849N2140など) またはFS COOH beads (TAB5849N2140など) 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
- ・ モルホリノエタンスルホン酸 (MES) ・ N-ヒドロキシスクシンイミド (分子量115.09) (NHS)
- ・ 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)
- ・ アミノエタノール ・ 塩酸 ・ Nonidet P-40 (NP-40)

活性化バッファーの組成 25 mM MES-NaOH (pH6.0)

固定化バッファーの組成 25 mM 酢酸 (pH5.0)

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

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

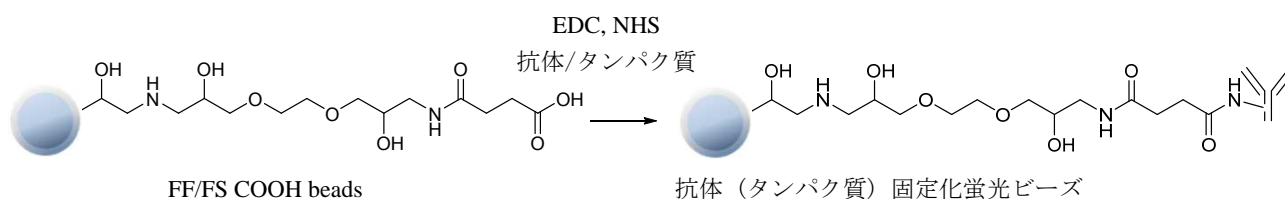
1.3 機器

- ・ 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) 各種バッファーを調製する。
- 2) 活性化バッファーにてEDCとNHSをそれぞれ 50 mg/mLに調製する。
- 3) 抗体またはタンパク質溶液を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。

実験プロトコール 502

- 4) 1.5 mLマイクロチューブへFF/FS COOH beadsを1 mg (100 μ L) とる。
- 5) 活性化バッファーを120 μ L添加し、超音波にて分散する。
- 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)を再度行う。
- 8) 氷上にて手順2)で調製したEDCおよびNHS溶液をそれぞれ60 μ L添加し、超音波にて分散する。
- 9) マイクロチューブミキサーにて攪拌しながら室温にて30分間反応させる。
- 10) 遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 11) 固定化バッファー200 μ Lを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 12) 遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 13) 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。
- 14) 手順3) で調製した抗体またはタンパク質溶液50 μ Lを添加し、ガリガリ法にて分散させる。
- 15) マイクロチューブミキサーにて4°Cで2時間反応させる。
- 16) 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)
- 17) マスキング溶液240 μ Lを加え、ガリガリ法にて分散させる。
- 18) マイクロチューブミキサーにて4°Cで一晩反応させる。
- 19) 翌日、遠心分離 (15,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 20) タンパク質固定化ビーズ洗浄・保存バッファー200 μ Lにて3回洗浄する。
- 21) タンパク質固定化ビーズ洗浄・保存バッファー 100 μ L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)

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