

## 簡易プロトコル紹介： Dynabeads™ Protein A / Protein G を用いた免疫沈降（直接法）

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

### \* ご案内 \*

このプロトコルは、一般的な免疫沈降に対するものです。  
各々の抗体とターゲットのために最適化が必要とされるかもしれません。  
ここでは例として Dynabeads Protein A / G を 50 µL 用います。  
これは必要に応じてスケールアップあるいはダウンが可能です。

### 用意する Buffer 類

- Cell lysis buffer 例) Cell Extraction Buffer、NP40 Cell Lysis Buffer
- PBS, pH7.4 with 0.02% Tween 20
- PBS, pH7.4 (Washing Buffer)
- 50 mM Glycine, pH 2.8 (Elution Buffer : 非変性)
- NuPAGE™ LDS Sample Buffer and NuPAGE Sample Reducing Agent (Elution Buffer : 変性)

### サンプル調製

細胞溶解には、用いるサンプルに適したものをお使いください。

推奨品：

- Cell Extraction Buffer (Thermo Fisher Scientific: #FNN0011)
- NP40 Cell Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific: #FNN0021)

### Dynabeads Protein A / G の準備

- 1) ピペッティングまたは、ローラーにて回転させ (5 分)、完全に Dynabeads Protein A / G (以下、Dynabeads) を再懸濁する
- 2) チューブへ Dynabeads 50 µL を移し、磁石 (DynaMag) に取り付け、上清を除去する
- 3) 磁石からチューブを外し、抗体結合ステップへ進む

### 抗体の結合

- 4) 使用する抗体 (通常 1 - 10 µg) を Tween 20 を含む PBS 200 µL で希釈し、3.のチューブへ加える (最適量は使用する各々の抗体に依存する)
- 5) 室温、回転下で 10 分間インキュベートする
- 6) チューブを磁石に取り付け、上清を除去する
- 7) チューブを磁石から外し、Tween 20 を含む PBS 200 µL に再懸濁させ、優しくピペッティングすることで Dynabeads - 抗体複合体を洗浄する
- 8) 免疫沈降ステップへ進む

## クロスリンク

抗体の溶出を避けたい場合には、Dynabeads と抗体をクロスリンクすることをご検討ください。

[http://www.veritastk.co.jp/attached/3560/Immunoprecipitation\\_Crosslinking.pdf](http://www.veritastk.co.jp/attached/3560/Immunoprecipitation_Crosslinking.pdf)

## 抗原の免疫沈降

- 9) チューブを磁石に取り付け、上清を除去する
- 10) Dynabeads - 抗体複合体に抗原を含むサンプル（通常 100 - 1000  $\mu$ L）を加え、ピペッティングにより静かに再懸濁する
- 11) 室温、回転下で 10 分間インキュベートする  
Note: インキュベーション時間は、標的タンパク質の濃度及び、抗体の濃度が高い時、短いインキュベーション時間で（10 分）、十分にターゲットが捕捉可能です。必要に応じて、インキュベーションは 1 時間まで延長できます
- 12) チューブを磁石に取り付け、上清を除去する。必要であれば、上清は新しいチューブへを移しておく
- 13) 200  $\mu$ L の PBS で 3 回 Dynabeads - 抗体抗原複合体を洗浄する
- 14) 100  $\mu$ L の PBS で Dynabeads - 抗体抗原複合体を再懸濁し、チューブの壁面についたタンパク質のコンタミを防ぐため、新しいチューブへ Dynabeads - 抗体抗原複合体を含む懸濁液を移す
- 15) 「標的抗原の溶出」ステップへ進む

## 標的抗原の溶出

（A: 変性、B: 非変性 いずれかの条件で溶出が可能）

### **A: 変性溶出**

- 16) 磁石にチューブを取り付け、上清を除去する
- 17) 20  $\mu$ L の NuPAGE LDS Sample Buffer / NuPAGE Reducing Agent mix（いずれも Thermo Fisher Scientific）を加え、優しくピペッティングで Dynabeads - 抗体抗原複合体を再懸濁した後、70°C で 10 分間インキュベートする  
Note: SDS サンプルバッファー等、他のバッファーを用いることも可能です。ゲルにロードする前に、用いるバッファーの推奨する温度、時間でインキュベーションしてください
- 18) チューブを磁石に取り付け、上清 / サンプルをゲルにロードする

### **B: 非変性溶出**

- 19) （ステップ 15 より）磁石にチューブを取り付け、上清を除去する
- 20) 20  $\mu$ L の Elution Buffer（50 mM Glycine pH 2.8）を加え、優しくピペッティングで Dynabeads - 抗体抗原複合体を再懸濁した Dynabeads - 抗原抗体複合体を静かに再懸濁する。この時、泡立たないように注意する
- 21) 室温で 2 分間インキュベートする
- 22) チューブを磁石に取り付け、新しいチューブへ目的物を含む上清を移す。  
もし得られたタンパクを機能的な分析に用いる、あるいは保存する必要がある場合は、溶出液の pH を 1 mM Tris-HCl, pH7.5 を用いて調整する

## 製品リスト

### Dynabeads Protein A / G 試薬

商品コード	商品名	梱包単位
DB10001	Dynabeads Protein A	1 mL
DB10002	Dynabeads Protein A	5 mL
DB10003	Dynabeads Protein G	1 mL
DB10004	Dynabeads Protein G	5 mL
DB10006	Dynabeads Protein A Immunoprecipitation Kit	2 mL
DB10007	Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kit	2 mL
DB10008	Dynabeads Protein A	50 mL
DB10009	Dynabeads Protein G	50 mL

### Dynabeads 専用磁石 (DynaMag)

商品コード	商品名	説明	梱包単位
DB12320	DynaMag SPIN	1.5 mL チューブ 6 本立て	1 個
DB12321	DynaMag-2	1.5 mL または 2.0 mL チューブ 16 本立て	1 個

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町 1-10-14 住友東新橋ビル 3 号館 5 階

TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076

技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail [techservice@veritastk.co.jp](mailto:techservice@veritastk.co.jp)