

Immunoprecipitation Crosslinking

免疫沈降後の抗体 Heavy chains と Light chains の共溶出が、下流の解析を邪魔する場合ビーズに固相化した抗体をビーズにクロスリンクすることでこれらの問題を解決することが可能です。

以下のプロトコルは 50 μ l の **Dynabeads® Protein A** , **Dynabeads® Protein G**, **IP Kit Protein A** , **IP Kit Protein G** に 5 μ g の IgG をクロスリンクするためのものです。cross-linker の BS³ は水溶性の crosslinker で生理的 pH において非可逆的なクロスリンク(アミド結合)を形成します。また、以下のプロトコルは必要に応じてスケールアップやスケールダウンが可能です。

Dynabeads Protein A / G に固相化した IgG のクロスリンクプロトコル

1. 100 mM BS³ を Conjugation Buffer で調製する(Stock Solution)。5 mM 溶液 になるように Conjugation Buffer で希釈する。1 サンプルあたり 250 μ l の溶液が必要。

Note: BS³ Stock and Conjugation solutions は使用の直前に調製ください

2. Ig コートした Dynabeads Protein A / G を 200 μ l の Conjugation Buffer で 2 回洗浄する。磁石にセットし上清を除去する
3. Dynabeads を 250 μ l の 5 mM BS³ で再懸濁する
4. ミキサーでローテーションしながら室温で 30 分間インキュベーションする。
5. 12.5 μ l の Quenching Buffer を添加してクロスリンク反応を停止させる
6. ミキサーでローテーションしながら室温で 15 分間インキュベーションする。
7. クロスリンクした Dynabeads を 200 μ l PBST (もしくはご自身で用意した IP 用の buffer)で 3 回洗浄する。磁石にセットし上清を除去する
8. IP を行う。

BS³ Conjugation Buffer: 20 mM Sodium Phosphate, 0.15M NaCl (pH 7-9)

BS³ Quenching Buffer: 1M Tris HCl (pH 7.5)

Cross-linking reagent: Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS₃),. Cat. # 21580 from Thermo Fisher Scientific Inc.

クロスリンクの注意点

- クロスリンクの効率は、100%ではありません。架橋されなかった抗体によるコンタミネーションを防ぐため、酸性pHバッファーを使った溶出のステップを使用の前に入れる必要があるかもしれません。
- 架橋後であってもSDS-PAGE中のDTTまたは、 β -メルカプトエタノールのような還元剤の使用によって、抗体のジスルフィド結合が還元され、溶出の際に軽鎖が遊離することがあります
- 抗体中のいくつかの結合サイトが架橋されることもあります。もし架橋後アフィニティーの欠損が認められる場合は、架橋を避けてください。代替法としてビーズに抗体を共有結合可能な表面活性化Dynabeadsが利用可能です。