

クイックガイド： Dynabeads® Protein A / G を使った免疫沈降

注：簡易マニュアルのため、詳細は製品に添付されている英文マニュアルでご確認ください。

操作方法（直接法）

■ 抗体の結合

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® を再懸濁する。
2. チューブへ Dynabeads® 50 μ L を移し、磁石に取り付け、上清を除去する。
3. 磁石からチューブを外し、選択した抗体を含む 200 μ L の Binding & Washing Buffer に Dynabeads® を再懸濁する。
（通常 1-10 μ g：最適量は使用する各々の抗体に依存する。）
4. 室温、回転下で 10 分間インキュベートする。
5. チューブを磁石に取り付け、上清を除去する。
6. チューブを磁石から外し、200 μ L の Binding & Washing Buffer にて再懸濁させ、Dynabeads®- 抗体複合体を洗浄する。

■ 抗原の免疫沈降

7. チューブを磁石に取り付け、上清を除去する。
8. Dynabeads®- 抗体複合体に抗原を含むサンプル（通常 100-1000 μ L）を加え、ピペッティングにより静かに再懸濁する。
9. 室温、回転下で 10 分間インキュベートする。
10. チューブを磁石に取り付け、新しいチューブへ上清を移す。
11. 200 μ L の Washing Buffer を加え、Dynabeads®- 抗体抗原複合体を穏やかに混合する。
このステップを 3 回繰り返す。
12. 100 μ L の Washing Buffer で Dynabeads®- 抗体抗原複合体を再懸濁し、新しいチューブへ Beads を含む懸濁液を移す。磁石にチューブを取り付け、上清を除去する。

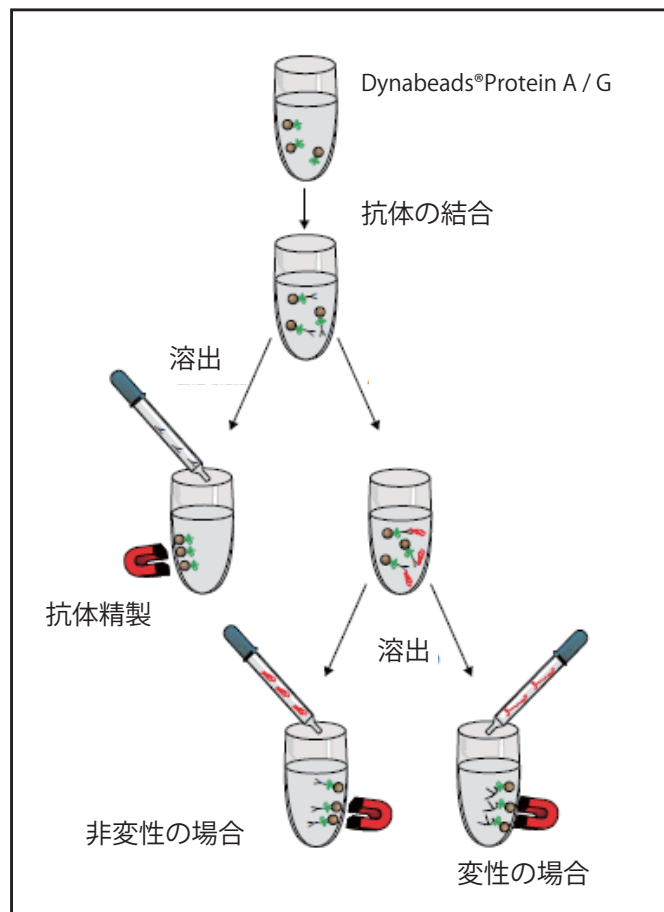
■ 抗原抗体複合体の溶出

（A、B いずれかの条件で溶出が可能 A: 変性、B: 非変性）

- A. 20 μ L の Elution Buffer に Dynabeads®- 抗原抗体複合体を静かに再懸濁する。10 μ L の NuPAGE® LDS Sample Buffer / NuPAGE® Reducing Agent mix を加え、70°C で 10 分間インキュベートする。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。

代替法：Dynabeads®- 抗原抗体複合体はお客様の標準プロトコルに従い、SDS sample buffer で再懸濁、加熱することで溶出することも可能です。

- B. 20 μ L の Elution Buffer で Dynabeads®- 抗原抗体複合体を静かに再懸濁する。室温で 2 分間インキュベートする。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。



Dynabeads®による免疫沈降トラブルシューティング

1. Dynabeads®での免疫沈降でターゲットタンパク質が回収できない。

- お持ちの抗体とターゲットタンパク質の結合特異性を ELISA などで確認して下さい。抗体とビーズの結合特性は、Table.1 を参考下さい。抗体がビーズに結合しない場合、免疫沈降は行えません。
- 間接法で免疫沈降を行っていた場合は、直接法で免疫沈降を試して下さい。反対に、直接法を行っていた場合は、間接法を試して下さい。

【免疫沈降における直接法と間接法】

直接法

- 標的タンパク質が豊富な時に選ばれる方法
- あらかじめ抗体結合ビーズのストックを用意できる
- 必要とする一次抗体が少なく済む

予め一次抗体は、製品のプロトコールに従って、Dynabeads®Protein A/G に結合させます。ビーズとサンプルは、室温もしくは 2-8°C で混ぜながら転倒・回転してインキュベートします。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。

間接法

- 標的への抗体のアフィニティーが弱い時や標的タンパク質が少ない時に選ばれる方法
- サンプルと Dynabeads® とのインキュベーションを最小限にすることが可能で、非特異結合を少なくすることができる

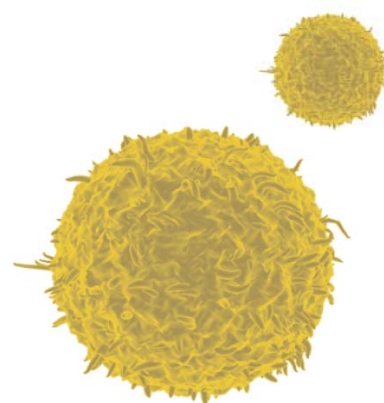
まず、抗原抗体複合体を形成するために、一次抗体と細胞可溶化液をインキュベートします。その複合体は、サンプルに Dynabeads® Protein A/G を添加することでキャプチャーし、続いて磁気分離により回収します。（注意点は、過剰の抗体の使用を避けることです。フリーな抗体は、抗原抗体複合体より早くビーズに結合します。そのため、ビーズ上の結合部位がフリーの抗体で満たされ、タンパク質の収量が減少する恐れがあります。）

最適濃度を決定するために、一次抗体を滴定します。ビーズの結合能に基づいて、一次抗体のキャプチャーに必要なビーズ量を計算します。迅速な反応速度及び、最適なタンパク質回収を実現するためにインキュベーションの間はサンプルの濃度を維持します。添加するビーズ量は、サンプル量の 1/10 未満にならないようにします。

- ビーズ量及びサンプル量を確認して下さい。ビーズごとに結合容量が異なるので、それに応じて、ビーズの量や抗体の濃度を調整して下さい。
- インキュベーション時間が適切でない可能性がありますので、至適条件を検討下さい。
- 別の抗体を検討下さい。

Table.1 異なるイムノグロブリン (Ig) に対する結合特性
S: 強い結合 ; M: 中位の結合 ; W: 弱い結合 ; N: 結合しない。

Species	Ig class	Protein A	Protein G
Human	Total Ig	S	S
	IgG1, IgG2, IgG4	S	S
	IgG3	W	S
	IgD	N	N
	IgA, IgM	W	N
	Fab	W	W
Mouse	ScFv	W	N
	Total Ig	S	S
	IgG1	W	M
	IgG2a, IgG2b, IgG3	S	S
	IgM	N	N
	IgG1	W	M
Rat	Total Ig	W	M
	IgG1	W	M
	IgG2a	N	S
	IgG2b	N	W
Goat	IgG2c	S	S
	Total Ig	W	S
	IgG1	W	S
Sheep	IgG2	S	S
	Total Ig	W	S
	IgG1	W	S
Cow	IgG2	S	S
	Total Ig	W	S
	IgG1	W	S
Horse	IgG2	S	S
	Total Ig	W	S
	IgG(ab)	W	N
	IgG(c)	W	N
Rabbit	IgG(T)	N	S
	Total Ig	S	S
Dog	Total Ig	S	W
Cat	Total Ig	S	W
Pig	Total Ig	S	W
Guinea pig	Total Ig	S	W
Chicken	Total Ig	N	N



2. 今まで Dynabeads® を使ってタンパク質の免疫沈降ができていたが、抗体をビーズに架橋させた後、タンパク質のバンドがゲル上で全く確認できなくなった。

- ・ 架橋することにより抗体の特異性が変わることがありますので、抗体とビーズを架橋させないで免疫沈降を試してください。
- ・ 異なる架橋方法を試して下さい。
- ・ 抗体と直接共有結合可能な表面活性化ビーズを試して下さい。
Dynabeads® Antibody Coupling kit (コード No. : DB14311)

3. 抗体を Dynabeads® に架橋させたが、溶出の際に抗体がビーズから離れてしまう。

- ・ 架橋は 100% でないため、架橋されなかった抗体が溶出してしまふことがあります。架橋を行った後は、低い pH のバッファーで洗浄を行い、架橋されていない抗体を取り除いてください。洗浄後、通常の pH に戻して使用してください。

4. 免疫沈降のステップの前に架橋されていない抗体を除去したが、ビーズから解離したと思われる抗体のバンドがゲル上で確認された。

- ・ 還元剤入りのサンプルバッファーとビーズのインキュベーションは避けて下さい。DTT や β メルカプトエタノール等の還元剤によりジスルフィド結合が還元されてしまい、結果として抗体の軽鎖、重鎖が溶出されてしまいます。
- ・ pH を下げて溶出すると、抗体の解離を防げることがあります。
- ・ 抗体と直接共有結合可能な表面活性化ビーズを試してください。

5. 免疫沈降の実験で、非特異結合が起こってしまう。

- ・ 洗浄が適切でない可能性があるため、洗浄の条件を厳しくしてください。
- ・ ノニオン系界面活性剤 (Tween-20、Triton X-100) を、0.01-0.1% の濃度でバッファーに加えてください。
- ・ ビーズを免疫沈降前にブロッキングした場合、洗浄バッファーに同一のブロッキング剤を加えてください。
- ・ 洗浄回数を増やしてください。
- ・ 洗浄時間を延長してください。
- ・ ビーズとサンプルのインキュベーションの時間を減らしてください。
- ・ 間接法で免疫沈降法を試してください。
- ・ 抗体の濃度を下げてください。
- ・ プレクリアの操作を行うと Protein A/G またはビーズへの非特異結合を除去できることがあります。

6. Dynabeads® Protein A/G は BSA であらかじめブロッキングされているのか。

- ・ いいえ。Dynabeads® は Protein A または Protein G と結合しており、BSA でブロッキングされておりません。

7. どうすれば Dynabeads® ProteinA/G を BSA でブロッキングできるか。

- ・ いいえ。通常、BSA によるブロッキングは疎水性表面で最も効率がよく、適切な位置に BSA を吸着することができますが、Dynabeads® Protein A/G はビーズ表面が親水性であるために、BSA のブロッキングは効率よく行えません。代わりに、Tween-20 を洗浄バッファーに加え (濃度 0.01-0.1%)、より強い洗浄を行うことで非特異結合を減らすことができます。
- ・ **Dynabeads® Streptavidin と連結したビオチン標識抗体で免疫沈降を行っているが、抗体をビーズから解離させずに目的のタンパク質を溶出させるにはどうしたらよいのか。**
- ・ 塩濃度を上げる、pH を下げるなど、マイルドな溶出条件を用いてください。
(SDS バッファーで 95°C、5 分間ビーズをインキュベーションしても、抗体は溶出されます)

9. 免疫沈降に二次抗体ビーズを使うことができるか。

- ・できます。弊社では以下の免疫沈降用の二次抗体結合ビーズ (粒径 $2.8\ \mu\text{m}$) を提供しております。Dynabeads® Sheep anti-Mouse(コード No.: DB11201/ DB11202): 一次抗体がマウス由来の場合
Dynabeads® Sheep anti-Rabbit(コード No.: DB11203/ DB11204): 一次抗体がウサギ由来の場合

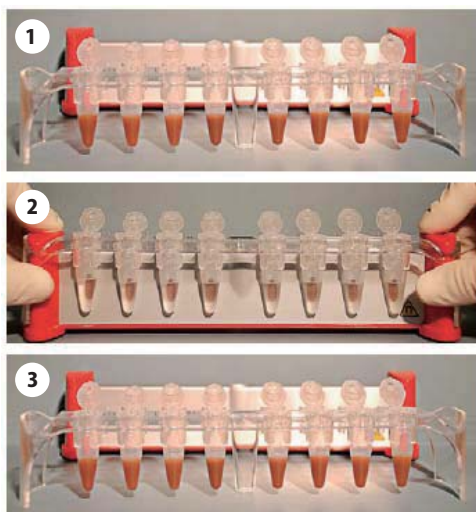
10. 免疫沈降に粒径 $4.5\ \mu\text{m}$ の Dynabeads® を使うことができるか。

- ・できます。一次抗体がラット由来の場合、Dynabeads® Sheep anti-Ra(コード No.: DB11035)を試してください。ただし、より粒径の小さいビーズを使った方が、重量あたりの表面積が大きいため、より多くの高いタンパク質の回収量が期待できます。

11. ネガティブコントロールとして、抗体でコーティングされていない Dynabeads® ProtainG を自分のサンプルと共にインキュベートしたが、ビーズとの非特異結合が確認された。

- ・未処理の Dynabeads® Protain G (または Dynabeads® Protain A) をネガティブコントロールとして使用することは、適切ではありません。サンプル中の様々な分子が Protein G やビーズ表面と相互作用 (疎水性相互作用、電荷等) を通じて結合することがあります。ネガティブコントロールとしては、無関係な IgG を固定した Dynabeads® Protain G を用いてください。

磁石の取り扱い注意事項



DynaMag-2 (コード No.: DB12321)

1. 取り外し可能な透明プラスチックラックは、磁石に固定した状態でも離れた状態でも使用可能。
2. ピペッティング操作時には、転倒するのを防ぐ為に片手でラック / 磁石を持つことを推奨。磁石から透明プラスチックラックを外す為には両手を使う。
左図のように両端からラックを掴み、赤いタブ上に指を置き、押し込みながら持ち上げる。
3. 混和は、磁石からラックを外して行う。チューブはラックに固定されているため、簡単に混和することができる。



株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目18-16 住友浜松町ビル6階

技術的なお問い合わせは:  TEL 03-5776-0040  E-mail Tech_support@veritastk.co.jp