

## 実験にベリタス取扱製品を使用 研究者の声【20】

熊本大学 石黒啓一郎 独立准教授

### プロトコール紹介

#### 【Protein A (または G) Dynabeads と抗体の conjugation】

##### Prepare IgG- Dynabeads complex

1. Take 100  $\mu$ l Dynabeads Protein A (or G, depending on species IgG isotypes) to 10  $\mu$ g IgG.
2. Place the tube on the magnet and discard the supernatant. Wash Dynabeads with PBS-Tween-20 (0.01% Tween-20 can be added to the buffer to prevent aggregation of the Dynabeads Protein A - Ig complex.)
3. Resuspend Dynabeads Protein A with 100  $\mu$ l PBS-Tween20
4. Add antibody (10  $\mu$ g IgG) to Dynabeads Protein A
5. Rotate at 4C more than 1hr
6. Place the tube on the magnet and Remove unbound solution and Wash with PBS-Tween20 twice.

##### Crosslinking by DMP

1. Place the tube on the magnet and remove sup.
2. Add 1 ml 0.2M Na-borate (Borax)/boric acid pH9.0 to the Dynabeads - IgG complex. Wash twice with 0.2M Na-borate (Borax)/boric acid pH9.0.

##### Prepare A and B

A: 0.2M boric acid solution (12.4g in 1000mL)

B: 0.2M sodium borate solution (19.05 g in 1000mL) = 0.05M sodium tetraborate (Borax)

To make 0.2M sodium borate (pH9.0) buffer, Mix 50mL of A and 59mL of B

生化学実験でホウ酸緩衝液を調整する機会は少ないと思いますが、A 溶液と B 溶液とを決められた比で混合すると一定のpH になります。

\*0.2M sodium borate(pH9.0) buffer の代わりに 0.2 M triethanolamine/PBS (3.04 ml triethanolamine per 100 ml buffer) でも可です。

3. Resuspend the Dynabeads - IgG complex in 1 ml of 0.2M sodium borate (pH9.0) containing 20 mM DMP (dimethyl pimelimidate dihydro-chloride, Sigma) .  
5.4mg DMP powder is dissolved in 1 ml of 0.2M sodium borate (pH9.0) buffer.  
This solution must be prepared immediately before adding to the Dynabeads - IgG complex.

RDBM-20-0885

(20.03.17)

\*DMP は使用前に測りとりチューブに入れます。所定量を正確には測るのは難しいのでだいたいの量を取ったら、必要な量を計算して 0.2M sodium borate (pH9.0) buffer で溶かします。DMP 粉末は即座に溶けます。

DMP は粉末状で-30° C で保存します。一度開封した DMP 粉末は吸湿性が高く長期保存のものは劣化するのを経験したことがあります。

4. Incubate with rotator for 30 minutes at 20° C.
5. Place the tube on the magnet and discard the supernatant.
6. Remove the tube from the magnet and stop the reaction by resuspending the Dynabeads - Ig complex in 1 ml of 50 mM Tris pH 7.5/PBS, and incubate for 15 minutes with rotator. This is for quenching of unreacted DMP.

\*50 mM Tris pH 7.5/PBS のかわりに、50 mM ethanolamine in PBS (311.7 ul per 100 ml) でも quenching に使えます。

DMP 反応後は Dynabeads がやや固く aggregate しているようなピペット感覚がありますが気にしない。

\*DMP 反応の前と後の一定量のビーズ(結合している抗体 1 μg 相当)を分取しておく。ビーズを SDS-PAGE 用の sample 処理 buffer に懸濁後 boil して、crosslink がうまく行ったかどうかを電気泳動で確認します。

7. Wash the beads twice with 1 ml of 100mM Glycine (pH 2.5) + 150mM NaCl to remove uncoupled IgG on the beads. Soon after washing, neutralize the beads by adding 1 ml of 0.1M Tris-Cl(pH8.0).
8. Place the tube on the magnet and discard the supernatant.
9. Wash the crosslinked Dynabeads - IgG complex 2 times with 1 ml PBS-Tween20.
10. Resuspend the Dynabeads - IgG complex in 100 μl PBS-Tween20. add 0.1% sodium azide. for store at 4C.

抗体の種類によっては DMP 架橋した後で spec が下がるものもあります。これは IgG のエピトープ認識に影響を与えることによります。

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 5F

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 Tech\_support@veritastk.co.jp

RDBM-20-0885

(20.03.17)