

Therma-Max[®] Streptavidin 取扱説明書

(製品コード：TMSA-002、TMSA-010、TMSA-100)

Therma-Max[®] Streptavidin (以下、TM-SA)は、平均粒径約 100 nm の熱応答性磁性ナノ粒子です。この磁性ナノ粒子は液温が 25°C未満では均一に水溶液中に分散しています。この状態での磁気分離は容易ではありませんが、液温 25°C以上になると磁性ナノ粒子が凝集塊を形成し、磁気分離が可能になります。この TM-SA の最適な磁気分離温度は 37°C以上になります。更に、この磁性ナノ粒子はストレプトアビジンを固相化しているため、ビオチン標識したタンパク質など（例えばビオチン標識抗体）を結合させて使用できるようデザインされています。TM-SA はタンパク質分離や診断薬の固相担体などに最適です。以下に TM-SA でタンパク質を分離するための使用方法を簡単に紹介します。

本試薬の組成

TM-SA：粒子濃度 2 mg/mL、PBS に分散しています。

実験手順（タンパク質分離例）

抗 His タグ抗体結合 TM-SA の調製

- ① TM-SA 100 μ L を入れたマイクロチューブにビオチン標識抗 His タグ抗体溶液（1mg/mL）10 μ L を添加する
- ② 速やかに混合し、氷上で 15 分以上インキュベートする
- ③ 37°Cの水浴中^(a)で 30 秒以上加温する^(b)
- ④ マイクロチューブを磁気スタンド^(c)に装着し、37°C水浴中で磁気分離する^(d)
- ⑤ マイクロチューブを磁気スタンドに装着したまま、凝集塊を吸い込まないように上清を除去し、マイクロチューブを磁石から取り外す
- ⑥ 冷(4°C前後)PBS^(e) 200 μ L を加えて分散させる^(f)
- ⑦ 前述③～⑥の操作を行う
- ⑧ 前述③～⑤の操作を行い、冷 PBS 100 μ L で分散させる

抗 His タグ抗体結合 TM-SA による 6 His-tagged GST の回収

- ⑨ ⑧で調製した抗 His タグ抗体結合 TM-SA 100 μ L に 6 His-tagged GST 溶液（1 mg/mL）5 μ L を添加する
- ⑩ ②～⑥の操作を行う
- ⑪ 前述③～⑥の操作を行う
- ⑫ 前述③～⑤の操作を行い、新しい冷 PBS 50 μ L で分散させる

標的抗原の溶出（SDS-PAGE）

- ⑬ 前述⑫で調製した TM-SA 15 μ L をマイクロチューブに分取する
- ⑭ 2×SDS サンプルバッファ（DTT 又は 2-メルカプトエタノールを含む）15 μ L を添加後、速やかに

混合し、95°Cで2~3分間加熱する

⑮ 適当量 (10-30 μ L) ^(g)を電気泳動用ゲルにロードし、目的タンパク質を検出する

Note :

- (a) 水浴の温度は、実験前に調整して下さい。この温度は最適磁気分離温度です。
- (b) 凝集塊の形成を確認後、次のステップに進んでください。容器を穏やかにタッピングすることにより、凝集塊が形成されやすくなります。この時凝集塊が飛散しないように注意してください。
- (c) ネオジウム磁石の使用を推奨します。市販の磁気スタンドで利用可能です (Thermo Fisher Scientific 社製 DynaMag™-2 Magnet、タカラバイオ社製 Magnetic Stand など)。
- (d) 添加したタンパク質の量の違いにより分離時間が多少異なります。よりよく磁気分離を行うためには、磁気分離時間1分以上を推奨します。
- (e) 最終濃度 0.01~0.05 %の Tween20 を含む PBS を洗浄溶液として使用することも可能です。TM-SA はブロッキング処理を行っておりませんので必要な場合はブロッキング処理を行ってください。
- (f) 分散後にチューブ内壁面に TM-SA が付着している場合は数秒間低速で遠心分離を行ってください。
- (g) 若干の磁性ナノ粒子が電気泳動用ゲル中に混入しますが SDS-PAGE に影響はありません。

保存に関する注意 :

未使用時には、試薬を凍結させないように 4°Cで保存して下さい。

ご案内 :

ここでは一般的なタンパク質分離に対する実施例を紹介しました。

各々の抗体と標的タンパク質の濃度など最適化が必要となります。

TM-SA を 100 μ L を用いた例を示しましたが、必要に応じてスケールアップ/ダウンが可能です。

株式会社 SEG NOS (セグノス)
〒260-0856 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-15
千葉大亥鼻イノベーションプラザ 308 号室
Tel : 080-4797-1027

Therma-Max® Streptavidin 取扱説明書

(製品コード：TMSA-002、TMSA-010、TMSA-100)

(添加剤 (硫酸ナトリウム) による凝集方法)

Therma-Max® Streptavidin (以下、TM-SA) は、平均粒径約 100 nm の磁性粒子を含む水溶液です。本試薬は、液温が 25 °C 未満では磁性粒子が完全に液中に分散しています。この状態での磁気分離は容易ではありませんが、硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム等の塩を添加することにより、磁性粒子が凝集塊を形成し、磁気回収が可能になります。更に、この粒子はストレプトアビジンを固相化しているため、ビオチン化したタンパク質など (例えばビオチン化抗 IgG 抗体) を結合させて使用できるようデザインされています。TM-SA はタンパク質分離用担体や診断薬固相担体などに最適です。以下に TM-SA でタンパク質を分離するための一般的な使用方法を簡単に説明します。

【本試薬の組成】

TM-SA : 2 mL (2 mg/mL)、PBS に分散してあります。

【実験前準備】

インキュベーターや水浴の温度を 10 °C に設定してください。

本試薬及び PBS は 2 - 8 °C で保存して下さい。塩溶液は室温で保存して下さい。

下記では、塩溶液として 1 M 硫酸ナトリウムを使用しております※ (k)。

【実験手順】

1. ビオチン化抗体結合 TM-SA の調製 ※ (a)

- ① TM-SA 溶液 100 μ L を入れたマイクロチューブに 10 μ L のビオチン化抗 IgG 抗体 (1 mg/mL) を添加します。
- ② 速やかにピペットで溶液を混合した後、15 分以上 10 °C で静置します。
- ③ 10 °C に保温したまま TM-SA の入ったマイクロチューブに 1 M 硫酸ナトリウムを 30 μ L 添加し、TM-SA を凝集させます。※ (b)
- ④ チューブを専用磁石※ (c) に装着し、60 秒程度置き、磁気回収します。※ (d)
- ⑤ チューブを磁石に装着したまま、凝集塊を吸い込まないように上清をピペットで除去し、チューブを磁石から外します。その後、PBS バッファー※ (e) 100 μ L を加え、ピペットで混合します。
- ⑥ 前述③④⑤の操作を 2 回繰り返し、未反応のビオチン化抗体を除去します。最後に PBS を 100 μ L を加え、ピペットで混合します。ここまでの操作で、ビオチン化抗体が結合した TM-SA 溶液の調製が完了します。

2. 一次抗体結合 TM-SA の調製 ※ (f)

- ⑦ 10 °C で TM-SA 溶液 100 μ L を入れたマイクロチューブに 10 μ L のビオチン化二次抗体 (1 mg/mL) を添加します。

- ⑧ 前述②～⑦の順で同様の操作を行った後、100 μ L の二次抗体を結合した TM-SA に 10 μ L の一次抗体 (2 mg/mL) を加えます。
- ⑨ ピペットで混合した後、15 分以上 10°C で静置します。
- ⑩ 前述③～⑥と同様の操作を行い、未反応の一次抗体を除去します。ここまでの操作で、一次抗体が結合した TM-SA 溶液の調製が完了します。

3. 目的タンパク質の分離例 ※ (g)

市販のビオチン化プロテイン A を前述①～⑥の操作手順に従い TM-SA に結合させ、ウサギ血清から IgG 分離を行ったものです。

- ⑪ 市販のビオチン化プロテイン A を前述①～⑥の操作手順に従い TM-SA に結合させ、ウサギ血清から IgG 分離を行ったものです。
- ⑫ ウサギ血清サンプル 100 μ L に、10–40 μ L のプロテイン A 結合 TM-SA を加えます。
- ⑬ 速やかに、ピペットで溶液を混合した後、氷上で 10～30 分間静置します (時々マイクロチューブを軽く叩きながら攪拌すると効率的です)。
- ⑭ 前述③④⑤と同様の操作を 3 回繰り返す、非特異的結合を除去します※ (h)。
目的物を回収した TM-SA を分析に用います※ (i)。

4. SDS-PAGE の例

ウサギ IgG の回収能を SDS-PAGE 法で観察した例です。前述⑬の TM-SA を新たなマイクロチューブに 15 μ L 分注し、その中に直接適当量 (10-50 μ L) の 2×SDS サンプルバッファー (DTT 又は 2-メルカプトエタノールを含む) を添加、速やかにピペットで混合し、室温で 10 分間静置後、95°C で 2-3 分間加熱し、タンパク質を熱変性させます。その後、マイクロチューブを専用磁石に置き 30 分以上静置します。その後、適当量の上清 (10-30 μ L) ※ (j) を電気泳動用ゲルに載せ泳動し、目的タンパク質の検出を行います。

(注) ※

- (a) ビオチン化タンパク質も使用可能です (例えば、市販のビオチン化プロテイン A やレクチンなど)。
- (b) 凝集塊の形成を確認後、次のステップに進んでください。サンプルの液量により、凝集に要する時間は異なりますのでご注意ください。
- (c) 一般的なフェライト磁石よりも強力なネオジウム磁石の使用を推奨します。また、弊社からも、Therma-Max 用磁気回収スタンド (Magna-Stand 8) を販売しています。
- (d) 約 30 秒で磁気回収はほぼ完了しますが、添加したタンパク質の量の違いにより回収時間が多少異なります。
- (e) TBS の使用も可能です。バッファーは 2–8°C で保存してください。TM-SA はブロッキング処理していませんので、必要な場合はブロッキング処理を行ってください。また、TM-SA の分散後、壁面に付着している TM-SA がありましたら、数秒間、低速で遠心分離を行ってください。
- (f) ビオチン化二次抗体にビオチン標識のウサギ抗マウス IgG 抗体を用いる場合は、一次抗体にはマ

ウス抗目的物 IgG 抗体を用います。ビオチン化二次抗体を TM-SA と結合させ、次いで一次抗体を二次抗体結合 TM-SA に固定化して、目的物質を分離します。

(g) 市販のビオチン化プロテイン A を前述①～⑦の操作手順に従い TM-SA に結合させ、ウサギ血清から IgG 分離を行ったものです。

(h) 最終濃度 0.01-0.05 % の Tween20 を含む TBS を洗浄溶液として使用することをお奨めします（他の界面活性剤の使用も可能です）。

(i) 分光光度計、LC-MS、SDS-PAGE などの方法により分離した目的タンパク質の分析を行うことができます。

(j) 若干の磁性粒子がゲルに混入しますが、電気泳動には影響がありません。

(k) 1 M 硫酸ナトリウム溶液の調整例：50 mL チューブに 7.1 g の硫酸ナトリウムを入れ超純水を加えて試験管ミキサーで溶解する。50 mL チューブの目盛を使って超純水で 50 mL にメスアップする。

保存に関する注意

- ・ 本試薬は使用期限内にご使用ください。
- ・ 未使用時は試薬を凍結させないように 2 - 8°C で保存してください。

株式会社 SEGNOS（セグノス）

〒260-0856 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-15

千葉大亥鼻イノベーションプラザ 308 号室

Tel : 080-4797-1027