

BSA の biotin 化(990728 多田隈 ref. 須藤法(1993 年),BBRC ,196, p1504-1510)

1. 10mM MOPS(pH7.4)の作成。4ml の 0.5M MOPS を MQ で f. 200ml に希釈する。
2. BSA を 53mg 以上、遠心チューブにとり、10mM の MOPS(pH7.4)で final. 6.23mg/ml にする。
3. biotin(Dojindo Biotin-PEAC₅-maleimide code#344-06391, 10mg)に DMSO 1ml を加える(f. 17mM)。
4. BSA 8.5ml に biotin945 μ l 加えて、1.5 時間室温放置[mol 比 1:20 (85 μ M:1.7mM)]。この間にカラムを平衡化 (まんぱん(=5ml) \times 5 回) するとともに、”#1,2,3,4,5”とラベルしたサンプルチューブを 2 セット(計 10 本)、用意する。
5. 1.5ml ずつ 6 本に分けて PD-10 に通し(サンプル 1.5ml+補充 buffer 1ml+押し出し用 buffer 2.5ml)、biotin 化 BSA を取り出す(0.5ml \times 5 本)。同じフラクションのものは 3 カラムずつ同じサンプルチューブにとる (1 フラクションに 6 滴ずつ)。
6. 10 倍希釈したサンプル(buffer180 μ l+サンプル 20 μ l)とマイクロセルを用意し、UV で濃度決定する。平均が 3mg/ml 程度 (Abs280=0.19@10 倍希釈時) であれば、1 本にまとめる(通常は fra#2&3&4 を使用)。
7. 600 μ l 用サンプルチューブ約 33 本に青で BSA# と書く。
8. 150 μ l ずつ小分けして液体窒素で急速冷凍し、-30°C で冷凍保存する。

Avidin の作り方 (990314 上野)

1. 15ml 遠心チューブに、MQ を 13ml 加える。
2. StreptAvidin (Molecular Probes C : S-888 5mg) に、MQ を 2ml 入れてよく溶かす。その溶液を 15ml 遠心チューブに移す。これで f. 0.33mg/ml になる。
3. 600 μ l 用サンプルチューブ 100 本に赤で V と書く。
4. 150 μ l ずつ分注し、液体窒素で急速冷凍後、-30°C 冷凍庫の上の扉、右の真ん中の棚に保存する。