

COOHビーズへのリガンド(アミノ基を有する化合物)の固定化

スクリーニングにおいては、まずビーズへのリガンド固定化量の最適化が必要です。リガンド固定化量は、固定化反応時のリガンド濃度により変化させます。本実験プロトコールでは、COOHビーズへの固定化反応時のリガンド濃度を0 mM、0.1 mM、0.3 mM、1 mMの4段階で固定化する場合の方法を示します。

1. 準備するもの

1.1 ビーズ、リガンド(化合物)

- ・COOHビーズ(TAS8848N1140) 4 mg (COOH量: 約200 nmol/mg)
- ・リガンド 1 mg程度

1.2 試薬

- ・N,N'-ジメチルホルムアミド(DMF) 7 mL
- ・N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS) 分子量 115.09 40 mg
- ・1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC・HCl) 分子量 191.70 40 mg
- ・アミノエタノール 分子量 61.08 80 μ L
- ・トリエチルアミン 分子量 101.19 1 μ L
- ・メタノール(MeOH) 1.6 mL

1.3 機器

- ・微量高速冷却遠心分離機
- ・マイクロチューブミキサー(TOMY社 MT-360、など)
- ・超音波分散装置

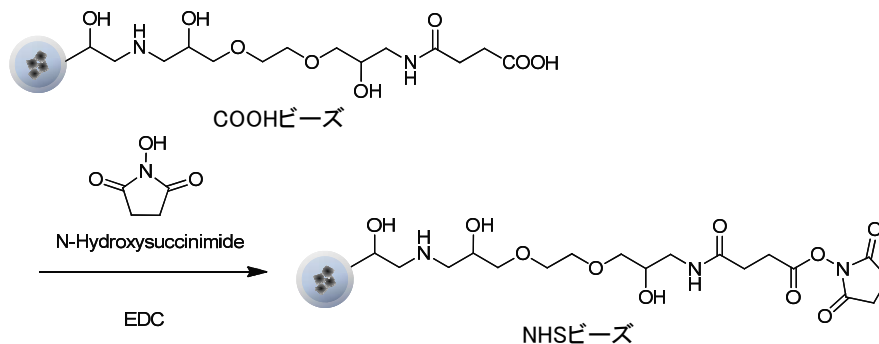
当社では超音波ホモジナイザー:VP-15S カップホーン付(TAITEC社)または超音波分散装置:TA4905(多摩川精機)で動作確認済み。

2. 方法

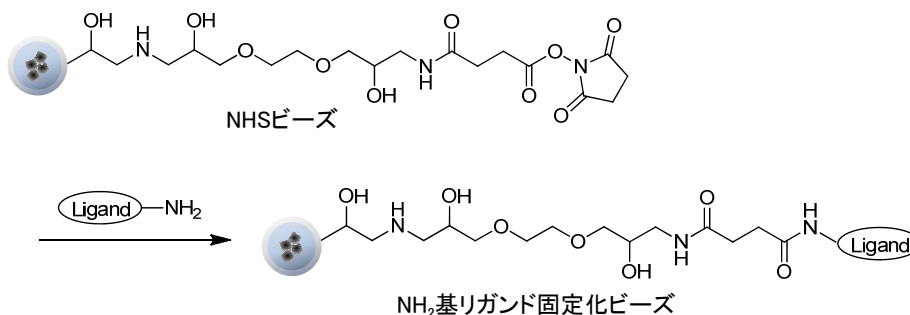
2.1 概要

リガンド固定化の模式図を下記に示す。詳細方法は2.2項を参照下さい。

1) 活性エステル化



2) リガンド固定化



実験プロトコール 008S

2.2 手順

2.2.1 活性エステル化

- 1) スクシンイミドをDMFへ溶解し、1 M スクシンイミド溶液 200 μ Lを調製する。
- 2) 1.5 mL マイクロチューブへCOOHビーズ (TAS8848N1140)を 4 mgとる。
- 3) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 4) DMF 200 μ Lを添加し、ビーズを分散させる。
- 5) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 6) 4)~5)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 7) 洗浄中に別の1.5 mLマイクロチューブへEDC \cdot HCl 30.7 mg (160 μ mol)を量り取る。
- 8) DMF洗浄後、DMFを 640 μ L添加し、ビーズを分散させる。
- 9) 作製しておいた1 M スクシンイミド溶液を 160 μ L加え、混合する。
- 10) 9)を7)のチューブへ全量移し、混合する。

COOHビーズ	(mg)	4
DMF	(μ L)	640
1M スクシンイミド	(μ L)	160
EDC \cdot HCl	(mg)	30.7
合計	(μ L)	800

- 11) マイクロチューブミキサーを使用し、室温にて2時間反応させる。
- 12) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 13) DMF 400 μ Lを添加し、ビーズを分散させる。
- 14) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 15) 13)~14)を更に4回繰り返す。(ビーズの洗浄を計5回行う)
- 16) DMF 80 μ Lに分散させる。(NHSビーズ濃度:1 mg/20 μ L)

2.2.2 リガンド固定化

- 1) リガンド(化合物)をDMFへ溶解し、1 mM リガンド溶液を400 μ L作製する。
- 2) アミノエタノールをDMFへ溶解し、1 M アミノエタノール溶液を1 mL調製する。
- 3) NHSビーズを1 mg(20 μ L)ずつマイクロチューブ4本へ分注、15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 4) DMF 80 μ Lを加えて分散させ、15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 5) DMF、作製しておいたリガンド溶液を加え、ビーズを超音波にて分散させる。

固定化濃度	(mM)	0	0.1	0.3	1
NHSビーズ	(mg)	1	1	1	1
DMF	(μ L)	200	180	140	0
1mM リガンド	(μ L)	0	20	60	200
合計	(μ L)	200	200	200	200

注1) ビーズへ直接リガンド溶液を添加すると局所的に濃度が高くなる懸念があります。従って、ビーズにDMFを添加した後にリガンド溶液を添加して下さい。

注2) リガンドが塩酸塩の場合は2倍モルのトリエチルアミンを添加する。その際は、リガンド溶液を2 mMとし、4 mMのトリエチルアミンを調製、等量混合し、添加すると分かりやすい。

- 6) マイクロチューブミキサーを使用し、室温で70分間反応させる。
- 7) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を回収する。(上清A)
- 8) 残ったビーズへ1 M アミノエタノールを200 μ Lずつ加え、超音波にて分散させる。
- 9) マイクロチューブミキサーを使用し、室温で2時間反応させる。

(リガンド未結合カルボキシル基のマスキング)

実験プロトコール 008S

- 10) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を回収する。(上清B)
- 11) 50% MeOH 200 μ Lを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 12) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 13) 11)~12)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 14) 50% MeOH 40 μ Lに分散させ、4°Cにて保存する。(リガンド固定化ビーズ濃度:0.5 mg/20 μ L)

3. 補足

- ・ ビーズの分散は超音波分散装置で容易に分散できるが、それらが無い場合は、超音波洗浄器や試験管立てを使用したガリガリ法でも分散可能。

(FGビーズのホームページ: <http://www.magneticnanoparticle.jp/jp/htdocs/technique/affinity.html> に動画あり)



- ・ DMFや50% MeOHに分散させたビーズは磁気分離には時間が掛かるので、遠心分離にて回収する。
- ・ DMFはモレキュラーシーブで脱水させたもの、または低水分溶媒を使用する。水分が存在するとビーズからスクシンイミドが遊離してしまい、リガンドがうまく固定化されない場合がある。
- ・ リガンド固定化ビーズの保存は、疎水的な化合物の固定化によるビーズの分散性低下を考慮し、50% MeOHとしているが超純水でも問題ない。
- ・ 上清A、B中のスクシンイミドをHPLCにて定量をすることで下記が調べることができる。
(方法は実験プロトコール201を参照下さい。)
A: リガンド固定化量(リガンド固定化時に遊離したスクシンイミド量)
B: リガンドが固定化されていないNHS基量(マスキング時に遊離したスクシンイミド量)
A+B: ビーズのNHS基量
- ・ リガンドが塩酸塩でない場合でも固定化量が少ない場合は、トリエチルアミンを添加すると反応性を向上させることが可能。

以上