

クリックケミストリー反応を用いたアルキンビーズへのリガンド(アジド構造をもつ化合物)の固定化

スクリーニングにおいて、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、固定化反応時のリガンド濃度を0 μ M、5 μ M、25 μ M、125 μ M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)

- ・アルキンビーズ 4 mg (1 mg/条件)
※ 官能基量: 約100 nmol/mg
- ・リガンド 0.1 mg程度

1.2 試薬

- ・*t*-ブチルアルコール(*t*-BuOH) 12 mL
- ・ジメチルスルホキシド(DMSO) 3 mL
- ・Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA) 分子量 530.63 2.7 mg
- ・Copper(II)sulfate (CuSO₄) 分子量 159.61 16 mg
- ・(+)-Sodium L-ascorbate 分子量 198.11 20 mg
- ・メタノール(MeOH) 4 mL

1.3 機器

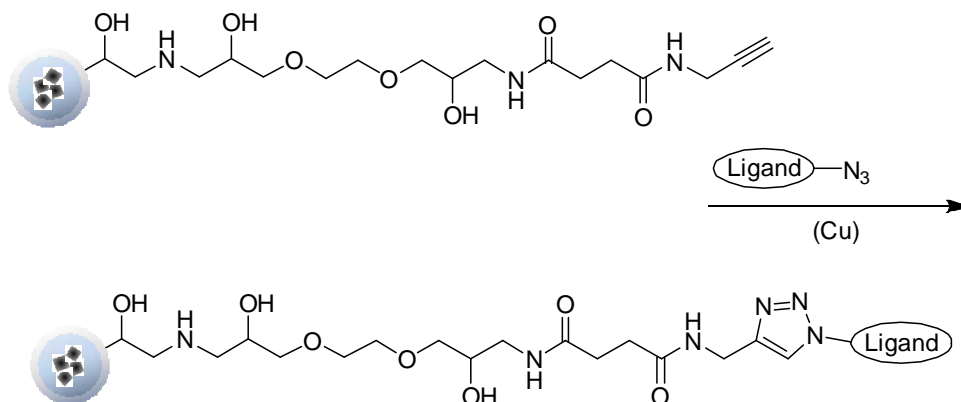
- ・微量高速冷却遠心分離機
- ・マイクロチューブミキサー(TOMY社 MT-360、など)
- ・超音波ホモジナイザー(TAITEC社 VP-15S カップホーン付、など)
または、超音波洗浄器(当社 超音波分散装置 TA4905 など)

2. 方法

2.1 溶液調製

- 1) *t*-BuOH 12 mLとDMSO 3 mLを混合し、*t*-BuOH:DMSO = 4:1の溶液(*t*-BuOH/DMSO溶液)を15mL調製する。
※*t*-BuOHは凝固点が低い(25.7°C)ので、凝固している場合は使用前に融解させる。
- 2) リガンド(化合物)を*t*-BuOH/DMSO溶液へ溶解し、500 μ M リガンド溶液100 μ Lを調製する。
- 3) TBTA 2.7 mgを*t*-BuOH/DMSO溶液 1 mLへ溶解し、5 mM TBTA溶液 1 mLを調製する。
5 mM TBTA溶液 5 μ Lに*t*-BuOH/DMSO溶液 95 μ Lを加え、250 μ M TBTA溶液 100 μ Lを調製する。
- 4) CuSO₄ 16 mgを超純水 1 mLへ溶解し、100 mM CuSO₄溶液 1 mLを調製する。100 mM CuSO₄溶液 5 μ Lに超純水 95 μ Lを加え、5 mM CuSO₄溶液 100 μ Lを調製する。
- 5) (+)-Sodium L-ascorbate 20 mgを超純水 1 mLへ溶解し、100 mM (+)-Sodium L-ascorbate溶液 1 mLを調製する。100 mM (+)-Sodium L-ascorbate溶液 5 μ Lに超純水 95 μ Lを加え、5 mM (+)-Sodium L-ascorbate溶液 100 μ Lを調製する。
- 6) 1)で作製した*t*-BuOH/DMSO溶液 2 mLと超純水 2 mLを混合し、*t*-BuOH/DMSO:超純水=1:1の溶液(*t*-BuOH/DMSO/超純水溶液)を 4 mL調製する。

2.2 リガンドの固定化



- 1) アルキンビーズを1 mg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。
- 2) 各種反応溶液を以下のように加える。
表の上から順番に加え、250 μ M TBTA溶液添加後に、ビーズを超音波にて分散させる。その後、残りの試薬を加える。

固定化濃度	(μ M)	0	5	25	125
アルキンビーズ	(mg)	1.0	1.0	1.0	1.0
t-BuOH/DMSO	(μ L)	100	96	80	0
500 μ M リガンド	(μ L)	0	2	10	50
250 μ M TBTA	(μ L)	0	2	10	50
超純水	(μ L)	100	96	80	0
5mM CuSO ₄	(μ L)	0	2	10	50
5mM (+)-Sodium ascorbate	(μ L)	0	2	10	50
合計	(μ L)	200	200	200	200

- 3) マイクロチューブミキサーを使用し、室温で16~20時間反応させる。
- 4) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 5) t-BuOH/DMSO/超純水溶液 200 μ Lを加えて、ビーズを超音波にて分散させる。
- 6) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 7) 5)~6)を更に2回繰り返す。(t-BuOH/DMSO/超純水溶液によるビーズの洗浄を計3回行う)
- 8) 50% MeOH 200 μ Lを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 9) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 10) 8)~9)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 11) 50% MeOH 40 μ Lに分散させ、4 $^{\circ}$ Cにて保存する。

(リガンド固定化ビーズ濃度: 0.5mg/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。(ガリガリ法では、チューブの蓋が開かないようにキャップロックを用いることが望ましい。)

(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)



- ・ t-BuOH/DMSO溶液、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。
- ・ 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、超純水でも問題無い。

以上