

リンカービーズへのリガンド (フェノール性OH基または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。本プロトコールでは、リンカービーズへの固定化反応時にリガンド濃度を0, 2, 10, 50 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)

- ・リンカービーズ (TAS8848N1110) 4 mg (エポキシ基量：約200 nmol/mg)
- ・リガンド 8 mg程度

1.2 試薬

- ・N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)： 脱水品 6 mL
- ・炭酸カリウム (K₂CO₃) 分子量 138.21 20 mg
- ・メタノール (MeOH) 2.8 mL

1.3 機器

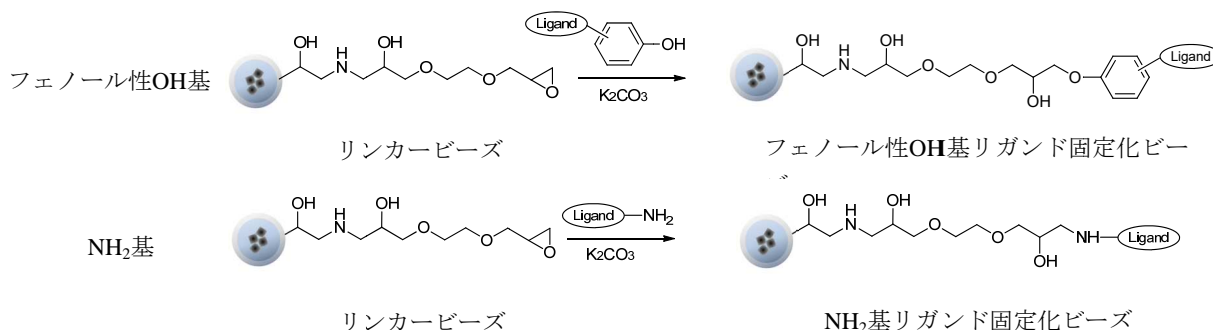
- ・微量高速冷却遠心分離機
- ・恒温槽
- ・ローテーター
- ・超音波分散装置

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。フェノール性OH基とNH₂基は同じ方法で固定化可能。詳細方法は2.2項を参照のこと。



2.2 手順

- 1) リガンド (化合物) をDMFへ溶解し、50 mM リガンド溶液を400μL調製する。
- 2) 1.5 mLマイクロチューブ4本へリンカービーズ (TAS8848N1110) を1 mgずつとる。
- 3) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 4) DMF 200 μLを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 5) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) 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 (平衡化) を計3回行う)
- 7) DMF及び、調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。(次ページ表参照)
- 8) リガンドに対し約10倍モル (50 mMのリガンドに対しては14 mgとなる。) の炭酸カリウムを添加し、超音波にて混合する。
(または、別のチューブに炭酸カリウムを量りとり、その容器へリガンド及びビーズ溶液を添加する。)

実験プロトコール 003S

固定化濃度	mM	0	2	10	50
リンカービーズ	mg	1	1	1	1
DMF	μL	200	192	160	0
50 mM リガンド	μL	0	8	40	200
炭酸カリウム	mg	0	0.56	2.8	14
合計	μL	200	200	200	200

注) 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る。
従って、ビーズにDMFを添加した後にリガンド溶液を添加する。

- 9) 恒温槽にてローテーターを使用し、60℃にて一晚 (16~20時間) 反応させる。
(炭酸カリウムは溶けない。)
- 10) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 11) 50% DMF 200μLを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 12) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
(ビーズは中間層に集まるのでそれより上層のみ廃棄する)
- 13) 11)~12)を更に1回繰り返す。(ビーズの洗浄を計2回行う)
- 14) 超純水 200 μLを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 15) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 16) 50% MeOH 200 μLを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 17) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 18) 16)~17)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 19) 50% MeOH 40 μLに分散させ、4℃にて保存する。(リガンド固定化ビーズ濃度 : 0.5 mg/20 μL)

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、または低水分溶媒品を使用すること。
- ・ 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