

実験プロトコール 004

OHビーズへのリガンド (カルボキシル基を有する化合物) 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、OHビーズへの固定化反応時のリガンド濃度を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)

- ・OHビーズ (TAS8848N1120) 10 mg (OH基量：約200 nmol/mg)
- ・リガンド 20 mg程度

1.2 試薬

- ・N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)：脱水产品 20 mL
- ・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 30 mg
- ・トリエチルアミン 200 μ L
- ・メタノール (MeOH) 4 mL

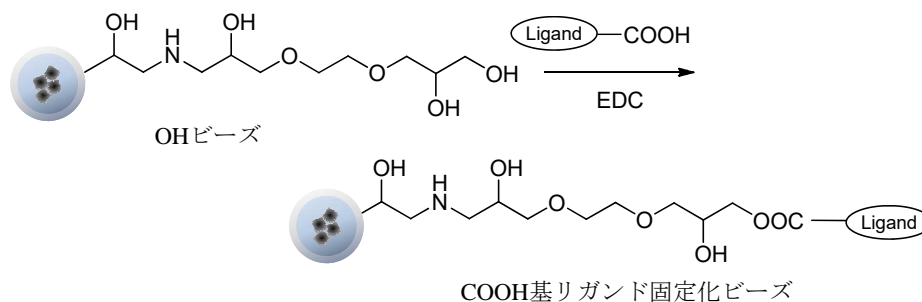
1.3 機器

- ・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項を参照のこと。



2.2 手順

- 1) リガンド (化合物) をDMFへ溶解し、100 mM リガンド溶液を500 μ L調製する。
- 2) 1.5 mLマイクロチューブ4本へOHビーズ (TAS8848N1120) を2.5 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 500 μ L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。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 7) DMF、トリエチルアミン、作製しておいた100 mM リガンド溶液を加え、ビーズを超音波にて分散させる。(次ページ参照)
- 8) リガンドに対し5倍モル (50 mMのリガンドに対しては24 mg) のEDC・HClを添加し、混合する。(または、別のチューブにEDC・HClを量りとり、そこへリガンド・ビーズ溶液を添加する。)

実験プロトコール 004

固定化濃度	mM	0	2	10	50
OHビーズ	mg	2.5	2.5	2.5	2.5
DMF	μL	450	440	400	200
100 mM リガンド	μL	0	10	50	250
トリエチルアミン	μL	50	50	50	50
EDC · HCl	mg	0	1	5	24
合計	μL	500	500	500	500

- 9) マイクロチューブミキサーを使用し、室温にて一晚（16～20時間）反応させる。
- 10) 遠心分離（15,000 rpm, r.t., 5 min）を行い、上清を廃棄する。
- 11) DMF 500 μL 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。
- 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 500 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) 14)～15)を更に2回繰り返す。（ビーズの洗浄を計3回行う）
- 17) 50% MeOH 100 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

- ・ OHビーズは反応性が低く、生じるエステル結合は安定性が低いため、COOH基のリガンドの固定化はNH₂ビーズ（TAS8848N1130）を使用した方が効率的です。
- ・ 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）



- ・ 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。

4. 注意事項

- ・ EDC · HClは吸湿しやすいので水分のコンタミにご注意下さい。
- ・ このリガンド固定化ビーズは、エステル結合のため、加水分解が起こりやすいので長期保存はできません。固定化後はできるだけ早くご使用下さい。

以上