

## 実験プロトコール 005

### NH<sub>2</sub>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① HOSuを使用する方法

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、NH<sub>2</sub>ビーズへの固定化反応時のリガンド濃度を0, 0.4, 2, , 10 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）

- NH<sub>2</sub>ビーズ (TAS8848N1130) 10 mg (NH<sub>2</sub>量：約200 nmol/mg)
- リガンド 5 mg程度

##### 1.2 試薬

- N,N'-ジメチルホルムアミド (DMF)：脱水品 25 mL
- N-ヒドロキシスクシンイミド (HOSu) 分子量 115.09 5 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 (EDC)  
分子量 155.245 mg (ペプチド研究所社 1020など)
- 無水酢酸 分子量 102.09 400 μL
- メタノール (MeOH) 5 mL

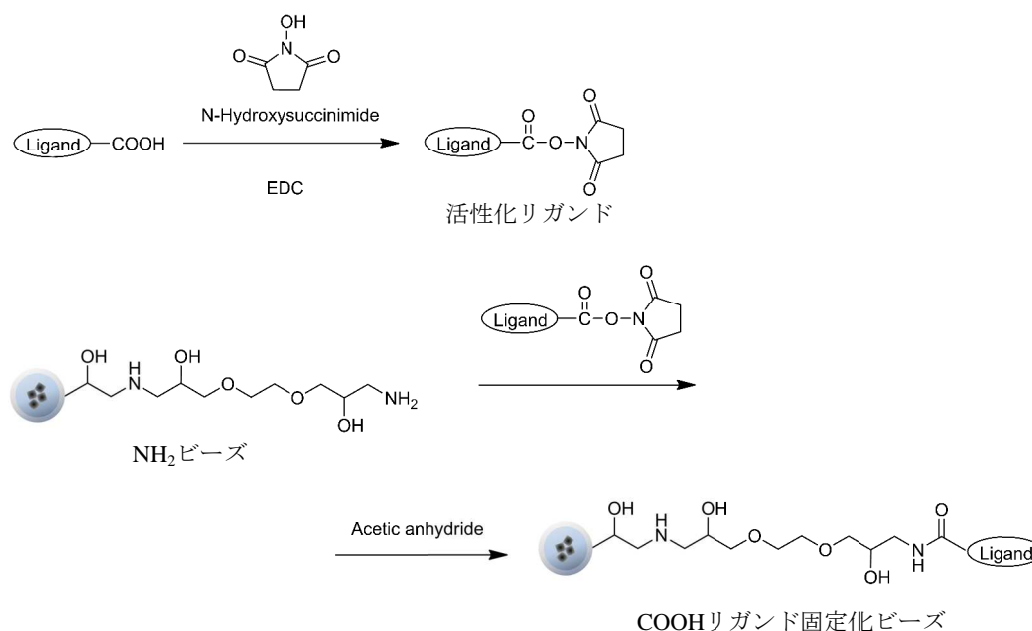
##### 1.3 機器

- 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。



##### 2.2 手順

- 1) リガンド（化合物）をDMFへ溶解し、10 μmol/500 μL (20 mM) 溶液を調製する（反応時に10 mMになるようにする）。
- 2) スクシンイミドをDMFへ溶解し、200 mM スクシンイミド溶液100 μLを調製する。

## 実験プロトコール 005

- 3) EDCをDMFへ溶解し、200 mM EDC溶液 100  $\mu\text{L}$ を調製する。
- 4) 20 mM リガンド溶液500  $\mu\text{L}$ へDMF 400  $\mu\text{L}$ 、200 mM スクシンイミド溶液50  $\mu\text{L}$ 、200 mM EDC溶液 50  $\mu\text{L}$ を混合し、マイクロチューブミキサーにて室温で2時間反応させる (等モルずつ反応させる)。

20 mM リガンド (化合物)	$\mu\text{L}$	500 (10 $\mu\text{mol}$ )
200 mM スクシンイミド	$\mu\text{L}$	50 (10 $\mu\text{mol}$ )
200 mM EDC	$\mu\text{L}$	50 (10 $\mu\text{mol}$ )
DMF	$\mu\text{L}$	400
反応液量	$\mu\text{L}$	1000

- 5) 1.5 mLマイクロチューブ4本へ $\text{NH}_2$ ビーズ (TAS8848N1130) を2.5 mgずつとる。
- 6) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 7) DMF 500  $\mu\text{L}$ を添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 8) 15,000 rpm、室温にて5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 9) 7)~8)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 10) リガンド固定化濃度に応じてDMFを加える。
- 11) 作製しておいた活性化10 mM 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	0.4	2	10
$\text{NH}_2$ ビーズ	mg	2.5	2.5	2.5	2.5
DMF	$\mu\text{L}$	500	480	400	0
活性化10mM リガンド	$\mu\text{L}$	0	20	100	500
合計	$\mu\text{L}$	500	500	500	500

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。

- 12) 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。
- 13) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 14) DMF 500  $\mu\text{L}$ 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) DMF 400  $\mu\text{L}$ へ超音波にて分散させる。
- 18) 無水酢酸 100  $\mu\text{L}$ を加える。(20%無水酢酸)
- 19) 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。  
(リガンド未結合アミノ基のマスキング)
- 20) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 21) DMF 500  $\mu\text{L}$ を添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 22) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 23) 21)~22)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)

OH基のような無水酢酸にてアセチル化されてしまう官能基を有する場合は、マスキング後に0.1 M 水酸化ナトリウム溶液500  $\mu\text{L}$ を加えて分散、マイクロチューブミキサーを使用し、室温にて30分反応させることで脱アセチル化を行う。その後、遠心分離、超音波によるビーズの分散を繰り返し、超純水500  $\mu\text{L}$ による洗浄を3回行う。

## 実験プロトコール 005

- 24) 50% MeOH 500  $\mu$ Lを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 25) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 26) 24)~25)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 27) 50% MeOH 100  $\mu$ 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 : 0.5 mg/20  $\mu$ 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ブ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。
- ・リガンド未結合アミノ基のマスキングは、20%無水酢酸で室温にて2時間攪拌するか、あるいは1%無水酢酸で室温にて一晩攪拌することでマスキングできる。

以上