

# 実験プロトコール 015

## NHSビーズへのMTXアミノ化誘導体の固定化

### 1. 準備するもの

#### 1.1 ビーズ、MTXアミノ化誘導体

- ・NHSビーズ(TAS8848N1141) 4 mg (1mg/条件)  
※NHS量: 200 nmol/mg
- ・MTXアミノ化誘導体(TAS8849N1010) 1本

#### 1.2 試薬

- ・N,N'-ジメチルホルムアミド(DMF) 3 mL
- ・トリエチルアミン 分子量 101.19 7  $\mu$ L
- ・アミノエタノール 分子量 61.08 61  $\mu$ L
- ・メタノール(MeOH) 3 mL

#### 1.3 機器

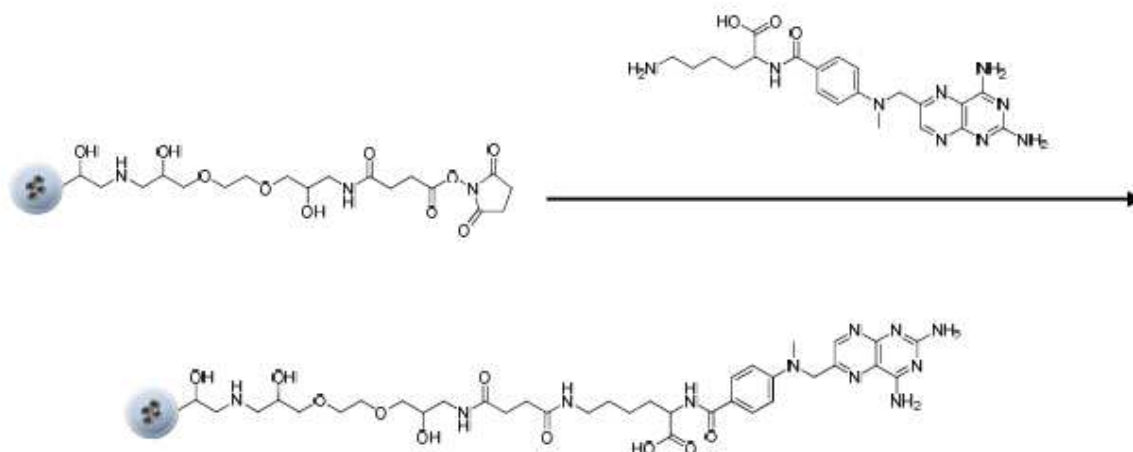
- ・微量高速冷却遠心分離機
- ・マイクロチューブミキサー(TOMY社 MT-360、など)
- ・超音波ホモジナイザー(TAITEC社 VP-15S カップホーン付き、など)  
または、超音波洗浄器(当社 超音波分散装置 TA4905 など)

### 2. 方法

#### 2.1 溶液調整

- 1) MTXアミノ化誘導体1本へDMF1mLを添加し、0.2mM MTXアミノ化誘導体溶液を作製する。DMFを添加したMTXアミノ化誘導体は超音波ホモジナイザーまたは超音波洗浄器で十分に溶解させる。
- 2) トリエチルアミン7  $\mu$ lをDMF993  $\mu$ lへ溶解し、50mM トリエチルアミン溶液1mlを調整する。50mM トリエチルアミン溶液5  $\mu$ lにDMF5  $\mu$ lを加え、25mM トリエチルアミン溶液10  $\mu$ を調整する。更に、25mM トリエチルアミン溶液5  $\mu$ lにDMF5  $\mu$ を加え、12.5mM トリエチルアミン溶液10  $\mu$ を調整する。
- 3) アミノエタノール61  $\mu$ lをDMF939  $\mu$ lへ溶解し、1M アミノエタノール溶液1mlを調整する。

#### 2.2 MTXの固定化



## 実験プロトコール 015

- 1) NHSビーズを1mgずつマイクロチューブ4本へ分注し、15,000rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 2) DMF 100  $\mu$  lを加えて分散させ、15,000rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 3) DMF、作製しておいたリガンド溶液を下表のように加え、ビーズを超音波にて分散させる。

固定化濃度	(mM)	0	0.05	0.1	0.2
NHSビーズ	(mg)	1	1	1	1
0.2mM MTXアミノ化誘導体	( $\mu$ l)	0	50	100	200
トリエチルアミン	( $\mu$ l)	0	2 (12.5mM)	2 (25mM)	2 (50mM)
DMF	( $\mu$ l)	200	148	98	0
合計	( $\mu$ l)	200	200	200	202

※ トリエチルアミンは2.1で調整した12.5mM、25mM、50mM溶液をそれぞれ添加する。

- 4) 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。
- 5) 反応終了後、15,000rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を回収する。  
(上清A)
- 6) 残ったビーズへ1M アミノエタノールを200  $\mu$  lずつ加え、超音波にて分散させる。
- 7) 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)
- 8) マスキング終了後、15,000rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を回収する。  
(上清B)
- 9) 50% MeOH 200  $\mu$  lを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 10) 15,000rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 11) 9)～10)を更に繰り返す(ビーズ洗浄を計3回行う)。
- 12) 50% MeOH 40  $\mu$  lに分散させ、4℃にて保存する。  
(リガンド固定化ビーズ濃度 : 0.5mg/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/notes/index.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。

## 実験プロトコール 015

- ・ 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。
- ・ 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(マスク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

以上