

実験プロトコール 015S

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 (1 mg/条件) (NHS量 : 200 nmol/mg)
- ・ MTXアミノ化誘導体 (TAS8849N101) 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 μ L
- ・ アミノエタノール 分子量 61.08 61 μ L
- ・ メタノール (MeOH) 3 mL

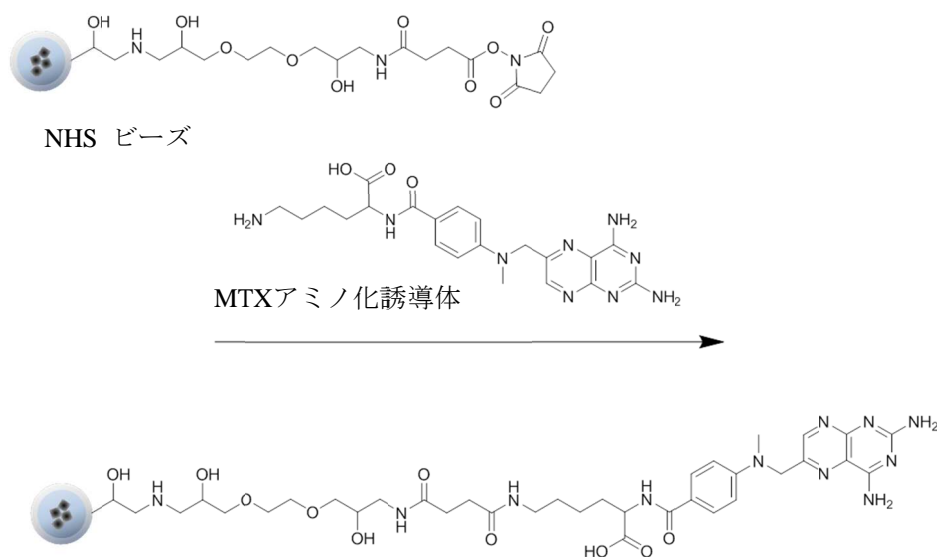
1.3 機器

- ・ 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)
- ・ 超音波分散装置
超音波ホモジナイザー (カップホーン付) (多摩川精機TAB4905N10など)
超音波洗浄器 (多摩川精機TAB4905など)

2. 方法

2.1 概要

MTXアミノ化誘導体固定化の模式図を以下に示す。



2.2 溶液調整

- 1) MTXアミノ化誘導体1本へDMF1 mLを添加し、0.2 mM 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 μ LをDMF993 μ Lへ溶解し、50 mM トリエチルアミン溶液1 mLを調製する。50 mM トリエチルアミン溶液5 μ LにDMF5 μ Lを加え、25 mM トリエチルアミン溶液10 μ Lを調製する。更に、25 mM トリエチルアミン溶液5 μ LにDMF5 μ Lを加え、12.5 mM トリエチルアミン溶液10 μ Lを調製する。
- 3) アミノエタノール61 μ LをDMF939 μ Lへ溶解し、1 M アミノエタノール溶液1 mLを調製する。

実験プロトコール 015S

2.3 MTXの固定化

- 1) NHSビーズを1 mgずつマイクロチューブ4本へ分注し、15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 2) DMF100 μ Lを加えて分散させ、15,000 rpm、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	0	0.05	0.1	0.2	mM
NHSビーズ	1	1	1	1	mg
0.2 mM MTXアミノ化誘導体	0	50	100	200	μ L
トリエチルアミン	0	2 (12.5 mM)	2 (25 mM)	2 (50 mM)	
DMF	200	148	98	0	μ L
合計	200	200	200	202	μ L

※トリエチルアミンは2.2で調整した12.5, 25, 50 mM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、15,000 rpm、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1 M アミノエタノールを200 μ 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、15,000 rpm、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 μ Lを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 10) 15,000 rpm、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 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 : 0.5 mg/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://fgb.tamagawa-seiki.com/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。
- ・上清A、B中のNHS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NHS量)

B : リガンドが固定化されていないNHS基量 (マスキング時に遊離したNHS量)

A+B : ビーズのNHS基量

実験プロトコール 015S

- MTXアミノ化誘導体はDMSOを使用すると容易に溶解できる。ただし、プロトコール201に沿ってHPLCでNHS量を測定する場合は、NHSとDMSOのHPLCピークが重なるため、添加するDMSOの濃度を10%までとする。

以上