

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)

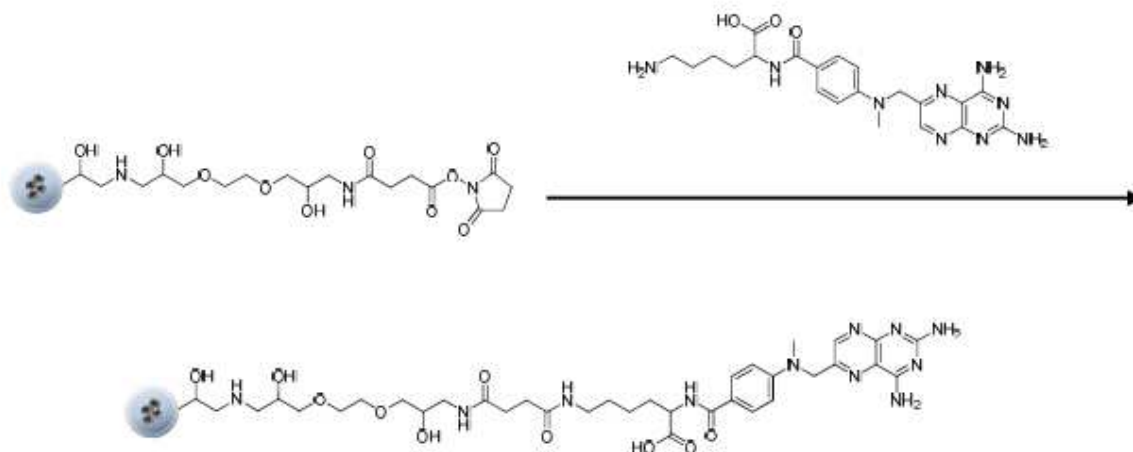
または、超音波洗浄器(当社 超音波分散装置 TA4905 など)

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。

2.2 MTXの固定化



実験プロトコール 015S

- 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) DMF 100 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	(mM)	0	0.05	0.1	0.2
NHSビーズ	(mg)	1	1	1	1
0.2 mM MTXアミノ化誘導体	(μ L)	0	50	100	200
トリエチルアミン	(μ L)	0	2 (12.5 mM)	2 (25 mM)	2 (50 mM)
DMF	(μ L)	200	148	98	0
合計	(μ L)	200	200	200	202

※ トリエチルアミンは2.1で調整した12.5 mM、25 mM、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°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。

実験プロトコール 015S

- ・ 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(マスキ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
- ・ 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でスクシンイミド量を測定する場合は、スクシンイミドと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