

COOH beadsへのリガンド (OH基を有する化合物) の固定化

リガンド結合タンパク質のアフィニティ精製(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、COOHビーズへの固定化反応時のリガンド濃度を0, 3, 10, 30 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)

- COOH beads (TAS8848N1140) 10 mg (COOH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 30 mL
- フルオロ-N,N,N',N'-テトラメチルホルムアミジニウムヘキサフルオロフォスファート(TFFH)
分子量264.12 4.0 mg
- N,N-ジイソプロピルエチルアミン(*i*-Pr₂NEt) 分子量129.24 8.8 μL
- oxyma pure 分子量142.11 2.1 mg
- 2-アミノエタノール 分子量 61.08 126 μL
- N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 分子量115.09 51.8 mg
- 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC・HCl) 分子量191.70 76.8 mg

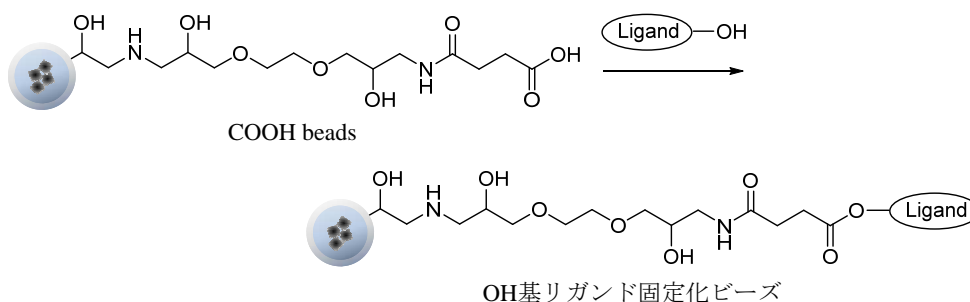
1.3 機器

- 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

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

リガンド固定化

- 1) リガンド (化合物) をDMFへ溶解し、100 mM リガンド溶液を 250 μL調製する。
- 2) *i*-Pr₂NEt (8.8 uL)をDMF (41.2 uL)へ混合し、1M *i*-Pr₂NEt を50 uL調製する。1M *i*-Pr₂NEtを希釈して100 mM *i*-Pr₂NEtを120 uL調製する。
- 3) TFFH (4.0 mg)をDMF (150 uL)へ溶解し、100 mM TFFH溶液を150 uL調製する。
- 4) oxyma pure (2.1 mg)をDMF (150 uL)へ溶解し、10 mM oxyma pure溶液を150 uL調製する。
- 5) 1.5 mLマイクロチューブ4本へCOOH beads (TAS8848N1140) 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 μLを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。

実験プロトコール 016

- 8) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 9) 手順7)~8)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 10) 手順1)~4)で作製した溶液を以下の表の通りに加え、ビーズを超音波にて分散させる。

固定化濃度	0	3	10	30	mM
COOHビーズ	2.5	2.5	2.5	2.5	mg
DMF	500	440	315	147	μL
100 mM <i>i</i> -Pr ₂ NEt or 1M <i>i</i> -Pr ₂ NEt	0	25 (100 mM)	75 (100 mM)	23 (1M)	μL
100 mM TFFH	0	10	30	90	μL
100 mM リガンド	0	15	50	150	μL
10 mM oxyma pure	0	10	30	90	μL
合計	500	500	500	500	μL

- 11) 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。
- 12) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 13) DMF 500 μLを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 14) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 15) 手順13)~14)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)

マスキング

- 16) NHS (51.8 mg)をDMF (450 μL)へ溶解し、1M NHS溶液を450 μL調製する。
- 17) アミノエタノール (126 μL)とDMF (1974 μL)を混合し、1M アミノエタノール溶液を2.1 mL調製する。
- 18) 別の1.5 mLマイクロチューブへEDC・HCl 19.2 mg (100 μmol)を4本量り取る。
- 19) 手順15)で洗浄したビーズへDMF 400 μLを添加し、ビーズを分散させる。
- 20) 1M NHS溶液をそれぞれ100 μL加え、混合する。
- 21) 手順20)を手順18)のチューブへ全量移し、混合する。

反応後ビーズ	2.5	mg
DMF	400	μL
1M NHS	100	μL
EDC・HCl	19.2	mg
合計	500	μL

- 22) 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。
- 23) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 24) DMF 500 μLを添加し、ビーズを分散させる。
- 25) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 26) 手順24)~25)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 27) 上清を廃棄したビーズへ1Mアミノエタノール500 μL (4本) を添加し、ビーズを分散させる。
- 28) 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。
- 29) 2時間後、遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 30) 超純水 500 μLを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 31) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。

実験プロトコール 016

- 32) 手順30)~31)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 33) 超純水 100 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や超純水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。

4. 注意事項

- ・TFFH、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。
- ・TFFH溶液は活性が長く持ちませんので、なるべく使用直前に調製して下さい。
- ・TFFH使用後は、試薬瓶に不活性ガスを封入して保存して下さい。空気中の水分で試薬の活性が低下しますので、開封して時間が経過したTFFHは使用しないようにして下さい。
- ・このリガンド固定化ビーズは、リガンドとビーズ結合部分が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。
- ・フェノール性OH基を持つリガンドをビーズへ固定化する場合は、プロトコール003「リンカービーズへのリガンド(フェノール性OH基またはアミノ基を有する化合物)の固定化」をご参照ください。

以上