

## クリックケミストリー反応を用いたアルキンビーズへのリガンド(アジド構造をもつ化合物)の固定化

スクリーニングにおいて、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、固定化反応時のリガンド濃度を0  $\mu$ M、5  $\mu$ M、25  $\mu$ M、125  $\mu$ M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)

- ・アルキンビーズ 10 mg (2.5 mg/条件)  
※ 官能基量: 約100 nmol/mg
- ・リガンド 0.1 mg程度

#### 1.2 試薬

- ・*t*-ブチルアルコール(*t*-BuOH) 12 mL
- ・ジメチルスルホキシド(DMSO) 3 mL
- ・Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA) 分子量 530.63 2.7 mg
- ・Copper(II)sulfate(CuSO<sub>4</sub>)分子量 159.61 16 mg
- ・(+)-Sodium L-ascorbate 分子量 198.11 20 mg
- ・メタノール(MeOH) 4 mL

#### 1.3 機器

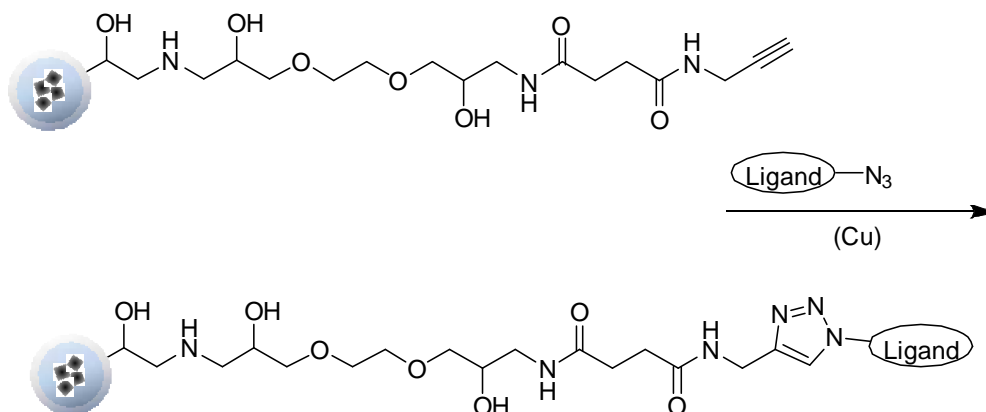
- ・微量高速冷却遠心分離機
- ・マイクロチューブミキサー(TOMY社 MT-360、など)
- ・超音波ホモジナイザー(TAITEC社 VP-15S カップホーン付、など)  
または、超音波洗浄器(当社 超音波分散装置 TA4905 など)

### 2. 方法

#### 2.1 溶液調製

- 1) *t*-BuOH 12 mLとDMSO 3 mLを混合し、*t*-BuOH:DMSO = 4:1の溶液(*t*-BuOH/DMSO溶液)を15 mL調製する。  
※*t*-BuOHは凝固点が低い(25.7°C)ので、凝固している場合は使用前に融解させる。
- 2) リガンド(化合物)を*t*-BuOH/DMSO溶液へ溶解し、500  $\mu$ M リガンド溶液200  $\mu$ Lを調製する。
- 3) TBTA 2.7 mgを*t*-BuOH/DMSO溶液 1 mLへ溶解し、5 mM TBTA溶液 1 mLを調製する。  
5 mM TBTA溶液 10  $\mu$ Lに*t*-BuOH/DMSO溶液 190  $\mu$ Lを加え、250  $\mu$ M TBTA溶液 200  $\mu$ Lを調製する。
- 4) CuSO<sub>4</sub> 16 mgを超純水 1 mLへ溶解し、100 mM CuSO<sub>4</sub>溶液 1 mLを調製する。100 mM CuSO<sub>4</sub>溶液 10  $\mu$ Lに超純水 190  $\mu$ Lを加え、5 mM CuSO<sub>4</sub>溶液 200  $\mu$ Lを調製する。
- 5) (+)-Sodium L-ascorbate 20 mgを超純水 1 mLへ溶解し、100 mM (+)-Sodium L-ascorbate溶液 1 mLを調製する。100 mM (+)-Sodium L-ascorbate溶液 10  $\mu$ Lに超純水 190  $\mu$ Lを加え、5 mM (+)-Sodium L-ascorbate溶液 200  $\mu$ Lを調製する。
- 6) 1)で作製した*t*-BuOH/DMSO溶液 4 mLと超純水 4 mLを混合し、*t*-BuOH/DMSO:超純水=1:1の溶液(*t*-BuOH/DMSO/超純水溶液)を8 mL調製する。

## 2.2 リガンドの固定化



- 1) アルキンビーズを2.5 mgずつマイクロチューブ4本へ分注、15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 2) 各種反応溶液を以下のように加える。  
表の上から順番に加え、250  $\mu\text{M}$  TBTA溶液添加後に、ビーズを超音波にて分散させる。  
その後、残りの試薬を加える。

固定化濃度	( $\mu\text{M}$ )	0	5	25	125
アルキンビーズ	(mg)	2.5	2.5	2.5	2.5
t-BuOH/DMSO	( $\mu\text{L}$ )	250	240	200	0
500 $\mu\text{M}$ リガンド	( $\mu\text{L}$ )	0	5	25	125
250 $\mu\text{M}$ TBTA	( $\mu\text{L}$ )	0	5	25	125
超純水	( $\mu\text{L}$ )	250	240	200	0
5mM CuSO <sub>4</sub>	( $\mu\text{L}$ )	0	5	25	125
5mM (+)-Sodium ascorbate	( $\mu\text{L}$ )	0	5	25	125
合計	( $\mu\text{L}$ )	500	500	500	500

- 3) マイクロチューブミキサーを使用し、室温で16~20時間反応させる。
- 4) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 5) t-BuOH/DMSO/超純水溶液 500  $\mu\text{L}$ を加えて、ビーズを超音波にて分散させる。
- 6) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 7) 5)~6)を更に2回繰り返す。(t-BuOH/DMSO/超純水溶液によるビーズの洗浄を計3回行う。
- 8) 50% MeOH 50  $\mu\text{L}$ を添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 9) 15,000 rpm、室温で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄する。
- 10) 8)~9)を更に2回繰り返す。(ビーズの洗浄を計3回行う)
- 11) 50% MeOH 100  $\mu\text{L}$ に分散させ、4 $^{\circ}\text{C}$ にて保存する。

(リガンド固定化ビーズ濃度: 0.5 mg/20  $\mu\text{L}$ )

### 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)



- ・ t-BuOH/DMSO溶液、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。
- ・ 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。

以上