

クリックケミストリー反応を用いたAlkyne beadsへのリガンド(アジド構造をもつ化合物)の固定化

アフィニティ精製において、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, 5, 25, 125 μM 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)

- Alkyne beads 4 mg (1 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_4) 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

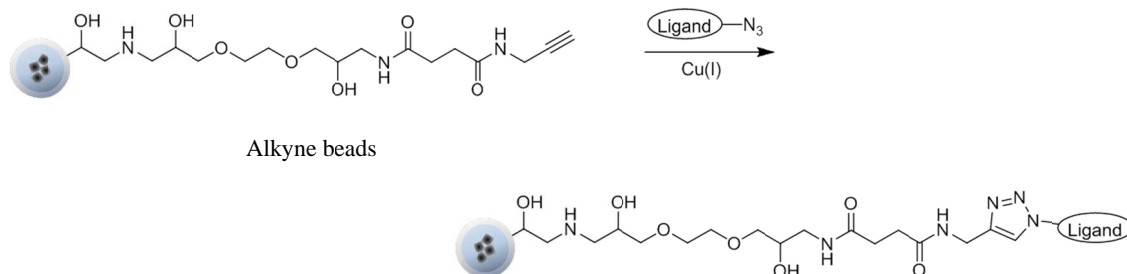
1.3 機器

- 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2.3項を参照下さい。



2.2 溶液調製

t-BuOH/DMSO溶液:

t-BuOH 8 mLとDMSO 2 mLを混合し、*t*-BuOH:DMSO = 4:1の溶液を10 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。

500 μM リガンド溶液:

リガンド (化合物) を*t*-BuOH/DMSO溶液へ溶解し、500 μM リガンド溶液100 μL を調製する。

250 μM TBTA溶液:

TBTA 2.7 mgを*t*-BuOH/DMSO溶液1 mLへ溶解し、5 mM TBTA溶液を調製する。
5 mM TBTA溶液5 μL に*t*-BuOH/DMSO溶液95 μL を加え、250 μM TBTA溶液を調製する。

5 mM CuSO_4 溶液:

CuSO_4 16 mgを超純水1 mLへ溶解し、100 mM CuSO_4 溶液を調製する。
100 mM CuSO_4 溶液5 μL に超純水95 μL を加え、5 mM CuSO_4 溶液を調製する。

5 mM (+)-Sodium L-ascorbate溶液:

(+)-Sodium L-ascorbate 20 mgを超純水1 mLへ溶解し、100 mM (+)-Sodium L-ascorbate溶液を調製する。100 mM (+)-Sodium L-ascorbate溶液5 μL に超純水95 μL を加え、5 mM (+)-Sodium L-ascorbate溶液を調製する。

***t*-BuOH/DMSO/超純水溶液:**

t-BuOH/DMSO溶液2 mLと超純水2 mLを混合し、*t*-BuOH/DMSO:超純水= 1:1の溶液を4 mL調製する。

2.3 手順

- 1) Alkyne beadsを1 mgずつマイクロチューブ4本へ分注、遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 2) 各種反応溶液を下表の上から順番に加え、250 μ 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	0	5	25	125	μ M
Alkyne beads	1.0	1.0	1.0	1.0	mg
<i>t</i> -BuOH/DMSO	100	96	80	0	μ L
500 μ M リガンド	0	2	10	50	μ L
250 μ M TBTA	0	2	10	50	μ L
超純水	100	96	80	0	μ L
5mM CuSO ₄	0	2	10	50	μ L
5mM (+)-Sodium ascorbate	0	2	10	50	μ L
合計	200	200	200	200	μ L

- 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) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 5) *t*-BuOH/DMSO/超純水溶液200 μ Lを加えて、ビーズを超音波にて分散させる。
- 6) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 7) 手順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 200 μ Lを添加し、ビーズを超音波にて分散させる。
- 9) 遠心分離 (15,000 rpm, r.t., 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 10) 手順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 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://fgb.tamagawa-seiki.com/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