

コアクチベータを用いた LodeStars カルボキシル磁気ビーズの結合プロトコル (2 ステップ)

はじめに

本書で紹介するプロトコルにより、カルボキシル表面のある Agilent LodeStars 磁気ビーズに生体分子が適切に結合するためのガイダンスを提供します。この汎用プロトコルでは生体分子の結合のためのステップを解説しますが、アジレントは個別のアプリケーションで最大性能を達成するためのさらなる最適化を推奨します。

リガンド結合の代表的な戦略は、カルボジイミド活性化によって媒介される、リガンドの第 1 アミノ基と磁気粒子の表面のカルボン酸基との間のアミド結合の形成です。カルボン酸とカルボジイミドとの間の反応の中間生成物は、非常に不安定で短時間で加水分解し、カルボキシル基を再生します。結合効率を強化するために、アジレントは N-ヒドロキシルホスホスクシンイミド (スルホ-NHS、Mw 217.1) の追加を推奨しています。N-ヒドロキシルスクシンイミド (NHS、Mw 115.1) などの他のコアクチベータに勝るスルホ-NHS の利点は、スルホン基のため、このエステルが水溶性を改善し、そのために修飾分子の安定性が向上することです。しかし、コアクチベータの使用は必ずしも、コスト意識や顧客の選り好みによるものではありません。アクチベータとして EDC のみを使用する場合は、Agilent EDC 媒介結合プロトコルを参照してください。

EDC/スルホ-NHS のタンパク質結合プロトコル

結合プロトコルの実施に必要な材料

- 0.1 M 水酸化ナトリウム (NaOH) バッファ
- 0.1 M MES (2-[モルホリノ]エタンサルホン酸)、pH 5
- EDC (1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド)
- スルホ-NHS (N-ヒドロキシルホスフィンイミド)。NHS (N-ヒドロキシルホスフィンイミド) をスルホ-NHS の代わりに使用することができます。しかし、効率を高めるに、アジレントはスルホ-NHS をコアクチベータとして使用することを強く推奨します。
- タンパク質溶液：LodeStars High Bind ビーズの場合は 3 mg/mL で、または LodeStars Original ビーズの場合は 2 mg/mL で MES pH 5 バッファを用いて調製した 1 mL のタンパク質
- 0.1 M トリズマ-HCl、EDC 活性化反応のクエンチング用
- リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)：0.1 M リン酸ナトリウム、pH 7.4 (長期保管用では、微生物の増殖を防ぐために 0.1 w% のアジ化ナトリウムの添加を推奨)
- PBS-Tween バッファ：0.1 M リン酸ナトリウム、pH 7.4、0.1 w% Tween-20
- ボルテックスミキサー
- ボトルローラー
- 適切なビーズ分散およびサイズ分布を得るためのソニックプローブ (オプションですがアジレントでは推奨)

結合プロトコルの開始前に

- バッファの有効期限を確認します (調合後 6 か月)。
- バッファおよび試薬が室温になるまで放置します。
- 容積が 250 mL 以上のボトルは 2 時間以上、250 mL 未満のボトルは 1 時間以上、ボトルローラーを使用してビーズを分散させます。分散が不均一な場合、複合化および凝集で使用されるビーズの量が不適切なものとなって、不完全な結合が生じる可能性があります。最適にビーズを分散させるために、室温で一晩 (~ 16 時間)、ビーズをローラーにかけることをアジレントは推奨します。

このプロセスの詳細は、こちらのチュートリアルビデオで説明しています。

手順

1. 50 mg の LodeStars ビーズを 10 mL の試験管に入れます。磁石内に試験管を配置してビーズを溶液から分離します。分離が完了したら、上澄みを吸引して、試験管を磁石から取り外します。

2. 7.5 mL の逆浸透 (RO) 水を試験管に追加し、ボルテックスミキサーを使用してビーズを再懸濁します。試験管を磁石内に配置し、磁気分離させて、上澄みを吸引します (洗浄ステップ)。水を用いてこのステップを 2 回繰り返します。
3. 混入物を除去して利用可能なカルボキシル基をプレコンディショニングするために、洗浄ステップ (ステップ 2) を NaOH バッファを用いて繰り返し、RO 水でさらに 3 回洗浄を繰り返してすべての微量の NaOH バッファを取り除きます。7.5 mL の 0.1 M MES pH 5 バッファで再懸濁して活性化の前にビーズをプレコンディショニングします。
4. 活性化溶液を調製します。200 mg の EDC と 100 mg のスルホ-NHS 試薬をこの順に計量して、2:1 の EDC:Sulfo-NHS の比で新しい試験管に入れます。次に、2 mL の 0.1 M MES pH 5 バッファを加えます。**注：**マイナスの影響を回避するために、活性化溶液は調製後 20 分以内にビーズに加える (ステップ 5) 必要があります。
5. ビーズを磁石内に配置し、磁気分離させた後、0.1 M MES pH 5 バッファを吸引します (ビーズは試験管に付着したままになるかもしれませんが、吸引された溶液は透明でなければなりません)。試験管を磁石から取り外し、すぐに 2 mL の活性化溶液を加えます。ビーズをボルテックスミキサーで再懸濁して、そのビーズを室温で 1 時間ローラーにかけます。
6. 磁石内に試験管を配置して活性化溶液を吸引します。ビーズを 0.1 M の MES pH 5 バッファで 2 回洗浄します。試験管を磁石から取り外して、ビーズを 1 mL の 0.1 M MES pH 5 バッファで再懸濁します。
7. 1 mL のタンパク質溶液をビーズに加えます (最適な結合のために、ステップ 6 と 7 を 30 分未満で実行する必要があります)。ビーズを室温で 1 時間ローラーにかけます。**注：**個々のアプリケーションに合う最適な性能を得るために、タンパク質濃度の滴定を推奨します。
 - LodeStars High Bind (LSHB) の場合：ストレプトアビジンの飽和濃度は 50 ~ 60 µg/mg (LSHB ビーズ 1 mg あたりのタンパク質の質量) で、IgG の飽和濃度は 45 ~ 55 µg/mg です。
 - LodeStars Original (LS) の場合：ストレプトアビジンの飽和濃度は 30 ~ 35 µg/mg (LS ビーズ 1 mg あたりのタンパク質の質量) で、IgG の飽和濃度は 20 ~ 30 µg/mg です。最適な条件を決定するためにタンパク質の滴定の一部として飽和濃度を含めることをアジレントは推奨しています。

8. 磁石内に試験管を配置してタンパク質溶液を吸引します。共有結合性のブロッキングを使用する場合は、この時点でブロッカーを加えてください。非結合 EDC/スルホ-NHS 基を不活性化するために、7.5 mL の 0.1 M トリズマ-HCl バッファを加え、ビーズを室温で 1 時間ローラーにかけます。
9. 磁石でビーズを溶液から分離し、0.1 M トリズマ-HCl バッファを吸引します。PBS-Tween バッファを用いて洗浄ステップ（ステップ 2）を繰り返した後、PBS バッファを用いて 2 回洗浄します。
10. **オプション：**得られたビーズのサイズ分布をコールターで測定します。最適に分散させ非特異的な結合を低減するには、低出力、低振幅にしたソニックプローブで短時間、ビーズを超音波処理して、タンパク質の加温と変性を回避します。適切なサイズ分布が達成されるまで、このプロセスを繰り返します。洗浄ステップ（ステップ 2）をもう一度繰り返して上澄み中のあらゆるタイプの遊離タンパク質を除去し、7.5 mL の PBS バッファでビーズを再懸濁します。このステップの後、結合能力特性解析（BCA アッセイ、B4F、ラベル化抗体）を実施することが可能です。
11. ビーズは 2 ~ 8 °C で保管します。長期保管する場合、保存剤の添加を推奨します。

アジレントの磁気ビーズに対応した特性解析手法

BCA テスト

ピシニコニン酸アッセイは、磁気ビーズに適切に結合した総タンパク質濃度を測定するために使用できる比色分析法です（非特異的結合と上澄みタンパク質が結果に影響を与える可能性があります）。

このアッセイは 2 つの化学反応に基づきます。このプロセスは、結合タンパク質のペプチド結合によって硫酸銅 (II) (試薬 B) 中の Cu^{2+} イオンが Cu^+ に還元されることから開始します。次に、このイオンが 2 分子のピシニコニン酸とキレート化し、この結果、562 nm 波長で光を吸収しかつタンパク質濃度に直接比例する紫色の錯体を形成します。

アッセイの実施に必要な材料と計算式

- Pierce BCA タンパク質アッセイキット（試薬 A および B）
- PBS バッファを用いて 2 mg/mL で調製された 500 μL のタンパク質
- 結合能力の特性解析アッセイ用のウォーターバス
- 96-ウェルで透明底の黒色マイクロプレート

試薬 A と試薬 B の量を mL 単位で計算するために、次の式を適用してください。

- a. **試薬 A (mL) :** (サンプル数 + 標準数) \times 4.2
- b. **試薬 B (mL) :** 試薬 A の量/50

アッセイプロトコル

1. 最近結合させたビーズを本アッセイを開始する前に 30 分以上ローラーにかけ、ウォーターバスを 37 °C で準備します。
2. 500 μL の 2 mg/mL タンパク質溶液を PBS バッファで調製します。この溶液は次の表の標準溶液の調製に使用します。

標準濃度 (ng/mL)	PBS バッファ量 (μL)	タンパク質溶液量 (μL)
0	250	0
200	225	25
400	200	50
600	175	75
800	150	100

3. Nalgene ボトル内で、試薬 A と試薬 B を混合して緑色の溶液を作成し、4 mL をそれぞれの 10 mL 試験管に入れます。
4. 200 μL の標準溶液とサンプルをそれぞれの 10 mL 試験管に加えます。ボルテックスミキサーを使用してサンプルおよび標準溶液を緑色の溶液と混合し、試験管をウォーターバス中に 30 分間配置します。
5. 色の変化が緩やかなるように試験管を冷水に入れて 1 分間クールダウンして、試験管を磁石に配置して磁気分離します。
6. 300 μL の着色溶液をマイクロプレートに 3 回ピペティングし、562 nm 波長で吸光を読み込みます。**注：**色は時間とともに変化するので、結合能力を正確に読み込むために、最短の時間でピペティングしてください。
7. 検量線をプロットし、傾き、切片、結合プロトコル時に行った希釈 (7.5 mL 中に 50 mg のビーズ) から結合能力を計算します。

品質特性を満たす製品

技術情報

仕様	LodeStars ビーズ	LodeStars High Bind ビーズ
内径	2.7 μm	2.7 μm
鉄含有量	～ 20 %	～ 20 %
カルボキシル結合容量		
BCA アッセイ*	～ 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ビーズ	～ 40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ビーズ

*アッセイ情報が必要な場合はお問い合わせください。

製品情報

説明	LodeStars ビーズ (30 mg/mL)		LodeStars High Bind ビーズ (50 mg/mL)	
LodeStars カルボキシルビーズ	2 mL	PL6727-0001	1 mL	PL6827-0001
	10 mL	PL6727-0003	10 mL	PL6827-0003
	100 mL	PL6727-0005	100 mL	PL6827-0005
	400 mL	PL6727-0006	400 mL	PL6827-0006
	800 mL	PL6727-0007		

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE97626214

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2022
Printed in Japan, June 30, 2022
5994-5012JAJP