

LodeStars カルボキシル磁気ビーズ EDC 媒介用の結合プロトコル（1 ステップ）

はじめに

下記に示すプロトコルは、表面にカルボキシルを持つ Agilent LodeStars 磁気ビーズに生体分子を正常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、生体分子の結合ステップについて記述していますが、アジレントはアプリケーションにおける性能を最大限に高めるために、さらなる最適化を推奨しています。

リガンド結合の代表的な手法は、リガンドの一級アミノ基と、カルボジイミド活性化が媒介している磁気粒子の表面にあるカルボン酸基の間にアミド結合を形成することです。

EDC タンパク質結合プロトコル

結合プロトコルの実行に必要な物質

- 0.1 M MES (2-[モルホリノ]エタンスルホン酸)、pH 5
 - 最適化の一環として、異なる pH 条件を検討可能
- 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)
- 逆浸透水または超純水
- 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
 - **ヒント:** 長期間保管する場合は、0.1 % w/v アジ化ナトリウムを添加して、微生物の発生を防止することを推奨します
- PBS-Tween バッファ (PBST) : 0.1 M リン酸ナトリウム、pH 7.4、0.1 % w/v Tween-20
- 2 mL 小型遠心管チューブ
- 磁気分離器
- 小型遠心管
- ボルテックスミキサー
- ボトルローラー

結合プロトコルの開始前

- バッファの有効期限の確認 (前処理以降 6 か月)。
- バッファと試薬の室温への到達。
- 容量が 250 mL を超える場合は最低 2 時間、少量の場合は 1 時間にわたり、ボトルローラーを用いてビーズを撈拌。均一に撈拌しないと、ビーズ同士が結合したり凝集したりして使用するビーズの量が不正確になり、結合が不十分になる場合があります。ビーズを最適に撈拌するために、アジレントはビーズを一晩 (約 16 時間) 室温で回転させることを推奨します。
- タンパク質溶液の前処理 : 0.1 M MES、pH 5.0、対象のタンパク質を適切な量だけ含む。LodeStars カルボキシルビーズについては、ストレプトアビジンの飽和濃度として LodeStars ビーズのタンパク質を 30 ~ 35 µg/mg とし、IgG を約 20 ~ 30 µg/mg にします。LodeStars High Bind カルボキシルビーズについては、ストレプトアビジンの飽和濃度として LodeStars High Bind ビーズのタンパク質を 50 ~ 60 µg/mg とし、IgG を約 45 ~ 55 µg/mg にします。

手順

1. 10 mg の LodeStars ビーズ (約 333 µL) または LodeStars High Bind ビーズ (約 200 µL) を、2 mL 小型遠心管チューブに移します。**注:** 分析証明書を参考にして、10 mg に必要な正確な容量を計算する必要があります。

2. チューブを磁石の中に置いて、溶液からビーズを分離します。分離が完了したら、上澄みを吸引した後、磁石の中からチューブを取り出します。
3. 1 mL の逆浸透 (RO) 水をチューブに添加し、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。チューブを磁石の中に置いて磁気分離してから、上澄みを吸引します (洗浄ステップ)。水を使用して、このステップを 2 回繰り返します。**ヒント:** ボルテックスで混合した後、遠心分離を使用することにより、チューブのふたからビーズを取り除くことができます (1,500 rpm で 5 秒未満)。
4. 1 mL の 0.1 M MES、pH 5.0 バッファを使用して、洗浄ステップを繰り返します。
5. 磁石からビーズの入ったチューブを取り出し、200 µL の 0.1 M MES、pH 5.0 バッファを添加します。
6. 200 µL の 3 mg/mL タンパク質溶液を添加します (飽和条件において 60 µg/mg)。ボルテックスミキサーを使用して、ビーズが溶液中で均一になるように静かに混ぜます。性能を最適化するために、タンパク質の量を滴定することを推奨します。
7. チューブをボトルローラー上に置き、ビーズを室温で 30 分間混ぜます。
8. EDC 活性化溶液を前処理します。15 mM の 原液用の 3.5 mL の 0.1 M MES、pH 5.0 バッファ中に、10 mg の EDC (N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N-エチルカルボジイミド塩酸塩、> およそ 98 % 純粋、分子量 191.7 g/mol) を溶解します。
 - **重要:** EDC は吸湿性が高く、水溶液中で迅速に加水分解されます。最適な結果を得るために、EDC 活性化溶液をサンプルに添加する直前に前処理した後、15 分間活性化したままにする必要があります。
9. 100 µL の EDC 活性化溶液を、400 µL のビーズおよびタンパク質撈拌溶液に添加します。チューブを 10 秒間ボルテックスし、そのチューブを室温で 1 時間ボトルローラー上に置きます。**注:** EDC 溶液はビーズに添加する前5分以内で作成してください。
 - 100 µL を、MES の 200 µL のタンパク質溶液および 200 µL のビーズに添加すると、3.0 mM 溶液が生成されます。これは出発点として使用する推奨濃度ですが、最適化の一環として、さらに広い EDC 濃度範囲を適用できます。
10. ステップ 3 と同様に、結合したビーズを洗浄します。つまり、1.5 mL の PBST バッファで 1 回、1.5 mL の PBS バッファで 2 回洗浄します。
11. 最適なバッファを使用してビーズを再懸濁し、フォローアップアプリケーションの前にチューブを最低 1 時間回転させます。2 ~ 8 °C で保管します。冷凍しないでください。

アジレントの磁気ビーズの特性解析手法

BCA 試験

ビスニコニン酸 (BCA) アッセイは比色アッセイであり、これを使用して磁気ビーズに正常に結合された総タンパク質濃度を測定できます (非特異的結合および上澄みタンパク質は、結果に影響する場合があります)。

このアッセイは、2 種類の化学反応に基づいています。結合したタンパク質のペプチド結合により、硫酸銅(II) (試薬 B) から Cu⁺ へと Cu²⁺ イオンが減少した際に、プロセスが開始されます。その後このイオンは、BCA の 2 つの分子とキレートすることにより、波長 562 nm の光を吸収する紫色の複合体を生成しますが、これはタンパク質濃度に正比例します。

アッセイを実行するのに必要な物質と計算

- Pierce BCA タンパク質アッセイキット (試薬 A および B)
 - 2 mg/mL の PBS バッファで前処理された 500 µL のタンパク質
 - 結合能力特性解析アッセイ実行用のウォーターバス
 - 96 ウェル透明底黒色マイクロプレート
 - 562 nm での吸光度読み取りが可能なマイクロプレートリーダー
- 必要な試薬 A および試薬 B の量を mL 単位で計算するには、次の式を適用する必要があります。
- a. **試薬 A (mL) :** (サンプル数 + 標準数) × 4.2
 - b. **試薬 B (mL) :** 試薬 A の量/50

アッセイプロトコル

- 1. このアッセイを開始する前に、直前に結合させたビーズを最低 30 分間転がし、ウォーターバスを 37 °C にして準備します。
- 2. PBS バッファ中で 500 µL の 2 mg/mL タンパク質溶液を前処理します。この溶液を使用して、標準溶液を次のように前処理します。

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

- 3. ナルゲンボトル中で試薬 A と試薬 B を混合し、別の 10 mL チューブで緑色の溶液 4 mL を生成します。
- 4. 別の 10 mL チューブに、200 µL の標準とサンプルを添加します。ボルテックスミキサーを使用して、サンプルと標準を緑色の溶液で混合し、チューブをウォーターバス内に 30 分間置きます。
- 5. チューブを冷水に沈め 1 分間冷却して色の変化の速度を落とし、チューブを磁石の中に置いて磁気分離します。
- 6. 300 µL の色付き溶液をマイクロプレートに 3 回ピペットで移し、波長 562 nm での吸光度を読み取ります。**注 :** 色は時間とともに引き続き変化するため、結合能力を正確に読み取るには、ピペッティングを最低の遅延時間で実行する必要があります。
- 7. 検量線をプロットし、傾き、切片、および結合プロトコルで使用した希釈液 (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 %
カルボキシル結合能力		
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

カスタマコンタクトセンタ

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。

DE23192985

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, January 24, 2023

5994-5456JAJP