

Latex Carboxyl 修飾粒子のための 結合プロトコル

概要

アジレントは、30年近くにわたりポリスチレンラテックス粒子を製造しており、Carboxyl ビーズ（大きなパーキングエリアと低い表面密度）および SuperCarboxyl ビーズ（小さいパーキングエリアと高い表面密度）という2種の主要なカルボキシル製品ラインに注力してきました。濁度や側方流動分析のようなアプリケーションでは、表面に生体分子を結合する必要があります。表面カルボキシル（COOH）基を有するラテックス粒子に生体分子をうまく結合させるためには、以下のプロトコルに従う必要があります。アプリケーションで最高の性能を得るために、これをさらに最適化することをアジレントは強く推奨します。

EDC/S-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

- 逆浸透 (RO) 水
- 0.1 M MES (2-[モルホリノ]エタンスルホン酸)、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) >98 % 純粋、分子量 191.7 g/mol
- S-NHS (N-ヒドロキシルホスホスチンイミド)。

注：NHS (N-ヒドロキシルホスチンイミド) をスルホ-NHS の代わりに使用することができる可能性があります。しかし、より効率を高めるために、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。

- 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
- タンパク質溶液：PBS バッファを用いて調製された 0.5 mL のタンパク質。

注：タンパク質量のタイトレーションを強く推奨します。推奨のスタート値は、ステップ 5 および表 2 を参照してください。

- 0.1 M トリズマ-HCl、EDC 活性化反応のクエンチング用
- ブロッキングバッファ：0.1 M ホウ酸ナトリウム (ホウ酸 + NaOH)、0.5 % Tween-20、pH 8.7
- 25 mM グリシン pH 8.2 バッファ (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)
- ボルテックスミキサ
- 遠心分離機
- ボトルローラ
- ラテックスを再分散し、適切な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)

始める前に

- ビーズはアプリケーションに応じた性能に非常に重要であるため、ラテックスビーズの選択について検討します。アプリケーションにおける最高の性能を評価するために、カルボキシルおよび SuperCarboxyl ビーズの両方を試験することを推奨します。
- バッファの有効期限を確認します (調合後 6 か月)
- 試薬が室温に達するまで待ちます (EDC は除く。必要なときに冷凍庫から取り出します)。
- 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 (約 16 時間)、ビーズをローラにかけることをアジレントは推奨します。

- PBS バッファに含まれるタンパク質の透析と濃度の測定は、事前に行う必要があります。

手順

1. 10 mg (0.1 mL) のラテックスビーズを 2 mL 透明 Eppendorf チューブに移します。
2. 1 mL の PBS バッファをビーズに添加し、ボルテックスミキサでラテックスと PBS バッファを 10 秒間混合します。ビーズが再分散したら、チューブを 15,000 rpm で遠心分離して溶液からラテックスを分離します (ラテックスサイズに基づく分離時間は表 1 を参照)。分離が完了したら、パストゥールピペットを使用して上澄みを取り除きます (洗浄ステップ)。

注：大量の場合は、イオン交換樹脂を使用して最初の洗浄を実行することができます。2 mL のラテックスビーズ (200 mg) を 400 mg のイオン交換樹脂と混合します。ビーズを 2 時間ローラにかけます。30 μ m ナイロンメッシュまたは 5 μ m PVDF フィルタを使用して樹脂をろ過します。このプロセスを適用した場合は、固形物を測定する必要があります。このステップはプロトコルの前日に実施することを推奨します。

表 1. 標準的な卓上小型遠心機、15,000 rpm (21,100 RCF) における、異なるビーズサイズのラテックスの回転時間。高い rpm を使用して、回転時間が低下させることができます。

ビーズサイズ (nm)	rpm (室温)	時間 (分)
100	15,000	60
200	15,000	20
400	15,000	10

3. 20 mg の EDC と 10 mg の S-NHS 試薬を計量して 15 mL チューブに (記載の順に、EDC:S-NHS が 2 : 1 の比で) 入れ、10 mL の 0.1 M MES pH 5 バッファ (活性化溶液) を添加します。ヒント：ビーズが遠心分離機に入っている間に EDC と S-NHS 試薬を計量しますが、EDC の加水分解を防ぐために、PBS の吸引が完了するまで MES pH 5 バッファは添加しません。
4. ラテックスから PBS バッファを吸引したら、すぐに 10 μ L の活性化溶液を添加し、次に 500 μ L の RO 水を添加します。ボルテックスミキサでビーズを 20 秒間混合するか、必要な場合は、ビーズが再分散されるまでチューブを超音波処理します。ビーズを室温で 20 分間ローラにかけます。

注：最適な活性化を得るために、このステップは 5 分以内に完了させる必要があります。

- 500 μL のタンパク質溶液（ラテックスサイズに基づく推奨のタンパク質量は表 2 を参照）をビーズとアクチベータの混合物に添加します。ビーズを室温で 45 分間ローラーにかけます。

表 2. 異なるラテックスサイズに推奨のタンパク質量

ビーズサイズ (nm)	タンパク質の濃度 (mg/mL)	タンパク質量 (μg/mg ビーズ)
100	0.8	40
200	0.5	25
400	0.3	15

注：これらの EDC/S-NHS 量とタンパク質の濃度は CRP タンパク質に基づき最適化されています。これは、最大の結合能力を獲得し、アッセイ性能を妨げる重合やビーズの凝集を回避するためです。この最適化プロセス中に、PBS バッファにより、ビーズの凝集と、それに続く培地へのラテックスビーズの沈殿が促進されることが観察されました。コロイド安定性の低下を防ぐために、このステップの後は PBS 含有バッファを回避することを強く推奨します。他のタンパク質がビーズと結合した場合、最適なアッセイ性能を得るために、タンパク質量のタイトレーションを行う必要があります。

- 非結合活性化カルボキシル基を不活性化するために、50 μL の Trizma-HCl バッファをラテックス混合物に添加し、ビーズを 10 分間ローラーにかけます。
- チューブを 15 分間遠心分離し、上澄みを吸引し、ビーズに 1 mL のブロッキングバッファを添加します。
- 低振幅にしたソニックプローブで 30 秒間、サンプルを超音波処理します。再分散できない場合は、ビーズが凝集しなくなるまでプロセスを繰り返します。サンプルをアイスバス内に置き、温まるのを防ぎます。
- ビーズを室温で一晩にわたりローラーにかけます。
- チューブを遠心分離し、上澄みを分離して吸引します。
- ステップ 2 に示されているように、ビーズを 1 mL のグリシンバッファで洗浄します。
- 1 mL のグリシンバッファでビーズを再懸濁し、サンプルを 3 日間にわたり 37 °C で熱処理します。

注：今回は最適化する必要があります。

- チューブを遠心分離し、上澄みを分離して吸引し、1 mL のグリシンバッファでビーズを再懸濁します。任意のアッセイでサンプルを使用する前に、ビーズを 1 時間以上ローラーにかけます。
- ビーズは 2 ~ 8 °C で保管します。長期保管する場合は、微生物の発生を防ぐための保存剤として、0.1 w% のアジ化ナトリウムの添加を推奨します。

パーキングエリアの定義

パーキングエリア (PA) : 1 つの COOH 基が占める領域 (図 1 を参照)。

表面電荷密度 (SCD) : ビーズの表面に存在する官能基の量 (図 1 を参照)。

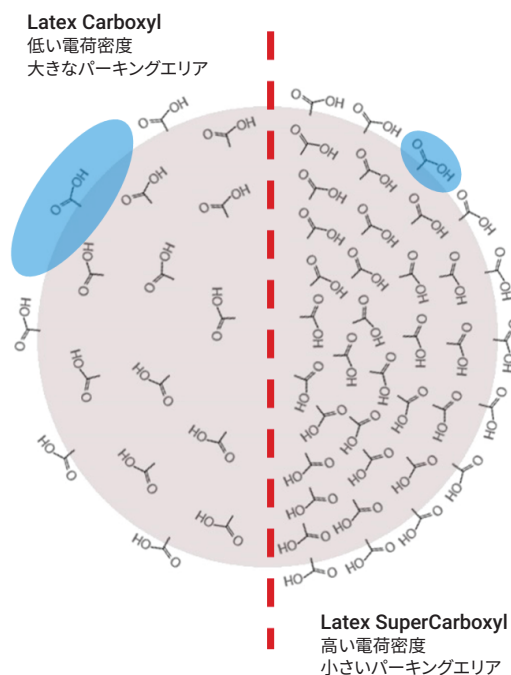


図 1. Latex Carboxyl と SuperCarboxyl ビーズのパーキングエリアを示した図

表面電荷密度 (SCD) は通常、ビーズ表面に存在する COOH 基を塩基で滴定することで測定します。粒子の直径 (D) と密度 (ρ) を使用してこの測定を行ったら、次の式 (式 1) を使用してパーキングエリアを計算できます：

$$PA (\text{\AA}^2/\text{荷電基}) = \frac{1}{1.004 \times D (\mu\text{m}) \times \rho (\text{g/L}) \times \text{SCD} (\text{meq./g})}$$

式 1. パーキングエリアの式

製品情報

カルボキシル修飾製品

Latex Carboxyl White ビーズ	15 mL	100 mL	1 L
100 nm 固体粒子 10 %	PL6101-6101	PL6101-6102	PL6101-6103
150 nm 固体粒子 10 %	PL6115-6101	PL6115-6102	PL6115-6103
200 nm 固体粒子 10 %	PL6102-6101	PL6102-6102	PL6102-6103
300 nm 固体粒子 10 %	PL6103-6101	PL6103-6102	PL6103-6103
400 nm 固体粒子 10 %	PL6104-6101	PL6104-6102	PL6104-6103

Latex SuperCarboxyl White ビーズ	15 mL	100 mL	1 L
50 nm 固体粒子 10 %	PL6200-6101	PL6200-6102	PL6200-6103
100 nm 固体粒子 10 %	PL6201-6101	PL6201-6102	PL6201-6103
125 nm 固体粒子 10 %	PL6212-5101	PL6212-5102	PL6212-5103
150 nm 固体粒子 10 %	PL6215-6101	PL6215-6102	PL6215-6103
200 nm 固体粒子 10 %	PL6202-6101	PL6202-6102	PL6202-6103
300 nm 固体粒子 10 %	PL6203-6101	PL6203-6102	PL6203-6103
400 nm 固体粒子 10 %	PL6204-6101	PL6204-6102	PL6204-6103

Latex Carboxyl HiDye ビーズ	15 mL	100 mL	1 L
青			
200 nm 固体粒子 10 %		ご要望に応じて提供	
300 nm 固体粒子 10 %		ご要望に応じて提供	
400 nm 固体粒子 10 %		ご要望に応じて提供	
800 nm 固体粒子 10 %		ご要望に応じて提供	
紫			
300 nm 固体粒子 10 %		ご要望に応じて提供	
赤			
200 nm 固体粒子 10 %		ご要望に応じて提供	
300 nm 固体粒子 10 %		ご要望に応じて提供	
400 nm 固体粒子 10 %		ご要望に応じて提供	
600 nm 固体粒子 10 %		ご要望に応じて提供	
緑			
300 nm 固体粒子 10 %		ご要望に応じて提供	
青			
400 nm 固体粒子 10 %	PL6104-6121	PL6104-6122	
赤			
400 nm 固体粒子 10 %	PL6104-6141	PL6104-6142	

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いません。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。

DE12431428

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, February 28, 2023

5994-5673JAJP