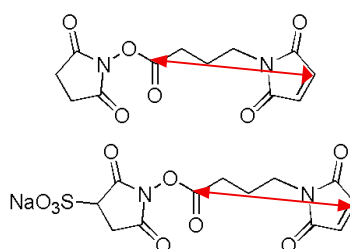


**GMBS** [code: G005]  
CAS No. 80307-12-6  
molecular weight: 280.23  
spacer length: 6.9 Å

**Sulfo-GMBS** [code: S025]  
CAS No. 185332-92-7  
molecular weight: 382.28  
spacer length: 6.9 Å



## はじめに

クロスリンカー (架橋剤) は2つの官能基を有する試薬でその名のとおり2つの分子/構造体を結合する化合物であり、イムノアッセイに用いられる酵素と抗体の結合体の作成やタンパク質修飾等に広く用いられている。GMBSはクロスリンカーの1つであり、一級アミノ基 (-NH<sub>2</sub>) と反応する NHS エステル基と、チオール基 (-SH) と反応するマレイミド基を有している。例えば、ペルオキシダーゼ (POD) 等の酵素のアミノ基と GMBS を反応させ、その後、SH 基を有する Fab' と反応させることにより、酵素標識抗体を作製することができる。その他、BSA (bovine serum albumin) や KLH (keyhole limpet hemocyanin) と GMBS を反応させ、その後 SH 基を持つハプテンと反応させることにより、ハプテン-キャリアタンパク質複合体を作製することも可能である。また、基板への分子の固定化にも用いられている。Sulfo-GMBS はスルホン酸基を有する活性エステル基が導入されているため、試薬を溶解するための DMF や DMSO など有機溶媒を用いることなく標識反応を行うことが可能である。

目的別の実験例や参考文献はこちら⇒

同仁化学 cross-linking **検索**



## 保存条件

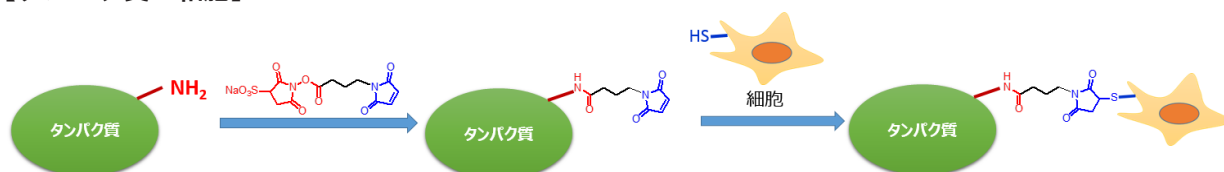
0 - 5 °Cにて保存してください。  
・ GMBS、Sulfo-GMBS を溶解した溶液は保存できません。用時調製でご使用ください。

## 必要なもの

- マイクロピペット (10 µl, 200 µl)
- マイクロチューブ
- 精製用ゲルなど
- 有機溶媒 (dimethylsulfoxide など)
- 反应用緩衝液 (PBS など)
- インキュベーター

## 複合体の作製例

## 【タンパク質-細胞】



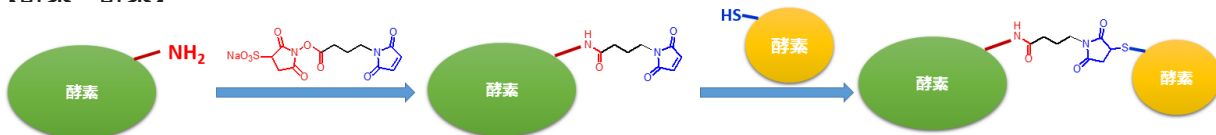
## ① Staphylococcal enterotoxins B (SEB) を Sulfo-GMBS によりマレイミド化する

1. SEB (220 µg/220 µl, Sigma) と PBS で溶解した Sulfo-GMBS (30 µl ; 1.5 mg/ml) を 30°Cの水浴で 70 分間穏やかに攪拌しながら反応させる。
2. 上記反応液を等量に分割し、フィルトレーションチューブ (Ultrafree C3 plus; Mr=10,000; Millipore 製) に移し、0.7 ml の PBS を加え、遠心分離 (130 分、3000 x g) し、過剰の Sulfo-GMBS を除去する。
3. ろ液を捨て、0.7 ml の PBS を加え、再度、遠心分離 (130 分、3000 x g) する。
4. 濃縮した反応液を PBS 0.3 ml で回収する。(maleimide 化 SEB)

## ② maleimide 化 SEB と細胞 (Meth A 細胞) をつなぐ。

1. マイトマイシン C で処理した Meth A 細胞の懸濁液 (2.2×10<sup>7</sup> cells) を遠沈管に入れ、遠心分離し、上清を除去する。
2. 細胞ペレットに maleimide 化 SEB を 0.3 ml 加え、良く懸濁し、30°Cの水浴で 80 分間穏やかに攪拌しながら反応させる。
3. 2 ml の PBS を加え、細胞懸濁液を遠心分離し、上清を除去した後、7.5 ml の PBS で二回遠心分離し、Meth A 細胞を洗浄する。

## 【酵素-酵素】



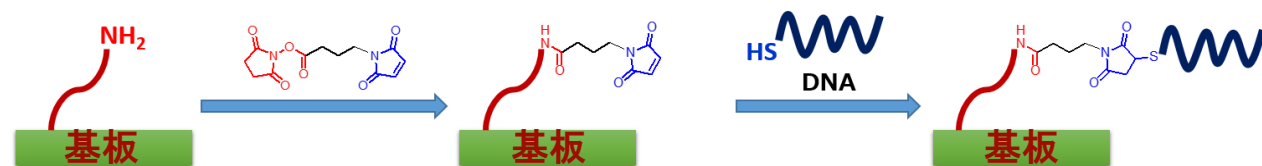
### ① PSI complex, subunit IV (PsaE) を Sulfo-GMBS によりマレイミド化する

1. 50 mmol/l ホウ酸塩緩衝液 (5 mmol/l EDTA、20% スクロース、pH7.6) 中で、Sulfo-GMBS (5 mmol/l) と PsaE (100 μmol/l) を 4°C で 2 時間反応する。(GMBS-PsaE)
2. PBS (5 mmol/l EDTA、20% スクロース) で、ゲルろ過し、Sulfo-GMBS を除く。

### ② maleimide 化 PsaE と cytochrome c<sub>3</sub> (cytc<sub>3</sub>) をつなぐ。

1. 調製した 100 μmol/l GMBS-PsaE 4 ml を、アルゴンガスで脱気しながら、脱気した 50 μmol/l cytc<sub>3</sub> を含む PBS (2 mmol/l TCEP、20% スクロース、5 mmol/l EDTA) 7 ml を加え、それを 4°C にて終夜で攪拌する。
2. PBS (20% スクロース、pH6.8) を用い、0 ~ 500 mmol/l NaCl のグラジュエントをかけた陽イオン交換カラムで精製する。
3. 抽出されたタンパク質を 50 mmol/l Tris-HCl (500 mmol/l NaCl、10% スクロース、pH7.6) でゲルろ過した。得られた溶液を 50 mmol/l Tris-HCl (500 mmol/l NaCl、10% スクロース、pH7.6) で Ni-NTA カラムで精製した。
4. 0 ~ 500 mmol/l のイミダゾールのグラジュエントをかけて溶出させた後、50 mmol/l Tris-HCl (100 mmol/l NaCl、pH7.3) で、ゲルろ過精製する。

## 【アミノ基修飾基板-DNA】



### ① アミノ基修飾基板を GMBS によりマレイミド化する

1. TFT (薄膜トランジスタ) 光センサー基板に酸素プラズマを流速 40 ml/min で 40 秒間当てる。
2. プラズマ処理した光センサー基板を 30 秒間、1% APTES (γ-アミノプロピルトリエトキシシラン) トルエン溶液に浸し洗浄する。その後、10 分間 110°C で処理する。
3. 表面をアミノ化した光センサー基板を 1 mmol/l GMBS エタノール溶液へ 60 分間室温で浸漬させる。

### ② maleimide 化した基板と DNA をつなぐ

1. エタノールで基板を洗浄後、DMSO で溶解したチオール化オリゴヌクレオチド溶液をインクジェットディスペンサーにて光センサー基板へ滴下する。
2. 滴下後、光センサー基板を室温、湿度 65% で 60 分間インキュベートする。

## 参考文献

### 【小社の GMBS、Sulfo-GMBS を用い、複合体を作製した使用例】

詳細な実験条件につきましては該当する参考文献をご覧ください。

複合体の種類	GMBS の反応対象物		文献番号
	NH <sub>2</sub> 基	SH 基	
タンパク質 - 細胞	Staphylococcal enterotoxins B	Meth A 細胞	1)
タンパク質 - タンパク質	PSI complex, subunit IV (PsaE)	cytochrome c3	2)
アミノ基修飾基板 -DNA オリゴマー	アミノシランをコートした TFT 基板	DNA (5' チオール修飾)	3)

- 1) M. Shimizu *et al.*, *Mol. Biotechnol.*, **2003**, 25(1), 89.
- 2) M. Ihara *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, **2006**, 82(6), 1677.
- 3) K. Hatakeyama *et al.*, *Lab Chip*, **2009**, 9, 1052.

## FAQ

Q: EMCS、Sulfo-EMCS の使用条件を教えてください。

A: 活性エステルと反応対象物のアミノ基との反応は、弱アルカリ条件 (pH7 ~ 9) で行ってください。その後の還元や他のチオールとの置換反応は中性条件で行ってください。

ご質問・ご要望は小社カスタマーサポート (フリーダイヤル: 0120-489548) までお問い合わせください。

## 関連製品

### ○クロスリンカー試薬

製品名	製品コード	容量	距離 (Å)
EMCS	E018	50 mg	9.4
		100 mg	
GMBS	G005	50 mg	6.9
		100 mg	
HMCS	H257	50 mg	13.0
KMUS	K214	50 mg	16.7
DSP	D629	1 g	8.5
SPDP	S291	100 mg	4.1

### ○水溶性クロスリンカー試薬 (有機溶媒使用不可の実験系向け)

製品名	製品コード	容量	距離 (Å)
Sulfo-EMCS	S024	50 mg	9.4
Sulfo-GMBS	S025	50 mg	6.9
Sulfo-HMCS	S026	50 mg	13.0
Sulfo-KMUS	S250	50 mg	16.7
Sulfo-SMCC	S330	50 mg	8.0
BS3	B574	50 mg	8.9
DTSSP	D630	50 mg	8.5
Sulfo-AC5-SPDP	S359	50 mg	12.6