

## はじめに

QCM (Quartz Crystal Microbalance) や SPR (Surface Plasmon Resonance) 等の基板に SAMs を形成し、タンパク質を固定化する方法のひとつに、 $\text{Ni}^{2+}$  配位 NTA (nickel-chelated nitrilotriacetic acid) を用い、そこへヒスチジンを付加したタンパク質 (His-tag タンパク質) を固定化する方法があります。

タンパク質固定化法には、他にも、末端にカルボキシル基を有する SAM を用いる方法や、ビオチン化 SAM を用いてビオチン-アビジン法で結合する方法があります。それらと比べて、His-tag タンパク質固定化法の利点として、① His-tag を介してタンパク質を固定化するためタンパク質が変性しにくいこと、② His-tag と Ni-NTA 間の相互作用をイミダゾールや EDTA など で解消することでタンパク質を外すことができ、基板の再利用が可能であること、の2点があげられます。

本製品は、一定量のエタノールに溶解させるだけで、金基板上に簡単に NTA-SAM を作製するための溶液を調製することができ、形成された Ni-NTA-SAM は、His-tag タンパク質を効率的に固定化することが可能です。

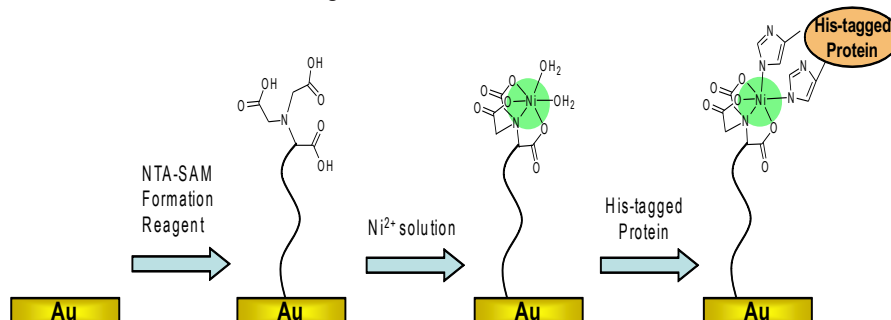


図 1 NTA-SAM Formation Reagent を用いたバイオセンサー作成の模式図

内容 3本

## 使用上の注意

内容物は白色から淡黄色固体で微量のため、確認しづらい場合がございます。  
輸送中の振動等により、内容物がチューブ壁面やキャップ裏面に付着している場合がありますので、遠心してからご使用ください。

## 保存条件

0 ~ 5°C で保存してください。

NTA-SAM  
調製法

- 1) 本試薬1チューブにエタノール1 ml を添加してピペッティングにより溶解し、2 mmol/l NTA-SAM 溶液とする<sup>a)</sup>。さらに、この溶液をエタノールで10倍希釈し、操作2) に使用する。
- 2) Piranha 溶液<sup>b)</sup> 等で洗浄した金基板を、操作1) で調製した溶液に浸漬し、終夜室温で静置する。
- 3) この基板をエタノール、超純水の順で数回洗浄する<sup>c)</sup>。

- a) 溶解しにくい場合は、超音波照射あるいはボルテックスにかけて溶解してください。エタノール溶解後はすぐにご使用ください。  
b) 濃硫酸：過酸化水素水 = 3 : 1 の混合溶液です。腐食性が非常に強いので、取り扱いには十分ご注意ください。  
c) 作製した NTA-SAM 基板は、密閉性の高いガラス瓶等に入れ、窒素置換して冷蔵 (0 ~ 5°C) にて保存してください。

## 実験例

## -QCM 基板上への His-tag 化タンパク質の固定化 -

- 1) 本試薬を用いて NTA-SAM を形成した基板 (QCM 用) を 1 mmol/l NaOH 溶液で洗浄した。
- 2) 40 mmol/l  $\text{NiSO}_4$  \* 水溶液に室温で1時間浸漬したあと、基板を 150 mmol/l NaCl 溶液で洗浄した。
- 3) 基板を QCM に装着し、HBS (10 mmol/l HEPES-buffered saline, pH7.5) 450  $\mu\text{l}$  を添加して約 30 分間平衡化した。
- 4) 平衡化後、5 mg/ml His-tag 化 Protein A の HBS 溶液を 10  $\mu\text{l}$  添加し、振動数変化を測定した。

\*  $\text{NiSO}_4$  は本製品に含まれておりません。

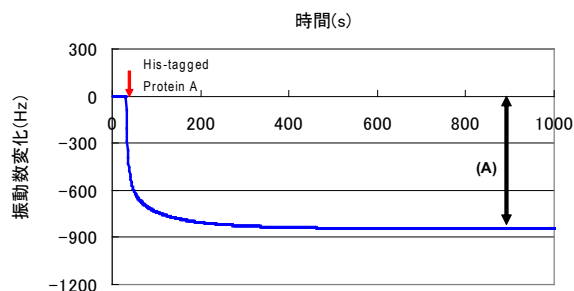


図 2 Ni-NTA への His-tag 化 Protein A の結合 (A)

(A) Ni-NTA-SAM 表面への His-tag 化 Protein A の結合により、振動数に変化が生じた。

- SPR 基板上への His-tag 化タンパク質の固定化および性能確認 -

- 1) 本試薬を用いて NTA-SAM 表面を作製した基板 (SPR 用) を SPR に装着し、0.05% Tween 20 含有 HBS を流速 0.1 ml/min で約 30 分間通液した。
  - 2) 40 mmol/l  $\text{NiSO}_4$  ※水溶液を 5 分間通液した後、0.05% Tween 20 含有 HBS (10 mmol/l HEPES-buffered saline, pH7.5) を通液し置換した。
  - 3) 0.1 mg/ml His-tag 化 Protein A の 0.05% Tween 20 含有 HBS 溶液を 1 分間通液し、Ni-NTA 表面への His-tag 化 Protein A の固定化量を測定した。その後、0.05% Tween 20 含有 HBS を通液し置換した。
  - 4) 0.1 mg/ml Rabbit IgG の 0.05% Tween 20 含有 HBS 溶液を 1 分間通液し、His-tag 化 Protein A への Rabbit IgG の固定化量を測定した。その後、0.05% Tween 20 含有 HBS を通液し置換した。
- ※  $\text{NiSO}_4$  は本製品に含まれておりません。

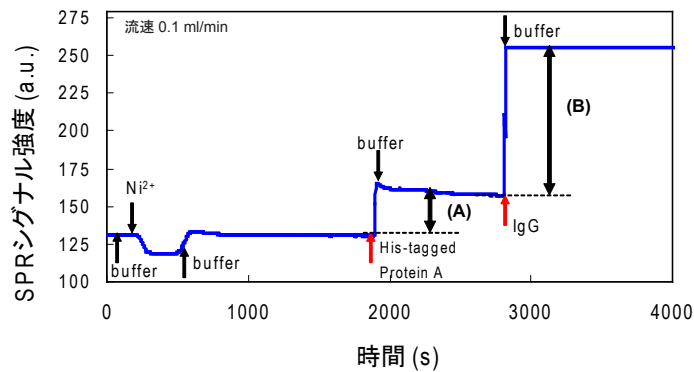


図 3 Ni-NTA と His-tag 化 Protein A の結合 (A) および His-tag 化 Protein A と IgG の結合 (B)

- (A) Ni-NTA-SAM 表面への His-tag 化 Protein A の結合により、シグナルが上昇した。  
(B) His-tag 化 Protein A への Rabbit IgG の固定化により、シグナルが上昇した。