



販売中止のお知らせ

お客様各位

いつも小社製品をご愛顧頂きありがとうございます。

2020年2月1日より下記製品は販売中止となりますため、

本冊子に記載の製品に関してご注意頂きますようよろしくお願い申し上げます。

販売中止品目

製品コード	製品名	容量
D538	Dithiobis(succinimidyl octanoate)	10 mg
D538	Dithiobis(succinimidyl octanoate)	50 mg
D539	Dithiobis(succinimidyl hexanoate)	50 mg
H257	HMCS	50 mg
H337	11-Hydroxy-1-undecanethiol	100 mg
H338	8-Hydroxy-1-octanethiol	100 mg
H339	6-Hydroxy-1-hexanethiol	100 mg
H394	16-Hydroxy-1-hexadecanethiol	100 mg

ご不明点等がございましたら、小社カスタマーサポートまでお問い合わせ下さい。フ

リーダイヤル 0120-489548

Self-assembled monolayers(SAMs) プロトコル

～ Biacore™ を用いたバイオセンシングへの応用～

1. はじめに

Biacore™ は生命科学や創薬分野の分子間相互作用解析に最も利用されている表面プラズモン共鳴 (SPR) センサである。金基板上にカルボキシメチルデキストランゲルが塗布されているセンサチップを用いて、各種のリガンドを固定することが可能である。

一方、デキストランゲルの塗布されていないセンサチップも販売されており、自身で SAM を形成すれば様々な方法で様々なリガンドを固定化できる。デキストランゲルは 100 nm 程度の厚さを有しているのに比べ、SAM は 1 ～ 5 nm ほどの厚みしかない。表面プラズモンは基板からの距離が遠くなるほど減衰することから、系によっては SAM を用いた方がより高感度なセンサチップを作製することも可能である。

ここでは、GE Healthcare 社の SIA Kit Au を用いて SAM 修飾チップを作製し、Biacore™ 2000 でバイオセンシングに応用した例を紹介する。

2. SAM 作製手順 (図 2)

- (1) SIA Kit Au に含まれる未修飾金基板 (10 枚入り) を容器より取り出す。
- (2) Piranha 溶液 (濃硫酸 : 30% 過酸化水素水 = 3 : 1) に 10 分間浸漬し、付着している有機物を分解する。
- (3) 純水で良く洗浄する。
- (4) SAMs 試薬の 0.1 mmol/l エタノール溶液に、金基板を 1 時間浸漬し、SAM を作製する。
- (5) エタノール、純水の順に金表面を洗浄する。
- (6) 窒素等で風乾し、SIA Kit Au のセンサシートに金基板を貼りつける。

3. カルボキシル基末端 SAM への GST の固定化と抗 GST 抗体の検出

カルボン酸末端 SAM を WSC/NHS で活性化し、種々の pH の buffer 中でグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を固定化し、Anti-GST IgG を検出した例を紹介する。

Biacore™ 2000 の 4 本のフローセルの Fc 1 をコントロールとし、Fc 2-4 で pH を変え、GST を固定化した。

< 使用した SAMs 試薬 >

- 30% Carboxy-EG₆-undecanethiol [C445]
- 70% Hydroxy-EG₃-undecanethiol [H354]

< GST 固定センサ作製 >

- (1) SAM 修飾センサを装置 (Biacore™ 2000) にセットし、プライムで流路を PBS に置換する。
- (2) Serial flow (Fc 1-4) とし、流速を 30 μ l/min にセットし、100 mmol/l HCl 20 μ l、10 mmol/l NaOH 20 μ l、100 mmol/l HCl 20 μ l で順に洗浄する。
- (3) 流速を 10 μ l/min にセットし、WSC/NHS (それぞれ 100 mmol/l in water) 100 μ l を添加、反応する (10 分)。
- (4) Independent flow とし、Fc 4 に GST 25 μ g/ml in Acetate buffer (50 mmol/l, pH 5.5) 100 μ l を添加、反応する (10 分)。
- (5) Fc 3 に GST 25 μ g/ml in Acetate buffer (50 mmol/l, pH 4.8) 100 μ l 添加、反応する (10 分)。
- (6) Fc 2 に GST 25 μ g/ml in Acetate buffer (50 mmol/l, pH 4.2) 100 μ l 添加、反応する (10 分)。
- (7) Serial flow (Fc 1-4) とし、Blocking buffer^{*1} 100 μ l を添加、反応し、残った活性エステルをブロッキングする (10 分)。
- (8) 流速を 30 μ l/min にセットし、100 mmol/l HCl 20 μ l で洗浄する。

< Anti-GST IgG の検出 >

- (1) Anti-GST IgG 1 μ g/ml 60 μ l を添加、検出する (2 分)。
- (2) 100 mmol/l HCl 20 μ l で洗浄する。
- (3) Anti-GST IgG 5 μ g/ml 60 μ l を添加、検出する (2 分)。
- (4) 100 mmol/l HCl 20 μ l で洗浄する。
- (5) Anti-GST IgG 25 μ g/ml 60 μ l を添加、検出する (2 分)。
- (6) 100 mmol/l HCl 20 μ l で洗浄する。

*1: Blocking buffer は小社 Amine Coupling Kit のものを使用した。アミノエタノール溶液などで代替できる。

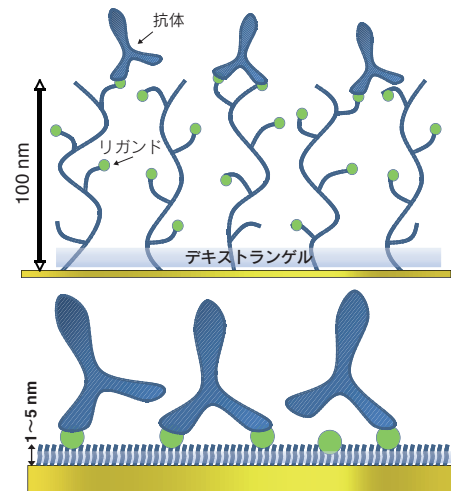


図 1 デキストランゲル (上) と SAM (下) のセンサチップの模式図

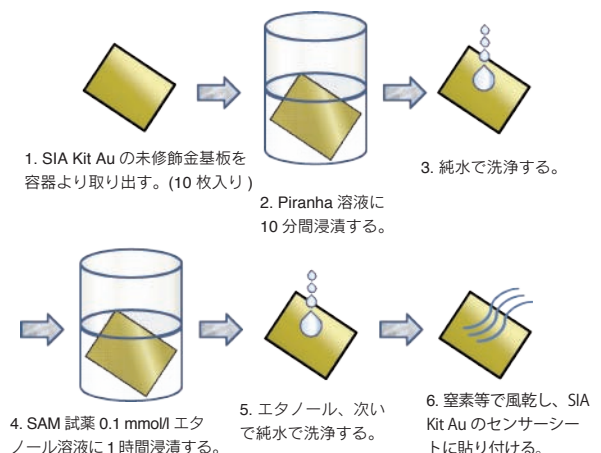


図 2 SAM 修飾センサチップの作製法

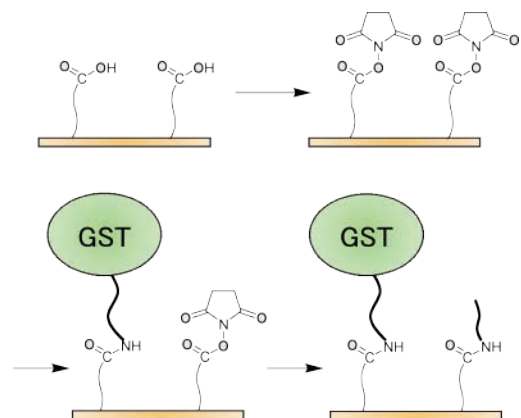


図 3 カルボキシル基の活性化と GST の固定化の模式図

< 結果 >

図 4 に pH4.8 の酢酸緩衝液中で GST を固定化したときの Anti-GST IgG 検出のセンサグラムを示した。濃度に応じて IgG のシグナルが検出された。

図 5 には IgG 濃度 25 $\mu\text{g/ml}$ で検出した際の、反応 pH 毎の感度比較を示した。比較のため同様の条件でデキストランゲル (CM5) を用いたときのデータも併せて示した。SAM で作製したセンサでは pH4.8、CM5 では pH4.2 で最も感度が高く、両者を比較すると SAM の方が CM5 よりも約 2 倍高感度であった。

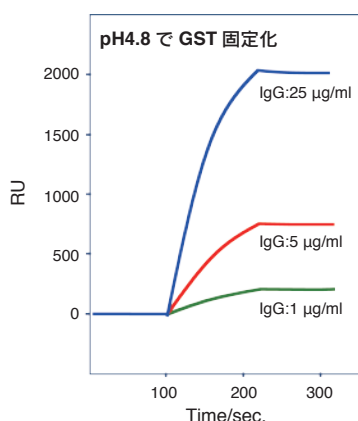


図 4 SAM 修飾金基板を用いて作製した GST 固定化チップによる Anti-GST IgG の検出。コントロールを差し引いたセンサグラム。

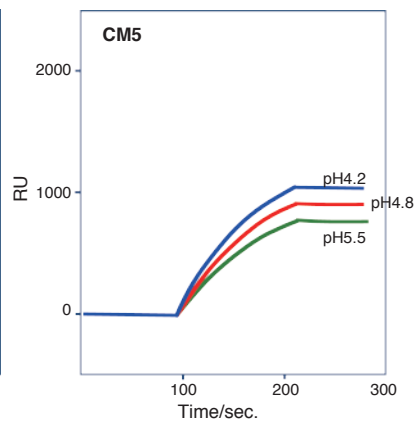
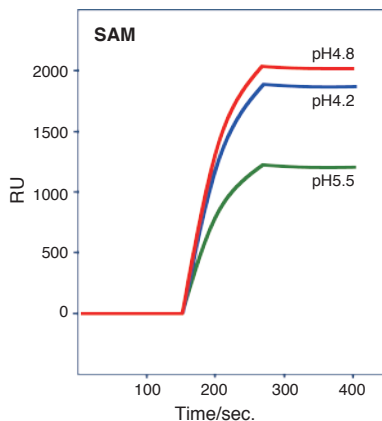


図 5 SAM 修飾金基板及び CM5 を用いて作製した GST 固定化チップによる Anti-GST IgG (25 $\mu\text{g/ml}$) の検出。固定化緩衝液の pH により、感度への影響が見られる。コントロールを差し引いたセンサグラム。

< ポイント 1 > 反応 pH の選択

カルボキシル基を有する基板にタンパク質を固定化する場合、カルボキシル基を WSC/NHS で活性化し活性エステルとした後、タンパク質のアミノ基と反応するが、反応の際の緩衝液の pH が非常に重要となる。アミノ基とカルボキシル基の反応は通常 pH8 ~ 9 の弱アルカリ性で行われるが、基板にタンパク質を固定化するには弱酸性の方がより固定化量が大きくなる。一般的には固定化するタンパク質の等電点 (pI) よりも 1 小さい pH の緩衝液を使用すると良いと言われている。

タンパク質はカルボキシル基とアミノ基を有しており pH によりそれぞれのプロトン (H^+) の解離状態が変化する。等電点よりも酸性側ではプラスに荷電し、アルカリ側ではマイナスに荷電する。一方、基板はカルボキシル基のみなので、pH によりマイナス電荷の密度が変化することになる (図 6)。

カルボキシル基を有する基板にタンパク質を固定化する場合に弱酸性中で行うと、タンパク質がプラス、基板がマイナス電荷を帯びているため、静電引力により基板近くにタンパク質が濃縮される。アミノ基の反応性は弱アルカリ性中よりも低いが、濃縮効果によりより多くのタンパク質が固定化される。一方、弱アルカリ性で反応すると、基板もタンパク質もマイナス電荷を帯びており、静電反発により反応が起こり難くなる (図 7)。

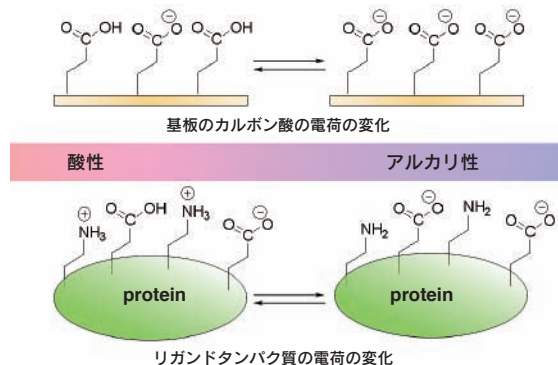


図 6 pH による基板、タンパク質の電荷の変化

< ポイント 2 > SAMs 試薬の選択

一般的に、疎水的な表面はタンパク質を吸着し易く、親水的な表面ほどタンパク質の非特異吸着は抑えられる。オリゴエチレングリコール (-EG₆OH) は、水酸基 (-OH) とアミド (-CONH₂) の中間の極性を有するが、その極性以上に、非特異的な吸着が抑えられることが報告されている。これは、オリゴエチレングリコール鎖の立体斥力の効果であると考えられており、非特異的な吸着の少ないセンサの作製に有効である。そのため SAMs を用いたバイオセンサの作製にはオリゴエチレングリコール含有アルカンチオール類が頻用されている。しかしながら、カルボキシル基末端の誘導体を単独で用いると静電的な相互作用による非特異吸着が起こり易くなることから、電荷を有しない末端水酸基のオリゴエチレングリコール含有アルカンチオールとの混合 SAM として良く用いられている。

タンパク質を固定化する場合、非特異結合の抑制と基板の電荷による濃縮効果の両方を加味する必要がある。カルボキシル基の比率を低くしすぎると濃縮効果が得られず、カルボキシル基の比率を高くしすぎると非特異結合が大きくなる。

これらを考慮し、ここではカルボキシル基の比率を 30% としている。

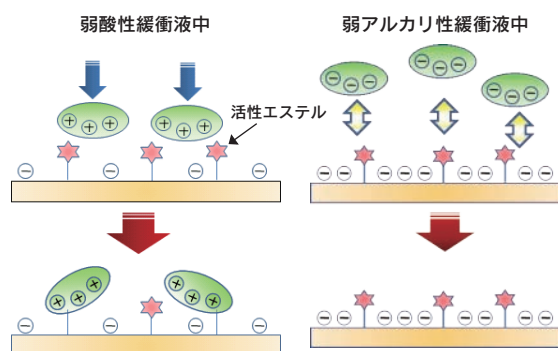


図 7 基板へのタンパク質の固定化の模式図

4. Biotin 末端 SAM への抗 GST 抗体の固定化と GST 検出

ビオチン・アビジン法は、迅速且つ強固にタンパク質等を固定化する手法であり、酵素免疫法などで汎用されている。ビオチン末端 SAM 上にアビジン類を固定化することで、ビオチン化された抗体やペプチド、DNA 等を簡便にセンサ基板に固定化することが可能である。小社ではアビジン類を効率的に固定化できるよう最適化し、使いやすいよう小分けした Biotin-SAM Formation Reagent を販売している。ここでは、本試薬を用いた抗 GST 抗体の固定化と、それを用いた GST の検出について紹介する。

< 使用した SAMs 試薬 >

Biotin-SAM Formation Reagent [B564]

< IgG 固定センサ作製 >

- (1) 2. の手順で作製した SAM 修飾センサを装置 (Biacore™ 2000) にセットし、プライムで流路を PBS に置換する。
- (2) Serial flow (Fc 1-2) とし、流速を 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ にセットし、10 mmol/l NaOH, 1 mol/l NaCl 10 μl で 3 回洗浄する。
- (3) 流速を 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ にセットし、Streptavidin (SA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) 100 μl を添加、固定化する (10 分)。
- (4) 10 mmol/l NaOH, 1 mol/l NaCl 10 μl で 3 回洗浄する。
- (5) Independent flow とし、Fc 2 に Biotinylated anti-GST IgG (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) 100 μl を添加、固定化する (10 分)。
- (6) Serial flow (Fc 1-2) とし、流速を 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ にセットし、10 mmol/l NaOH, 1 mol/l NaCl 10 μl で 3 回洗浄する。

< GST の検出 >

- (1) GST 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS 60 μl を添加、検出する (2 分)。
- (2) 10 mmol/l NaOH, 1 mol/l NaCl 10 μl で洗浄する。
- (3) GST 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS 60 μl を添加、検出する (2 分)。
- (4) 10 mmol/l NaOH, 1 mol/l NaCl 10 μl で洗浄する。
- (5) GST 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS 60 μl を添加、検出する (2 分)。
- (6) 10 mmol/l NaOH, 1 mol/l NaCl 10 μl で洗浄する。

< 結果 >

図 9 に Biotin-SAM Formation Reagent を用いて作製したセンサによる GST の検出結果を示した。低濃度域から GST が検出されている。

ここでは示していないが、コントロール (SA 固定、抗体未固定) への非特異吸着は非常に小さく抑えられている。Biotin-SAM Formation Reagent は SA 類の結合が最大になるよう調整しており、SA が基板表面に密に配列しているものと考えられる。その結果、SA 固定化後は非常に非特異吸着を起こし難い表面となっているものと考えている。

SA 固定、及びビオチン化抗体結合の際のセンサグラムを図 10 に示した。

5. おわりに

Biacore™ ではデキストランゲルのセンサチップが多用されているが、上記の通り、SAM でも同等以上の結果を得ることも可能である。SAM であればカルボキシル基、ビオチン以外にも様々な官能基を導入したものが入手可能であり、デキストランゲルでは難しかったような系に利用できる可能性もある。

SAM 修飾基板の作製自体はそれほど難しいものではないことから、是非小社 SAM 試薬を Biacore™ でのご研究にご活用頂きたい。

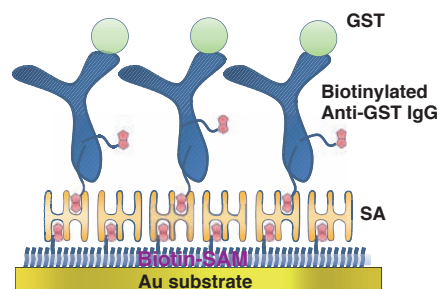


図 8 Biotin-SAM を用いたバイオセンサの模式図

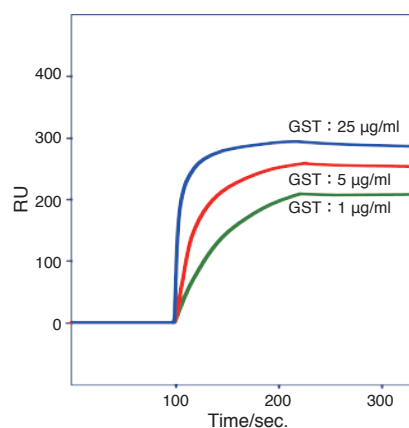


図 9 Biotin-SAM Formation Reagent を用いて作製したセンサによる GST の検出。コントロールを差し引いたセンサグラム。

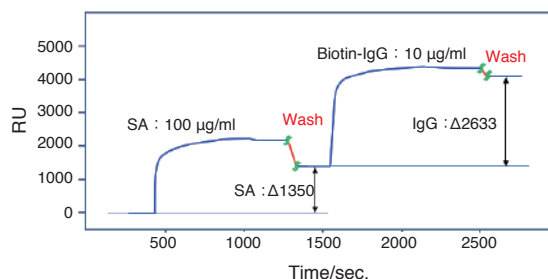


図 10 Biotin-SAM への SA, Biotin 化 IgG の固定化センサグラム。

SAMs 試薬

Amino type

[A458] 16-Amino-1-hexadecanethiol, hydrochloride
 [A423] 11-Amino-1-undecanethiol, hydrochloride
 [A424] 8-Amino-1-octanethiol, hydrochloride
 [A425] 6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride
 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$ $n=16, 11, 8, 6$

Oligoethylene Glycol 導入 Amino type

[A483] Amino-EG₆-undecanethiol, hydrochloride
 [A505] Amino-EG₆-hexadecanethiol, hydrochloride
 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6-\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$ $n=16, 11$

Hydroxy type

[H394] 16-Hydroxy-1-hexadecanethiol
 [H337] 11-Hydroxy-1-undecanethiol
 [H338] 8-Hydroxy-1-octanethiol
 [H339] 6-Hydroxy-1-hexanethiol
 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ $n=16, 11, 8, 6$

Oligoethylene Glycol 導入 Hydroxyl type

[H354] Hydroxy-EG₃-undecanethiol
 [H355] Hydroxy-EG₆-undecanethiol
 [H395] Hydroxy-EG₃-hexadecanethiol
 [H396] Hydroxy-EG₆-hexadecanethiol
 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OH}$ $n=16, 11$ $m=6, 3$

Carboxyl type

[C429] 15-Carboxy-1-pentadecanethiol
 [C385] 10-Carboxy-1-decanethiol
 [C386] 7-Carboxy-1-heptanethiol
 [C387] 5-Carboxy-1-pentanethiol
 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ $n=15, 10, 7, 5$

Oligoethylene Glycol 導入 Carboxyl type

[C445] Carboxy-EG₆-undecanethiol
 [C463] Carboxy-EG₆-hexadecanethiol
 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6-\text{OCH}_2\text{COOH}$ $n=16, 11$

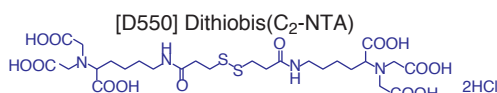
Carboxy disulfide NHS ester type

[D537] Dithiobis(succinimidyl undecanoate)
 [D538] Dithiobis(succinimidyl octanoate)
 [D539] Dithiobis(succinimidyl hexanoate)
 $\text{S}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{NHS}$
 $\text{S}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{NHS}$ $n=10, 7, 5$

1 shot type

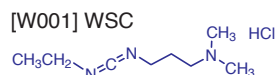
[C488] Carboxylic acid-SAM Formation Reagent
 [B564] Biotin-SAM Formation Reagent

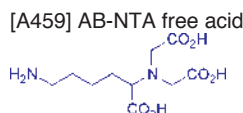
[S350] Sulfobetaine3-undecanethiol
 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3-\text{SO}_3^-$

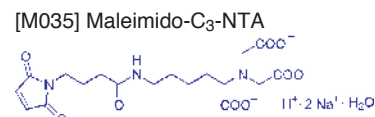


関連試薬

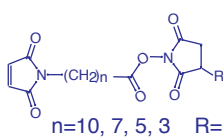
[A515] Amino Coupling Kit
 [LK03] Biotin Labeling Kit-NH₂
 [LK10] Biotin Labeling Kit-SH

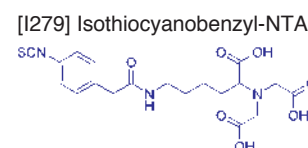
[W001] WSC


[A459] AB-NTA free acid


[M035] Maleimido-C₃-NTA


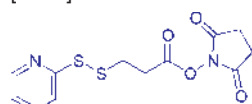
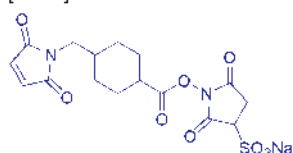
Hetero-bifunctional Reagent

[K214] KMUS, [S250] Sulfo-KMUS
 [H257] HMCS, [S026] Sulfo-HMCS
 [E018] EMCS, [S024] Sulfo-EMCS
 [G005] GMBS, [S025] Sulfo-GMBS

 $n=10, 7, 5, 3$ $R=H, \text{SO}_3\text{Na}$

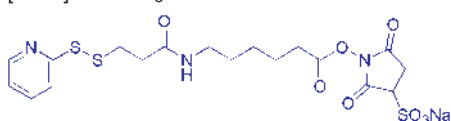
[I279] Isothiocyanobenzyl-NTA


[S330] Sulfo-SMCC

[S291] SPDP

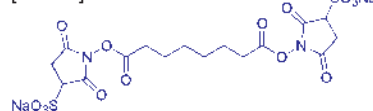


[S359] Sulfo-AC₅-SPDP



Homo-bifunctional Reagent

[B574] BS3



[D630] DTSSP, [D629] DSP

