Sigma-Aldrich®
Lab & Production Materials

Application Note

マイクロスフェア共有結合 - Estapor® カルボキシル修飾染色マイクロスフェア用 2 ステップ EDC / Sulfo NHS 共有結合

はじめに

タンパク質は、水溶性の 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）によってカルボキシル基を活性化することにより、カルボキシル基含有マイクロスフェアの表面に共有結合させることができます。この反応は、第 1 級アミン（求核試薬）とすぐに反応して安定したアミド結合を形成する活性中間体（O- アシルイソ尿素）を形成します。

EDC 反応によって形成された活性中間体は不安定で、水によってすぐに加水分解されます。この水との競争反応は、活性中間体を分裂させてカルボキシル基を再生する可能性があります。この急速な活性中間体の加水分解を回避するために N- ヒドロキシスルホスクシンイミド（Sulfo-NHS）をこの反応に添加すれば、第 1 級アミンとゆっくり反応して安定したアミド結合を形成する、より安定的な Sulfo-NHS エステル中間体を形成することができます。

ここでは、EDC と Sulfo-NHS を用いて Estapor® カルボキシル修飾マイクロスフェアにタンパク質を結合するための、一般的な 2 ステップ共有結合プロトコルをご紹介します。

概論

どの場合に 2 ステップ共有結合プロトコルを使用するか？

2 ステップ共有結合プロトコルの使用は、結合されるタンパク質などの分子にカルボキシル基と第 1 級アミン基の両方が含まれる場合に最適です。2 ステップ法はより安定的な Sulfo-NHS エステル中間体を形成するため、タンパク質の添加前に過剰な EDC を除去できます。そのため、タンパク質でのカルボキシル基の活性化と、タンパク質架橋の可能性が回避されます。[1] また、必要に応じてバッファー交換を容易に行うことができ、さらに結合収率が向上することも分かっています。[2,3]

2 ステップ共有結合プロトコルは、高密度（COOH >100 µeq/g）と低密度（COOH <100 µeq/g）の両方のカルボキシル修飾マイクロスフェアに使用できます。

カルボキシル修飾マイクロスフェアの活性化と共有結合

EDC と Sulfo-NHS を用いた活性化は、pH が 4.5 ～ 7.2 の場合に最も効率的です。そのため、多くの場合、この活性化反応には pH 6 の MES（2-(N- モルホリノ) エタンスルホン酸）バッファーの使用が推奨されます。[4] 第 1 級アミン基とカルボキシル基は活性化反応と競合するため、これらを含有する活性化バッファーは使用できません。リン酸塩緩衝液と緩衝酢酸溶液も、EDC の反応を低下させるおそれがあります。MES はカップリングバッファーとして極めて良好に作用しますが、コーティングの最適化が必要な場合には pH の異なる代替バッファーと交換できます。

次のページで、タンパク質をカルボキシル修飾マイクロスフェアに結合させる際、結合に伴う問題の回避に役立つヒントをご紹介します。

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

MERCK

共有結合を開始する前に考慮すべき事項

1. EDC は、–20° C の乾燥した容器内で保存し、使用前に室温に戻す必要があります。EDC は湿気に極めて影響を受けやすいため、湿ったり塊になったりした場合は使用しないでください。EDC 溶液は使用直前に調製してください。
2. Sulfo-NHS も使用直前に調製してください。
3. 使用前に、すべての試薬を室温に戻してください。
4. ペレットをできるだけ緩く形成することで、マイクロスフェアの再懸濁が容易になります。マイクロスフェアのサイズに応じて推奨される遠心分離の回転速度を以下に示します。

   0.2 µm-17,000 rpm（約 28,500 g）で 9 分間
   0.3 µm-14,000 rpm（約 19,300 g）で 7 分間
   0.4 µm-12,000 rpm（約 14,200 g）で 7 分間
   0.5 µm-12,000 rpm（約 14,200 g）で 5 分間

5. マイクロスフェアは、洗浄と洗浄の間、特にリガンドカップリングの前には完全に再懸濁させることが重要です。
6. マイクロスフェアペレットは、まずピペット操作を繰り返して大きな塊を粉砕してから、必要に応じて超音波分解することにより再懸濁してください。
7. マイクロスフェアを再懸濁して単分散状態にする場合は、浸水可能な超音波プローブが最も効果的です。ピペット操作の繰り返し、ボルテックスや水槽内超音波分解だけではマイクロスフェアペレットの完全再懸濁に不十分な場合もあります。
8. 超音波分解の際に、サンプルを過熱させないでください。必要に応じて、氷水に浸漬したチューブでサンプルを超音波分解してください。
9. マイクロスフェア溶液は、凝集に問題がなければ、目視で若干「乳白色」に見えます。
10. 凝集は 400 倍顕微鏡観察で評価できます。単分散状態のマイクロスフェアは 400 倍で観察することが難しく、かすんだマイクロスフェアの海のように見えます（**図 1**）。しかし、凝集したマイクロスフェアは、400 倍で容易に観察できます（**図 2 および図 3**）。

図 1：単分散状態のマイクロスフェア

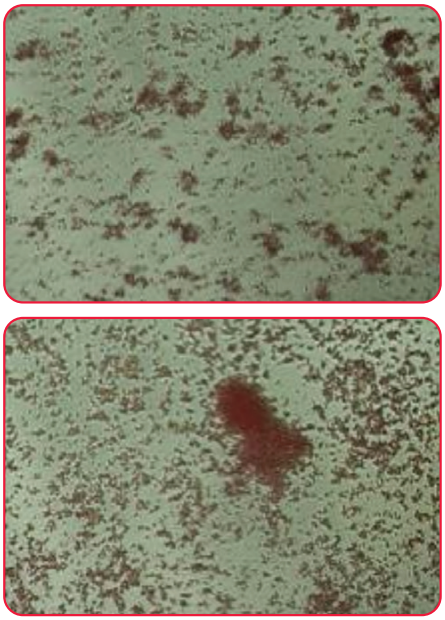

図 2 および図 3：凝集したマイクロスフェア

11. 汚染物質が引き起こすおそれのある問題を避けるため、バッファーの調製とマイクロスフェアの洗浄には Milli-Q® 純水を使用してください。
12. 抗体濃度は、個別の試験要件に応じて最適化する必要があります。最適なモル比が得られる十分な量を入手できないおそれのある高価な抗体を結合する場合は、ウシγグロブリンや BSA などの非特異的タンパク質を添加すれば残った反応部位を占有することができます。

2 ステップ EDC/Sulfo-NHS 共有結合

ここに示すのは、一般的な 2 ステップ EDC/Sulfo-NHS 共有結合プロトコルです。タンパク質の種類や分子量およびマイクロスフェアのカルボキシル電荷密度によっては、最適化が必要になる場合があります。

マイクロスフェア

Estapor® カルボキシル修飾染色マイクロスフェア
製品番号　K1-020、K1-030、K1-040、K1-050 など

バッファー

活性化 / カップリングバッファー－ 50 mM MES、pH 6.0
ブロッキングバッファー－ 50 mM Tris、pH 8.0、0.5%（w/v）カゼイン

マイクロスフェアの活性化・消光

EDC（カタログ番号 E7750）
Sulfo NHS（カタログ番号 56485）
エタノールアミン（カタログ番号 1008452500）

使用機器

Eppendorf 社－ 5430 遠心分離機と FA-45-24HS ローター
Hielscher 社－ UP50H Compact 超音波装置
ラボ用ホモジナイザー

安全衛生

サンプルを超音波分解する際は、防音保護具の着用が必要です。有害化学物質（エタノールアミンなど）は必ずドラフトチャンバー内で使用し、適切な安全措置を講じてください。

結合プロトコル

マイクロスフェアの洗浄と活性化

1. Estapor® マイクロスフェア（10% w/v）100 µL を、低タンパク質結合性の Eppendorf チューブに分注します。

2. 活性化／カップリングバッファー 1 mL を添加して、完全に混合します。

注：遊離カルボキシル基、第 1 級アミン基、およびチオールを含有する活性化／カップリングバッファーは使用できません。これらの官能基は、架橋結合の化学作用を妨げます。

3. マイクロスフェアを、そのサイズに適した遠心分離回転速度で回転させます。

   0.2 µm-17,000 rpm で 9 分間
   0.3 µm-14,000 rpm で 7 分間
   0.4 µm-12,000 rpm で 7 分間
   0.5 µm-12,000 rpm で 5 分間

4. 上清を捨てます。

5. ステップ 2 ～ 4 を 2 回繰り返します。マイクロスフェアは、洗浄と洗浄の間、およびリガンドコーティングが進む前に完全に再懸濁させることが重要です。ピペット操作の繰返しが非常に有効ですが、超音波プローブによる超音波分解が必要になる場合もあります。（オプション：顕微鏡下でマイクロスフェアを観察し、単分散であることを確認します。）

6. 最終洗浄後に、活性化／カップリングバッファー 1 mL 中でマイクロスフェアを再懸濁させます。マイクロスフェアが単分散であることを確認します。

7. 使用直前に活性化試薬を調製します。

8. 室温できれいなマイクロチューブに Milli-Q® 純水 500 µL を入れて EDC 19.2 mg を添加して、200 mM EDC 溶液を調製します。

9. きれいなマイクロチューブに活性化／カップリングバッファー 500 µL を入れて Sulfo-NHS 21.7 mg を添加して、200 mM Sulfo-NHS を調製します。

10. 24 µL の 200 mM EDC と 240 µL の 200 mM Sulfo-NHS を、（上記ステップ 6 から得られた）洗浄済みマイクロスフェア 1 mL に素早く添加します。

11. ボルテックスして、回転式ローテーターで 30 分間室温で混合しながらインキュベートします。

12. チューブを回転させてマイクロスフェアをペレット状にします。

13. 上清を捨てます。

14. 活性化／カップリングバッファー 1 mL を添加、完全に混合して、マイクロスフェアを洗浄します。

15. 指定された回転速度でチューブを回転させて、マイクロスフェアをペレット状にします。

16. ステップ 13 ～ 15 を 2 回繰り返します。

17. 活性化／カップリングバッファー 700 µL 中でマイクロスフェアを懸濁させます（抗体結合の項を参照してください）。抗体／リガンドを添加する前のマイクロスフェアが、単分散であることが重要です。必要に応じて超音波分解してください。

抗体結合

18. 上活性化／カップリングバッファーで 2 mg/mL 濃度の抗体を調製します。

19. マイクロスフェア 1 グラム当たり抗体 60 mg のコーティング濃度に基づいて、マイクロスフェア 700 µL に抗体（2 mg/mL）300 µL を添加します。完全に混合してください。これでリガンドの総量は 1 mL になります。
    これ以外のコーティング濃度については、下の**表 1** をご覧ください。

注：最適なコーティング濃度を個別の状況によって検討する必要があります。

コーティング濃度	コーティングバッファーの量	2 mg/mL 抗体溶液の量
20 mg/g	0.9 mL	0.1 mL
40 mg/g	0.8 mL	0.2 mL
60 mg/g	0.7 mL	0.3 mL
80 mg/g	0.6 mL	0.4 mL

表 1：抗体コーティング濃度早見表

20. 回転式ローテーターで 2.5 時間、室温で懸濁液を混合します。

21. 1% マイクロスフェア 1 mL に対して、エタノールアミン 30 µL を（ドラフトチャンバー内で）添加します。ボルテックスして回転式ローテーターで 30 分間混合し、マイクロスフェアを消光させてください。

22. 適切な遠心分離回転速度でチューブを回転させて、マイクロスフェアをペレット状にします。

23. 上清を捨てます。（注：BCA アッセイによるタンパク質含有量分析する場合は、上清を別の容器に移して残します）

24. ブロッキングバッファー 1 mL でマイクロスフェアを再懸濁させます。超音波分解してから回転式ローテーターで最低 2 時間、室温で混合してください。（注：室温でオーバーナイトでも構いません。）

25. 適切な遠心分離回転速度でチューブを回転させて、マイクロスフェアをペレット状にします。

26. 上清を捨てます。

27. ブロッキングバッファー 1 mL を添加し、必要に応じてピペット操作の繰り返しと超音波分解によりマイクロスフェアを再懸濁させます。

28. 適切な遠心分離回転速度でチューブを回転させて、マイクロスフェアをペレット状にします。

29. ステップ 26 ～ 28 をもう 1 回繰り返します。

30. 最終洗浄ステップ後に上清を取って、ブロッキングバッファー 1 mL を添加します。これで、マイクロスフェアは 1% w/v になっています。

31. ピペット操作の繰り返しと超音波分解により、マイクロスフェアを再懸濁させます。（オプション：顕微鏡下でマイクロスフェアを観察し、単分散であることを確認します。）

32. 使用直前まで懸濁液を 4 °C で保存できます。約 5 日以内に使用してください。結合の安定性は、別途評価する必要があります。

タンパク質結合のトラブルシューティング

問　題 1　使用前のマイクロスフェア凝集

解決策 1　使用前にマイクロスフェアをボルテックスおよび超音波分解してください。

問　題 2　結合中および結合後のマイクロスフェア凝集

解決策 2　凝集が生じた時点によって対処法は違います：

1. EDC の添加後
   - EDC をゆっくり添加します。
   - EDC の添加後に、マイクロスフェアを十分に混合します。
   - 溶液中のマイクロスフェア濃度を 0.5% に低下させます。
2. タンパク質の添加後
   - タンパク質の量が不十分な可能性があるため、タンパク質濃度を増加させます。
   - 別のカップリングバッファーを試します。
   - 可逆的凝集の可能性があります。サンプルを超音波分解して、凝集体を粉砕してください。
3. 遠心分離後
   - 注意しながらペレットを再懸濁させます。
   - ペレットができるだけ緩く形成されるように、回転速度や時間を低減します。
   - マイクロスフェアを再懸濁させるために、ペレットをより激しくピペット操作します。
   - 超音波分解時間の延長または超音波振幅の増加、あるいはその両方を行います。
   - マイクロスフェアの量を減らします。
4. 洗浄後
   - 少量の界面活性剤（0.025% SDS など）を添加します。

問　題 3　抗体またはリガンドのマイクロスフェアへの結合性が低い。

解決策 3

- EDC が不活性になっているおそれがあります。新しい EDC を使用してください。
- Sulfo-NHS 中間体が加水分解しているおそれがあります。EDC と Sulfo-NHS は使用直前に調製してください。
- タンパク質の量が不十分な可能性があるため、コーティング濃度を増加させる必要があります。
- COOH 活性化直後にタンパク質を添加します。
- タンパク質と化合物がアミン基と競合しないようにします。
- コーティングバッファーや pH を変更します。

問　題 4　コーティングのばらつき

解決策 4　各ステップでマイクロスフェア懸濁液を完全に混合し、また新しい試薬を使用してください。

問　題 5　非特異結合

解決策 5

- 別のブロッキング試薬（BSA、グリシン、カゼイン、魚皮ゼラチン）を使用します。
- ブロッキング時間を延長します。
- 消光ステップにおけるエタノールアミンの量を減らします。
- コーティングタンパク質の量を減らします。
- 別の Estapor® マイクロスフェアを使用します。COOH 電荷密度の高いマイクロスフェアを試してください。
- 凝集したマイクロスフェアにより非特異的結合が生じる場合もあります。解決策 2 の推奨事項を参照してください。

参考資料

1. Grabarek, Z. and Gergely, J., 1990. Zero-Length Crosslinking Procedure with the Use of Active Esters. Analytical Biochemistry, 185, pp. 131.
2. Staros, J.V., 1988. Membrane-Impermeant Cross-Linking Reagents: Probes of the Structure and Dynamics of Membrane Proteins. Accounts of Chemical Research, 21(12), pp. 435.
3. Staros, J.V., Wright, R.W. and Swingle, D.M., 1986. Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Coupling Reactions. Analytical Biochemistry, 156, pp. 220.
4. Nakajima, N. and Ikada, Y., 1995. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. Bioconjugate Chemistry, 6(1), pp. 123.

サイエンス系お役立ちメディア M-hub

かんたんカタログ検索 カタログファインダー

メルク ライフサイエンス - メールニュース www.merckmillipore.com/wm

メルク ライフサイエンス公式 SNS、動画コンテンツをご覧ください。

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2025年5月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

シグマ アルドリッチ ジャパン

ライフサイエンス リサーチソリューションズ事業部

〒106-0041 東京都港区麻布台1-3-1 麻布台ヒルズ 森JPタワー 26階

製品の最新情報はこちら www.sigmaaldrich.com/JP/ja

E-mail: Diagnostics_Japan@merckgroup.com Tel: 03-4531-1142

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

DXM028A-2505-PDF-E