

i-colloid Gold Nanoparticles 20 nm への抗体の受動的吸着修飾

本プロトコルでは、i-colloid Gold Nanoparticles 20 nm に抗体（注1）を修飾するための操作方法を示します。抗体によっては、修飾反応時の緩衝液の最適 pH ならびに最適な抗体濃度（金ナノ粒子との混合比率）は異なります。予備試験で最適 pH ならびに最適抗体濃度を調べてからの抗体修飾を推奨しております。本操作手法に従って作製した抗体修飾金ナノ粒子はイムノアッセイ評価試験などに用いることが可能です。

注1. 抗体以外のタンパク質に関しても、本操作を用いることが出来ます。

① 抗体修飾の最適条件（pH・抗体濃度）検討

概要

i-colloid Gold Nanoparticles 20 nm へ抗体修飾を実施する際の最適な pH と抗体濃度を、塩添加による凝集評価試験から導きます。抗体修飾が完了したナノ粒子は耐凝集性があり、塩を添加した状態でも分散状態を保ちます。この分散状態を示す pH と抗体濃度を求めます。

試薬と装置

- 1x PBS
- 100 mM の緩衝液（pH 5.7 から 9.8、※1）
- i-colloid, OD 1（※2）
- 抗体（1 mg/mL の濃度となるよう 1xPBS で調整、※3）
- 10% w/v NaCl 溶液
- マイクロ遠心チューブ
- マイクロピペットあるいはマルチチャンネルピペット
- 96 ウェルマイクロプレート
- オービタルシェイカーあるいは回転かくはん機
- 吸収マイクロプレートリーダー（任意、※4）

※1. 緩衝液については下記種類の使用を推奨しております

- pH 5.7~8 の場合は、リン酸二水素ナトリウムを脱イオン水に溶解し、1 M の NaOH 溶液にて任意の pH に調整ください。
- pH 8~9.8 の場合は、ホウ酸を脱イオン水に溶解し、1 M の NaOH 溶液にて任意の pH に調整ください。

※2. お手持ちの i-colloid が OD1 以上であれば、50 μM の NaCl 溶液を用いて、OD1 となるよう調整ください。

※3. アジ化ナトリウムあるいは BSA が抗体溶液に含まれている場合は、除去精製してください。

※4. 定量的な評価のために吸光度測定を推奨しております。もしマイクロプレートリーダーをお持ちで無い場合、Part-III-(b)に記載の順に従い目視検査で判定ください。

手順

Part I: 各種溶液の準備

1. 抗体を 1xPBS を用いて適宜希釈してください。IgG 抗体の場合、0~600 μg/mL の濃度を推奨しております（反応液での終濃度 0~12μg/mL）。濃度調整後の溶液は 30 μL ほど必要になります。（溶液 A）
 - 濃度は 0、50、100、150、200、300、400、600 μg/mL を推奨しております。
2. マイクロ遠心チューブに、各 pH を示す 100 mM 緩衝液 40 μL と OD 1 の i-colloid 溶液 940 μL を混合してください。（溶液 B）

Part II: 抗体修飾反応

1. Part I で作製した溶液 A を 96 ウェルマイクロプレート（以下、長辺方向を横、短辺方向を縦とします）に 2 μL ずつ分注してください。
 - 横行に同じ抗体濃度溶液の分注を推奨します。
 - この際、行番号と抗体濃度を記録してください。
2. Part I で作製した溶液 B を、A 液 2 μL が入った各ウェルに 98 μL ずつ分注し、ピペティングなどによってよく混合してください。
 - 縦列に同じ pH 溶液の分注を推奨します。
 - この際、列番号と pH を記録してください。
3. マイクロプレートに蓋をし、1 時間、室温にて 100 rpm で攪拌ください。
4. 反応終了後、抗体濃度 0 μg/mL のサンプルがピンクないしは赤色を示していることを確認ください。
 - 褪色が生じている、あるいは薄紫色のウェルは既に金ナノ粒子の凝集が起こっていることを示します。

推奨 ; Part III-(a): NaCl 添加による凝集評価試験（吸光度測定）

マイクロプレートリーダーをお持ちの方はこちらの操作手法で凝集評価試験を実施ください。

1. 10%の NaCl 溶液を各ウェルに 100 μL 加えてください。

2. マイクロプレートに蓋をし、1時間、室温にて 100 rpm で攪拌ください。
3. 反応終了後、抗体濃度 0 $\mu\text{g/mL}$ のサンプルにおいて、褪色が生じている、あるいは薄紫色をしていることを確認してください。
4. マイクロプレートリーダーにて、530 nm ならびに 690 nm の波長にて各ウェルの吸光度を測定ください。
5. それぞれの吸光度の比較から、 A_{690}/A_{530} の凝集指標 (AI = Aggregation Index) を計算ください。
 - $AI < 0.2$ は凝集しておらず、分散している状態を示します。
 - $0.2 \leq AI \leq 0.4$ はある程度の凝集が生じていることを示します。
 - $AI > 0.4$ はほぼ完全に凝集が起こっていることを示します。
6. 次の手順に従い、修飾緩衝液の最適 pH と抗体の最適濃度を選定ください。

【修飾緩衝液の最適 pH に関して】

- $AI < 0.2$ を示す最適 pH を選択ください。
- もし最適 pH の範囲に抗体の pI が含まれていた場合は pI よりも若干高い pH を選定されることを推奨します。

【抗体の最適濃度に関して】

- 選択された最適 pH の中で、 $AI < 0.2$ を示す抗体濃度を選択ください。
- 最適濃度が複数ある場合、過剰な抗体修飾を防ぐためにも、最小濃度の使用を推奨します。

任意 ; Part III-(b): NaCl 添加による凝集評価試験 (目視判定)

マイクロプレートリーダーをお持ちでない方はこちらの操作手法で凝集評価試験を実施ください。

1. 10%の NaCl 溶液を各ウェルに 100 μL 加えてください。
2. マイクロプレートに蓋をし、1時間、室温にて 100 rpm で攪拌ください。
3. 反応終了後、抗体濃度 0 $\mu\text{g/mL}$ のサンプルにおいて、褪色が生じている、あるいは薄紫色をしていることを確認してください。
4. 次の手順に従い、修飾緩衝液の最適 pH と抗体の最適濃度を選定ください。

【修飾緩衝液の最適 pH に関して】

- ピンクあるいは赤色をしている最適 pH を選択ください。
- もし最適 pH の範囲に抗体の pI が含まれていた場合は pI よりも若干高い pH を選定されることを推奨します。

【抗体の最適濃度に関して】

- 選択された最適 pH の中で、ピンクあるいは赤色をしている抗体濃度を選択ください。
- 最適濃度が複数ある場合、過剰な抗体修飾を防ぐためにも、最小濃度の使用を推奨します。

② i-colloid への抗体修飾手順

概要

①の最適条件検討で定めた最適 pH ならびに最適抗体濃度において i-colloid Gold Nanoparticles 20 nm へ抗体修飾を実施する際の手順を示します。抗体などの種類が異なる場合、それぞれの抗体で前述する最適 pH ならびに最適抗体濃度を算出することを推奨いたします。

試薬と装置

- i-colloid, 5 mL
- 修飾緩衝液 (100 mM、①で決定した pH の緩衝液)
 - 修飾反応を最適化するためにナノコロイドの pH を調整するために使用されます。
 - pH 5.7~8 の場合は、リン酸二水素ナトリウムを脱イオン水に溶解し、1 M の NaOH 溶液にて任意の pH に調整ください。
 - pH 8~9.8 の場合は、ホウ酸を溶解し、1 M の NaOH 溶液にて任意の pH に調整ください。
- 抗体溶液
 - OD 1 の場合：①で決定した最適抗体濃度の 50 倍濃度の溶液
 - OD 5 の場合：①で決定した最適抗体濃度の 250 倍濃度の溶液
 - 濃縮する場合、限外ろ過など緩衝液濃度が変化しない方法を推奨します。
 - 希釈する場合、1xPBS を用いてください。
- ブロッキング緩衝液 (4 mM の修飾緩衝液、10 mg/mL BSA)
 - 修飾緩衝液を 4 mM に希釈し、BSA を終濃度 10 mg/mL となるよう添加し溶解させる。
- 保存溶液 (4 mM の修飾緩衝液、5 mg/mL BSA)
 - 修飾緩衝液を 4 mM に希釈し、BSA を終濃度 5 mg/mL となるよう添加し溶解させる。
- 遠心分離機
- オービタルシェイカーあるいは回転かくはん機
- ボルテックスミキサー (任意)

手順

1. 脱イオン水で、15 mL のチューブを濯ぎ、残留不純物やコンタミを除去する。
2. 213 μL の修飾緩衝液を 15ml チューブに加える。

3. 5 mL のナノ粒子を加え、懸濁する。
4. タンパク質溶液を加えて、ボータックスミキサーあるいはピペットティングにより攪拌する。
5. 室温にて 1 時間、穏やかに振とうする (100 rpm)。
6. 反応後、5 mL のブロッキング緩衝液を加えて 30 分間、室温にて穏やかに振とうする (100rpm)。
7. 室温にて 30 分間、6000xg の遠心分離にかける。
 - OD5 のナノ粒子に修飾する場合、30 分の遠心後に、上澄みにうっすらと色がついている場合がありましたら追加で 20 分間、6000xg の遠心分離を実施ください。
8. 上澄みを慎重に除去し、沈殿に 5 mL の保存溶液を加え、修飾済みナノ粒子を再度懸濁する。
9. 室温にて 20 分間、6000xg の遠心分離にかける。
10. 慎重に上澄みを除去し、沈殿に 5 mL の保存溶液を加え、再度懸濁する。修飾済みナノ粒子の濃度を初期の金ナノ粒子の光学濃度と一致させる。他の濃度が必要であれば、保存溶液を用いて適宜調整する。
11. 脱イオン水で事前に洗浄された清純なチューブあるいはバイアル瓶に移し替える。
 - 修飾済みナノ粒子を安定させるためにはポリプロピレンチューブかシラン化ガラスのバイアル瓶が推奨されます。
12. 使用するまで修飾済みナノ粒子を 4 °C で保存する。絶対に凍結保存はしないでください。