# i-colloid Gold Nanoparticles 40nm

# 取扱説明書

研究試薬

本取扱説明書およびSDS(安全データシート)をよく読み、正しくお使いください。また、読み終わった後、すぐに取り出せるように大切に保管してください。

## 特長

- ◆ レーザ照射により作製された貴金属ナノ粒子。
- ◆ 表面の残渣化合物が化学合成品と比べて少ない。
- ◆ 優れた分散性と分子修飾率。

## 安全上のご注意

- 本製品を口や目に入れないでください。
  健康を害するおそれがあります。
- 万が一、体内に入った場合は、SDS(安全データシート)に記載の方法に従い、処置をしてください。
- SDSは、下記IMRA America のHPよりダウンロードしてください。
  https://nano.imra.com/ja/
- **本製品は研究用試薬**です。医薬品医療機器法に基づく体外診断用医薬品あるいは医療機器として承認・認証等を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

## ご使用の前に

本取扱説明書では、i-colloid Gold Nanoparticles 40nmに 抗体(注1)を修飾するための操作方法を一例として示します。
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(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。

【お願い】

- 長期間保存において粒子が自然沈降する可能性があります。使用前に容器を振って混ぜることにより、均一に分散させてください。
- 常温に戻してから使用してください。

## 操作方法

### ① 抗体修飾の最適条件(pH・抗体濃度)検討

#### 概要

i-colloid Gold Nanoparticles 40 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 6.0 から9.5、※1)
- i-colloid, OD 1 (※2)
- 抗体 (1 mg/mL の濃度となるよう1×PBSで調製、※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 また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または回転かくはん機
- 吸収マイクロプレートリーダー(任意、※4)

※1:緩衝液は下記種類の使用を推奨しております。
- ○ pH 6.0~8.0 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に調製します。
- ○ pH 8.0~9.5 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に調製します。

※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となるよう調製します。

※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、除去精製します。

※4:定量的な評価のために吸光度測定を推奨しています。もしマイクロプレートリーダーをお持ちで無い場合、Part 3-(b)に記載の手順に従い、目視で判定します。

手順

## Part 1:各種溶液の準備

1. 抗体を1×PBSを用いて適宜希釈します。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0～12 μg/mL)。濃度調製後の溶液は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 を混合します。**(溶液B)**
- pHは6.0、6.5、7.0、7.5、8.0(リン酸緩衝液) 8.0、8.5、9.0、9.5(ホウ酸緩衝液)の使用を推奨しております。

## Part 2 :抗体修飾反応

1. 96ウェルマイクロプレートに、Part 1で作製した溶液Aを2 μL づつ分注します。
- 縦列に同じ抗体濃度溶液を分注します(図A)。
- この際、列番号と抗体濃度を記録してください。

2. A液2 μLが入った各ウェルに、Part 1で作製した溶液Bを98 μLづつ分注します。
- 横行に同じpH溶液を分注します(図A)。
- この際、行番号とpHを記録してください。

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|
| A | 0 μg/mL pH6.0 | 50 μg/mL pH6.0 | 100 μg/mL pH6.0 | 150 μg/mL pH6.0 |
| B | 0 μg/mL pH6.5 | 50 μg/mL pH6.5 | 100 μg/mL pH6.5 | 150 μg/mL pH6.5 |
| C | 0 μg/mL pH7.0 | 50 μg/mL pH7.0 | 100 μg/mL pH7.0 | 150 μg/mL pH7.0 |

図A.サンプル分注の実施例

3. マイクロプレートにふたをし、1時間、室温にて100 rpmで撹拌します。

4. 反応終了後、抗体濃度0 μg/mLのサンプルの色がピンクないしは赤色を示していることを確認します。
- 褪色が生じている、あるいは薄紫色のウェルはすで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 3-(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します。

1. A液B液を混合し1時間反応させた96ウェルマイクロプレート(Part 2-4まで実施)に対して、各ウェルに10%のNaCl溶液を100 μL加えます。

2. マイクロプレートにふたをし、1時間、室温にて100 rpmで撹拌します。

3. 反応終了後、抗体濃度0 μg/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ます。

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します。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 )を計算します。
- 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 ≤ AI ≤ 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。

5. 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します。

【修飾緩衝液の最適pHに関して】
- AI < 0.2を示す最適pHを選択します。
- もし最適pHの範囲に抗体のpI(等電点)が含まれる場合は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します。
- 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、最小濃度の選定を推奨します。

## (任意)Part 3-(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します。

1. A液B液を混合し1時間反応させた96ウェルマイクロプレート(Part 2-4まで実施)に対して、各ウェルに10%のNaCl溶液を100 μL加えます。

2. マイクロプレートにふたをし、1時間、室温にて100 rpmで撹拌します。

3.　反応終了後、抗体濃度0 μg/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ます。

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します。

【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を選択します。
- もし最適pHの範囲に抗体のpIが含まれる場合は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します。
- 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、最小濃度の選定を推奨します。

## 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 40 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します。

### 試薬と装置

- i-colloid溶液,OD1, 5 mL（※5）
- 100 mMの修飾緩衝液（①で選定した緩衝液、※6）
- 抗体溶液（①で設定した濃度の抗体溶液、※7）
- ブロッキング緩衝液（4 mM 修飾緩衝液、10 mg/mL BSA、※8）
- 保存溶液（4 mM 修飾緩衝液、5 mg/mL BSA、※9）
- 遠心分離機
- オービタルシェイカーまたは回転かくはん機
- ボルテックスミキサー（任意）

※5：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となるよう調製します。

※6：緩衝液は下記種類の使用を推奨しております。
- pH 6.0～8.0 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に調製します。
- pH 8.0～9.5 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に調製します。
- 抗体のpIよりも若干高めのpHにすることで、修飾反応を促進することができます。

※7：①で設定した最適な濃度となるよう濃度調製します。
- 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、1×PBSを用います。

※8：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します。

※9：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します。

### 手順

1.　脱イオン水で、15 mLのチューブをすすぎ、残留不純物を除去します。

2.　15 mLチューブに、100 mMの修飾緩衝液を213 μL 加えます。

3.　i-colloid溶液5 mLを加え、懸濁します。

4.　抗体溶液106 μLを加えて、ボルテックスミキサーあるいはピペッティングにより撹拌します。

5.　室温にて1時間、穏やかに振とうします（100 rpm）。

6.　反応後、ブロッキング緩衝液を5 mL 加えて30分間、室温にて穏やかに振とうします（100 rpm）。

7.　室温にて30分間、3,000×gの遠心分離にかけます。

8.　上澄みを慎重に除去し、沈殿に保存溶液5 mLを加え、修飾済みナノ粒子を再度懸濁します。

9.　室温にて20分間、3,000×gの遠心分離にかけます。

10.　慎重に上澄みを除去し、沈殿に保存溶液5 mLを加え、再度懸濁します。
- 修飾済みナノ粒子の濃度を初期のナノ粒子の光学濃度と一致させます。他の濃度が必要であれば、保存溶液を用いて適宜調製します。

11.　脱イオン水で事前に洗浄された清浄なチューブあるいはバイアル瓶に移し替えます。
- 修飾済みナノ粒子を安定させるために、ポリプロピレンチューブまたはシラン化ガラスのバイアル瓶を推奨しています。

12.　使用するまで修飾済みナノ粒子を密栓して4℃にて保存ください。
絶対に凍結保存はしないでください。

## 保存方法

- 密栓して4℃にて保存してください。**冷凍では絶対に保存しないでください。**ナノ粒子が不可逆的に凝集します。

- タンパク質修飾前は、購入時の容器で保存することを推奨します。
  別の容器に移すと、安定性や性能に悪影響を
  及ぼす可能性があります。

## 廃棄方法

- 廃棄物は法令や自治体等の条例・規制等に従って適切に廃棄してください。

## 保証について

- 保証内容
  取扱説明書に記載した性能を保証します。使用期限内に品質に異常が生じた場合は、無償で製品を代替します。
  使用期限は製品ラベルに記載しています。
  使用期限内にご使用ください。

- 責任の制限
  如何なる場合にも、お客様の逸失利益、間接的損害、派生的な損害について、当社は一切責任を負いません。第三者からお客様に対してなされた損害賠償に基づく損害についても、当社は一切責任を負いません。
  また、お客様の操作方法、抗体の修飾効率により、イムノアッセイ評価試験での検出感度・判定結果が変わる場合があります。このような場合にお客様に何らかの損害が生じた場合であっても、当社は一切責任を負いません。
  さらに、如何なる場合にも、当社の損害賠償責任は本製品の代金相当額をもってその上限とします。

- 保証除外事項
  使用期限内に品質に異常が生じた場合でも以下の場合は保証対象から除外いたします。
  (1)誤って使用された場合、(2)保存方法が適切でなかった場合、(3)本製品に因らない理由で異常が生じた場合。

## お問い合わせ窓口

【輸入元】
アイシン精機株式会社
愛知県刈谷市相生町1丁目1番地1
アドバンススクエア刈谷8階
Phone: 0566-62-8146
Fax: 0566-62-8145
email: nano-colloid@aisin.co.jp

【製造元】
IMRA America, Inc. ナノバイオ部門
1044 Woodridge Ave. Ann Arbor, MI 48105, USA
Phone: +1-734-930-9211
Fax: +1-734-669-7403
email: nano@imra.com