

製品コード MK100

研究用

---

**TAKARA**

**Peptide Coating Kit**

---

説明書

v201703Da

## I. キットの概要

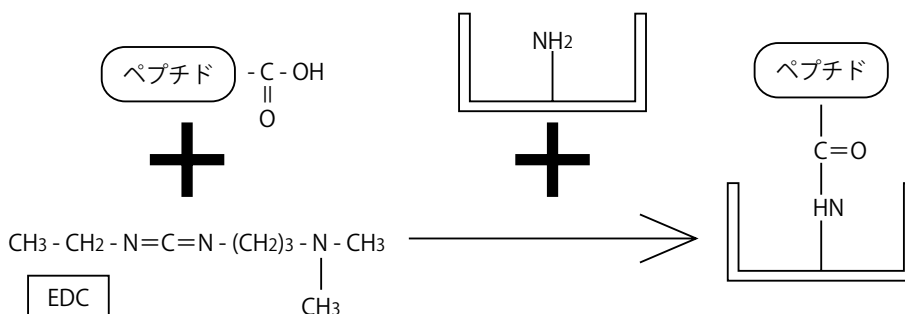
TaKaRa ペプチドコーティングキットは、通常は 96 ウェルマイクロプレートへの自然吸着が困難とされる低分子タンパク質や合成ペプチドなどを有効的にかつ容易に 96 ウェルマイクロプレートにコーティングさせることができる試薬キットです。

## II. 用途

- ペプチド、糖鎖、薬物、核酸等に体する抗体の検出 (ELISA 法等)
- ペプチド抗原量の測定 (競合 ELISA 法等)
- 生理活性ペプチド、糖鎖の応用実験・解析 (培養細胞の接着アッセイ等)

## III. 反応原理

低分子タンパク質または合成ペプチドのフリーのカルボキシル基 (-COOH) に Coupling Reagent (EDC) を反応させ、ひきつづきマイクロプレート底面に表出しているアミノ基 (-NH<sub>2</sub>) との間で架橋反応をおこすことにより、目的ペプチドを直接プレート底面にコーティングさせます。



ペプチドだけでなく、フリーのカルボキシル基を有する糖鎖、薬物、核酸などもプレートコーティングさせることができます。

## IV. キットの内容 (96 well × 5)

(1) Reaction Plate	96 well (8 well × 12 strips) × 5 plate
(2) Coupling Reagent	50 mg (5 ml 用)
(3) Reaction Buffer	50 ml
(4) Blocking Solution (ELISA 用)	50 ml × 2

---

## V. 使用方法

### 1. ペプチドの溶解と分注

目的のペプチド\*の必要量を (3) Reaction Buffer に 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように溶解し、(1) Reaction Plate に 50  $\mu\text{l}$ / ウェルとなるように分注する。

\* : アミノ基やカルボキシル基を有する緩衝液成分 (トリス、グリシンなど) は、ペプチド架橋反応を阻害します。それらの成分の混入がないサンプルをご使用ください。

### 2. Coupling Reagent 液の分注

< 5 プレート調製の場合 >

(2) Coupling Reagent のバイアルに蒸留水 5 ml を加えて融解し、すばやく (1) Reaction Plate に 10  $\mu\text{l}$ / ウェルになるように添加し、よく混合する。そのまま室温にて 2 時間放置する。

< 1 プレートずつ調製する場合 >

(2) Coupling Reagent を、マイクロチューブに 1 プレートあたり 10 mg 秤量し、蒸留水 1 ml で融解し、すばやく (1) Reaction Plate に 10  $\mu\text{l}$ / ウェルになるように添加し、よく混合する。

※ 1 (2) Coupling Reagent を必要量秤量した後、保存する場合は、吸湿を防ぐために必ず 4℃以下乾燥状態で保管してください。(シリカゲル等とともに密封してください。)

※ 2 Coupling Reagent は、必ず必要量を用時調製してください。融解後は直ちにご使用ください。

### 3. ペプチドコートプレートの作製

Reaction Plate 中の液を捨て、十分量の蒸留水でウェルを 3 回洗浄する。

### 4. ペプチドコートプレートのブロッキング (ELISA 等に使用する場合)

抗ペプチド抗体の反応等の実験に作製したペプチドコートプレートを使用する時は、キット内の (4) Blocking Solution を 3. のプレートのウェル中に 200  $\mu\text{l}$ / ウェルに添加して、そのまま室温にて 1 時間反応させる。(プレート底面への非特異的なタンパク質の吸着をブロックします。)

## VI. ペプチドコートプレートの保存

作製したペプチドコートプレートを保存する場合は、ブロッキング処理 [V. 使用方法 - 4.] を行わず、プレート内ウェル中の水分をよく取り除き、4℃以下乾燥状態で保存してください。(シリカゲル等とともに密封してください。)

## VII. 注意事項

1. 使用されるペプチドは高純度のものを御使用ください。爽雑タンパクやペプチド、アミノ酸、一部の緩衝液成分（トリス等）などが混入していると反応が妨害される危険性があります。
2. 使用されるペプチドにフリーのカルボキシル基（-COOH）がない場合はコート処理できません。

## VIII. 使用例

1. ハプテン抗原に対する抗体作製とその特異抗体の検出について

抗体の作製を行う場合、従来は抗原物質の精製からスタートせざるを得ず、そこにかかなりの時間をとられていた。最近では、数多くのタンパク質のアミノ酸配列が報告され、自動ペプチド合成技術が広く浸透したことにより、目的タンパク質のアミノ酸配列さえわかれば、その領域の合成ペプチドと適当な実験動物への免疫感作により、特異抗体の作製はかなり容易にかつ確実にできるようになった。この場合、自動合成装置で合成可能なペプチドの長さはおおよそ 20 ~ 30 残基で、通常はハプテン抗原として取扱うことになる。キャリアータンパク質（通常 BSA や KLH が使われる）にペプチドを結合させて動物に感作すると、キャリアーとペプチドの両方に対する抗体が産生されるため、目的のペプチド特異抗体がそのうちの程度の量があるかが問題となる。このような場合、本キットを用いて抗原ペプチドを直接コートした 96 ウェルマイクロプレートを作製し、そのペプチドに特異的な抗体を ELISA 法で検出確認することが可能である。

2. 難水溶性低分子ペプチドの固相吸着

抗体作製を目的としてその部分ペプチドを合成する場合、親水性領域を狙うことが多く、その場合、それらのペプチドは概ね水溶性となり、本キットにより簡単に固相化できる。しかし、ペプチドが Phe や Trp などの疎水性アミノ酸を多く含む場合、水性緩衝液に難溶であることが時々見受けられ、固相化の処理は困難になる。そのような場合でも、本キットを用いるとこれら難溶性ペプチドのマイクロプレートへの固相化を簡単に行うことができる。

### ●操作手順

- 1) Trp、Phe、Leu などの疎水性アミノ酸を多く含む低分子タンパクあるいはオリゴペプチドを、添付の Reaction Buffer の代わりにジメチルスルホキシド（スペクトル用）により、4  $\mu\text{g/ml}$  の濃度になるように溶解し、Reaction Plate 各ウェルに 50  $\mu\text{l}$  ずつ分注する。
- 2) Coupling Reagent を 5 ml のジメチルスルホキシドに溶かし、すばやくプレート各ウェルに 10  $\mu\text{l}$  ずつ添加し、よく混合する。そのまま室温で 2 時間静置する。
- 3) プレート内の反応液を捨て、大量の蒸留水でプレートを数回洗浄する。
- 4) 抗体やその他のタンパク質が非特異的にプレート底面に結合しないように、キット内の Blocking Solution でブロッキング処理する（37°C で 1 時間インキュベート）。

### 注意

ペプチド架橋反応系にアミノ基やカルボキシル基を有する緩衝液成分（トリス、グリシンなど）が混入すると、架橋反応が妨害される場合があるので、それらの混入がないサンプルをご使用ください。

### 3. ELISA によるペプチド特異抗体の検出

#### ●操作手順

- 1) 目的ペプチドを免疫したウサギより採血し、分離した血清を 1% BSA 含有 PBS にて適当に希釈し、プレート中で反応させる。
- 2) Peroxidase 標識 Anti-rabbit Ig を用いて酵素 (パーオキシダーゼ) 標識二次抗体および基質 (ABTS) 液を順次反応させ、抗ペプチド抗体を検出する。

#### 実験例

Papillomavirus E5 protein の一部の難水溶性ペプチド残基 (LFFLVWWDQFG) をコーティングしたプレートで、このペプチドを抗原として作製したウサギ血清を 10 倍率で段階希釈し、ELISA で検出を行った。その結果、難水溶性ペプチドへの強い抗体反応が確認できた。コントロールとして非構成アミノ酸の Lys のみをコートしたプレートで同一反応を実施したが、わずかな抗体反応が認められただけであった (図 1)

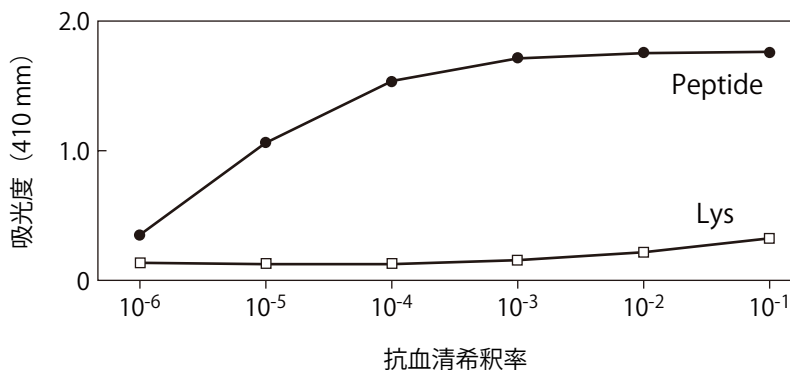


図 1. 難水溶性ペプチドコートプレート上での特異抗体による ELISA

## IX. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

**タカラバイオ株式会社**