

SARS-CoV-2 スパイク蛋白と ACE2 との 結合実験プロトコール



Code No. HAK-SPD_bio-1

2020 年 8 月 1 日作成

Code No. HAK-SPD_UL-1

Code No. HAK-ACE2_UL-1

【実験 1 : バインディングアッセイ】

準備する試薬類

- ・ヒト ACE2 蛋白・His タグ
- ・ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ
- ・HRP 標識ストレプトアビジン
- ・プレート固相液：PBS (-)
- ・蛋白希釈液/ブロッキング液：1%BSA/ PBS (-)
- ・洗浄液：0.05%Tween20 を含む PBS(-)
- ・HRP 基質液：TMB など
- ・停止液：2N H₂SO₄

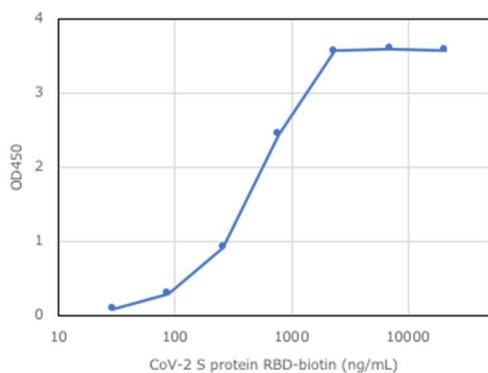
- ・96 穴プレート
- ・プレートシール
- ・プレートシェーカー
- ・プレートリーダー

試薬の調製方法

1. ヒト ACE2 蛋白・His タグの希釈調製 (1 ウエルあたり 100μL)
PBS(-)で 1μg /mL に希釈する。
2. ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグの希釈調製 (1 ウエルあたり 100μL)
1%BSA/PBS(-)で 29-21000ng/mL に希釈する(3 倍ずつ段階希釈)。
3. HRP 標識ストレプトアビジンの希釈調製 (1 ウエルあたり 100μL)
1%BSA/PBS(-)で使用製品メーカー取扱説明書に従って、希釈する。

測定方法

1. ヒト ACE2 蛋白・His タグを希釈調製する。
2. 96 穴プレートにヒト ACE2 蛋白・His タグを 1 ウエルあたり $100\mu\text{L}$ ずつプレートに加える。
3. 4°C で終夜、静置する。
4. 反応液を完全に除去し、各ウェルに $300\mu\text{L}$ の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
5. 1%BSA/PBS(-)を $200\mu\text{L}$ ずつプレートに加える。
6. 室温で 2 時間あるいは 4°C で終夜、ブロッキングする。
7. 反応液を完全に除去し、各ウェルに $300\mu\text{L}$ の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
8. 希釈調製したビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグを 1 ウエルあたり $100\mu\text{L}$ ずつプレートに加える。
9. 室温で 2 時間静置反応する。
10. 反応液を完全に除去し、各ウェルに $300\mu\text{L}$ の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
11. 希釈調製した HRP 標識ストレプトアビジンを各ウェルあたり $100\mu\text{L}$ ずつプレートに加える。
12. 室温で静置反応する（反応時間は使用製品メーカーの取扱説明書に従う）。
13. 反応液を完全に除去し、各ウェルに $300\mu\text{L}$ の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
14. 基質液を各ウェルに $100\mu\text{L}$ ずつ加え、室温で反応する。
15. 発色を確認後、各ウェルに $50\mu\text{L}$ ずつ停止液を加える。
16. プレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定する（測定波長： 450nm ）。



【実験 2：競合法による結合阻害物質スクリーニング】

準備する試薬類

- ・ヒト ACE2 蛋白・His タグ
- ・ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ
- ・SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ
- ・HRP 標識ストレプトアビシン
- ・プレート固相液：PBS (-)
- ・蛋白質希釈液/ブロッキング液：1%BSA/ PBS (-)
- ・洗浄液：0.05%Tween20 を含む PBS(-)
- ・HRP 基質液：TMB など
- ・停止液：2N H₂SO₄

- ・96 穴プレート
- ・プレートシール
- ・プレートシェーカー
- ・プレートリーダー

試薬の調製方法

1. ヒト ACE2 蛋白・His タグの希釈調製（1 ウエルあたり 100μL）
PBS(-)で 1μg /mL に希釈する。
2. ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグの希釈調製（1 ウエルあたり 50μL）
1%BSA/PBS(-)で 1200ng/mL（終濃度 600ng/mL）に希釈する。
3. SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ（結合阻害蛋白質コントロール）の希釈調製（1 ウエルあたり 50μL）
20-10000ng/mL（終濃度 10-5000ng/mL）の濃度範囲で希釈する（2 倍ずつ段階希釈）。
4. HRP 標識ストレプトアビシンの希釈調製
1%BSA/PBS(-)で使用製品メーカー取扱説明書に従って、希釈する。

測定方法

1. ヒト ACE2 蛋白・His タグを希釈調製する。
2. 96 穴プレートにヒト ACE2 蛋白・His タグを 1 ウエルあたり 100μL ずつプレートに加

える。

3. 4℃で終夜、静置する。
4. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
5. 1%BSA/PBS(-)を 1 ウェルあたり 200 μ L ずつプレートに加える。
6. 室温で 2 時間あるいは 4℃で終夜、ブロッキングする。
7. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
8. 希釀調製したビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc を 1 ウェルあたり 50 μ L ずつプレートに加える。
9. 結合阻害コントロールである SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc または評価する検体を 1 ウェルあたり 50 μ L ずつプレートに加える。
10. 室温で 2 時間静置反応する。
11. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
12. 希釀調製したペレオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを各ウェルあたり 100 μ L ずつプレートに加える。
13. 室温で静置反応する（反応時間は使用製品メーカーの取扱説明書に従う）。
14. 反応液を完全に除去し、各ウェルに 300 μ L の洗浄バッファーを加え、洗浄する。この操作を 3 回行う。
15. 基質液を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、室温で反応する。
16. 発色を確認後、各ウェルに 50 μ L ずつ停止液を加える。
17. プレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定する（測定波長：450nm）。
18. 阻害物質の添加による吸光度の低下を検出する。

