

# 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

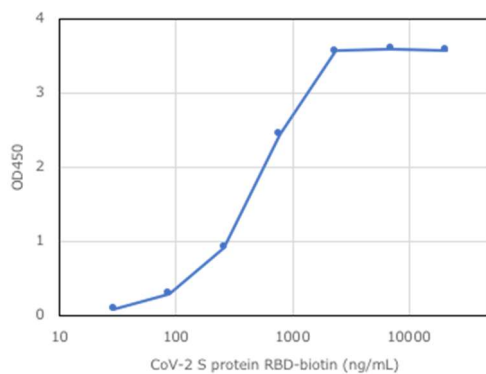
- ・ヒト ACE2 蛋白・His タグ
- ・ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ
- ・HRP 標識ストレプトアビジン
- ・プレート固相液：PBS (-)
- ・蛋白希釈液/ブロッキング液：1%BSA/ PBS (-)
- ・洗浄液：0.05%Tween20 を含む PBS(-)
- ・HRP 基質液：TMB など
- ・停止液：2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  
- ・96 穴プレート
- ・プレートシール
- ・プレートシェーカー
- ・プレートリーダー

### 試薬の調製方法

1. ヒト ACE2 蛋白・His タグの希釈調製（1 ウェルあたり 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 ウェルあたり 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 ウェルあたり 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 ウェルあたり 100 $\mu$ L ずつプレートに加える。
3. 4 $^{\circ}$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L ずつプレートに加える。
6. 室温で 2 時間あるいは 4 $^{\circ}$ 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 $\mu$ 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 ウェルあたり 100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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ジン
  - ・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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 
- ・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 ウェルあたり 100 $\mu$ L）  
PBS(-)で 1 $\mu$ g/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 ウェルあたり 50 $\mu$ L）  
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 ウェルあたり 50 $\mu$ L）  
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ジンの希釈調製  
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 ウェルあたり 100 $\mu$ L 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 300μL 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 200μL 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 300μL 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 を 1 ウェルあたり 50μL 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 50μL 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 300μL 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. 希釈調製したペル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 100μL 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 300μL 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 100μL ずつ加え、室温で反応する。
  16. 発色を確認後、各ウェルに 50μL 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。

