

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

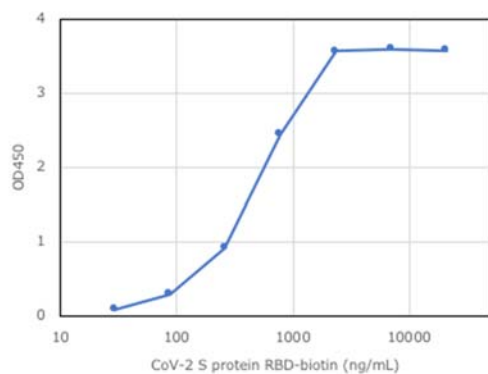
- ・96 穴プレート
- ・プレートシール
- ・プレートシェーカー
- ・プレートリーダー

試薬の調製方法

1. ヒト ACE2 蛋白・His タグの希釈調製（1 ウェルあたり 100 μ L）
PBS(-)で 1 μ 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 100 μ L）
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 100 μ L）
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 μ 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 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 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 $^{\circ}$ 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 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 μ 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 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。
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 μ 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 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。
14. 基質液を各ウェルに 100 μ 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 μ 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 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

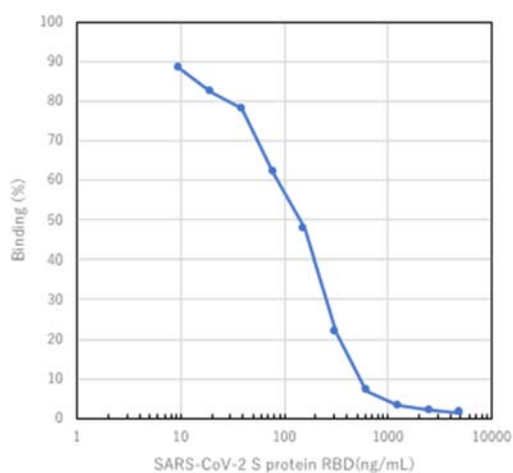
試薬の調製方法

1. ヒト ACE2 蛋白・His タグの希釈調製（1 ウェルあたり 100 μ L）
PBS(-)で 1 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 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°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 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。



Protocol for the binding assay of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein and ACE2



Code No. HAK-SPD_bio-1

Code No. HAK-SPD_UL-1

Code No. HAK-ACE2_UL-1

August 1, 2020

【Experiment 1, binding assay】

Reagents

- Human ACE2, His Tag
- Biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag
- HRP-labeled streptavidin
- Immobilization buffer : PBS (-)
- Dilution buffer/Blocking buffer : 1%BSA/ PBS (-)
- Washing buffer : PBS(-) containing 0.05%Tween20
- HRP substrate : TMB etc.
- Stopping solution : 2N H₂SO₄

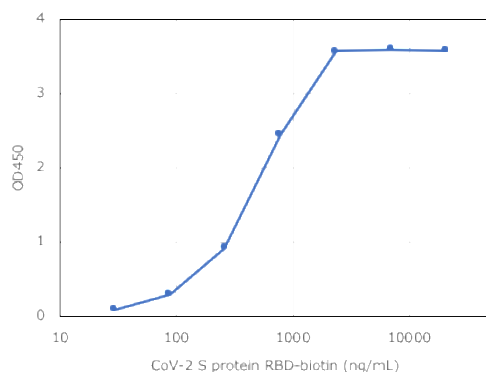
- 96-well plate
- Plate seal
- Plate shaker
- Plate reader

Preparation of reagents

1. Dilute human ACE2, His Tag with PBS(-) to 1 μg /mL. 100 μL of the solution is needed per well.
2. Dilute biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag with 1%BSA/PBS(-) to 29-21000ng/mL (serial dilution by three-fold). 100 μL of the solution is needed per well.
3. Dilute HRP-labeled streptavidin according to manufacturer's manual. 100 μL of the solution is needed per well.

Method for the measurement

1. Dilute human ACE2, His Tag.
2. Add 100 μL /well of human ACE2 in 96-well plate.
3. Stand at 4°C overnight.
4. Remove the reagent completely and add 300 μL /well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
5. Add 200 μL /well of 1%BSA/PBS(-).
6. As a blocking procedure, stand the plate at room temperature for 2 hours or at 4°C overnight.
7. Remove the reagent completely and add 300 μL /well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
8. Add 100 μL /well of diluted biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag.
9. Stand at room temperature for 2 hours.
10. Remove the reagent completely and add 300 μL /well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
11. Add 100 μL /well of diluted HRP-labeled streptavidin.
12. Stand at room temperature (reaction time should be referred to the manufacturer's manual) .
13. Remove the reagent completely and add 300 μL /well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
14. Add 100 μL /well of substrate solution to react at room temperature.
15. When the color developed, add 50 μL /well of stopping solution.
16. Measure the optical density (OD450) of each well by plate reader.



【Experiment 2 : Screening for the binding inhibitors by competition assay】

Reagents

- Human ACE2, His Tag
 - Bioin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag
 - SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag
 - HRP-labeled streptavidin
 - Immobilization buffer : PBS (-)
 - Dilution buffer/Blocking buffer : 1%BSA/ PBS (-)
 - Washing buffer : PBS(-) containing 0.05%Tween20
 - HRP substrate : TMB etc.
 - Stopping solution : 2N H₂SO₄
-
- 96-well plate
 - Plate seal
 - Plate shaker
 - Plate reader

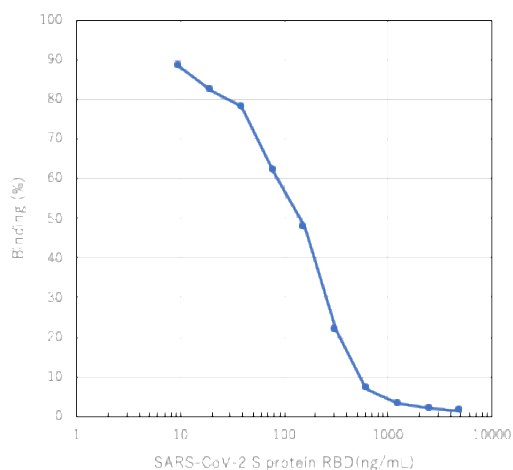
Preparation of reagents

1. Dilute human ACE2, His Tag with PBS(-) to 1μg /mL. 100 μL of the solution is needed per well.
2. Dilute biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag with 1%BSA/PBS(-) to 1200ng/mL. 50 μL of the solution is needed per well to make final concentration of 600ng/mL.
3. Dilute SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag with 1%BSA/PBS(-) to 20-10000ng/mL (serial dilution by two-fold) to make final concentration of 10-5000ng/mL.
4. Dilute HRP-labeled streptavidin according to manufacturer's manual.

Method for the measurement

1. Dilute human ACE2, His Tag.
2. Add 100 μL/well of human ACE2 in 96-well plate.
3. Stand at 4°C overnight.
4. Remove the reagent completely and add 300μL/well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
5. Add 200μL /well of 1%BSA/PBS(-).
6. As a blocking procedure, stand the plate at room temperature for 2 hours or at 4°C

- overnight.
7. Remove the reagent completely and add 300 μ L/well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
 8. Add 50 μ L/well of diluted biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag.
 9. Add 50 μ L/well of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, Rabbit IgG1 Fc tag as a control inhibitor or any inhibitor samples to be tested.
 10. Stand at room temperature for 2 hours.
 11. Remove the reagent completely and add 300 μ L/well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
 12. Add 100 μ L/well of diluted HRP-labeled streptavidin.
 13. Stand at room temperature (reaction time should be referred to the manufacturer's manual).
 14. Remove the reagent completely and add 300 μ L/well of washing buffer. Discard the washing buffer and repeat this washing process twice.
 15. Add 100 μ L/well of substrate solution to react at room temperature.
 16. When the color developed, add 50 μ L/well of stopping solution.
 17. Measure the optical density (OD450) of each well by plate reader.
 18. Check for the decrease in the absorbance caused by the binding inhibitors.



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル

URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)

TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619

TEL : (03) 5632-9620