

ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・

ウサギ Fc タグ (20 μ g)



Code No. HAK-SPD_bio-1

2020年8月1日作成

バックグラウンド

アンジオテンシン変換酵素 2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) は ACE ホモログとも呼ばれ、ACE とかなり相同性のある内在性膜タンパク質です。

ACE2 は血圧調節に関与するレニン・アンジオテンシン系で働く因子の一つとして知られていましたが、最近になり、COVID-19 の原因である新型コロナウイルスがヒトの細胞に感染する際、細胞膜に存在する ACE2 に結合してから細胞内に取り込まれることが明らかとなり、ACE2 は新型コロナウイルスの受容体でもあると考えられています。⁽¹⁾

別売試薬ヒト ACE2 蛋白・His タグを 96 穴プレートに固相し、本試薬ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグを加え、HRP 標識したストレプトアビジンで検出させることで、高感度なバインディング・アッセイを提供します。

製品情報

1. タンパク質構造

ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ(HAK-SPD_UL-1) は、SARS-CoV-2 Spike glycoprotein Receptor-binding domain の Arg319-Phe541 の C 末端にウサギ IgG1 Fc タグを付けて HEK293 細胞で発現させ、プロテイン A カラムを用いて精製し、ビオチン化したものが含まれています。

2. 純度

> 95% (SDS-PAGE)

3. 組成

ビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグ 1mg/mL

0.1% BSA, 0.1M-PBS(pH7.2~7.4)

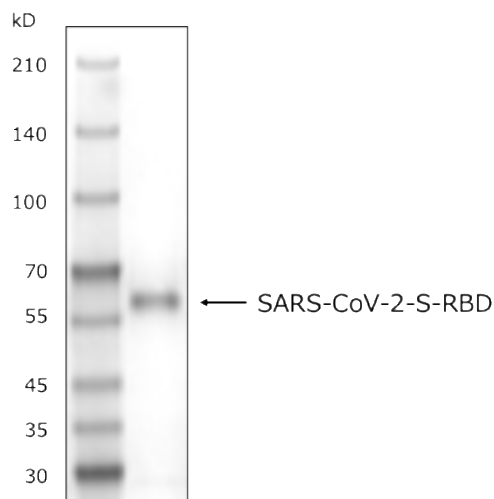
4. 保存

凍結融解の繰り返しは避けてください。

製品は受領時に -70°C 以下で保管して下さい。使用時に小分け分注を推奨します。

5. SDS-PAGE

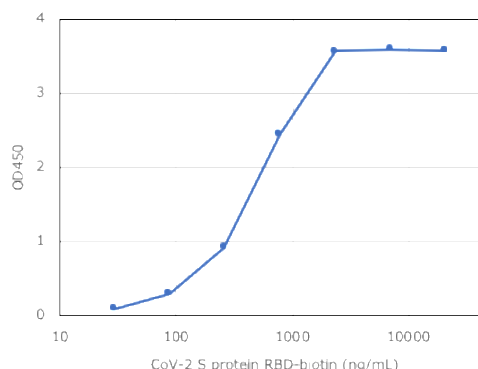
ビオチン化前の本製品 500ng を 4~20%グラジエント・ゲルで電気泳動し、CBB 染色した。



使用例

1. バインディング・アッセイ

固相化した 1 μ g/mL のヒト ACE2 蛋白 (100 μ L/ウェル)に 29-21000ng/mL のビオチン化 SARS-CoV-2 スパイク蛋白 RBD・ウサギ Fc タグを結合させ、HRP 標識ストレプトアビジンで検出した。この際の検量線において、線形範囲 (リニアレンジ) は 29-798ng/mL であった。



参考文献

- (1) Alexandra C. Walls, Young-Jun Park, et al., Cell 180, 1-12 (2020)

本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

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

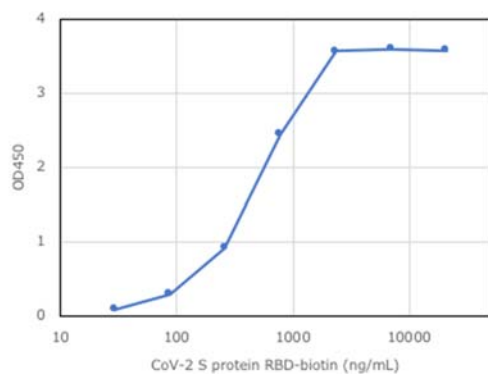
- ・96 穴プレート
- ・プレートシール
- ・プレートシェーカー
- ・プレートリーダー

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

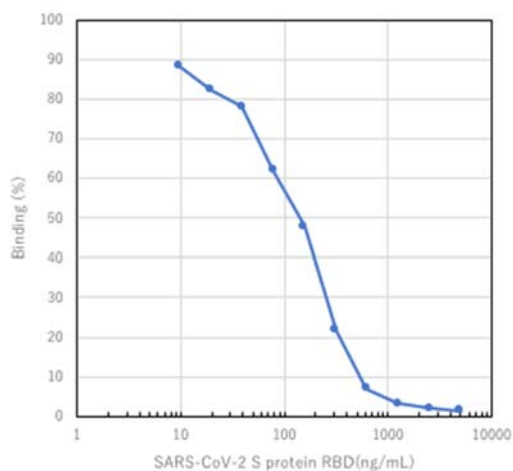
試薬の調製方法

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 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°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 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 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。



Biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein Receptor-binding domain, Rabbit IgG1 Fc Tag (20µg)



Code No. HAK-SPD_bio-1

Created on August 1, 2020

Background

Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), also called ACE homolog, is a membrane protein considerably homologous to ACE.

ACE2 was known as a factor in the renin-angiotensin system involved in blood pressure regulation.

Recently, it was clarified that the Spike glycoprotein of SARS-CoV-2 binds to ACE2 present on the cell membrane and then the virus is taken up into the cell when the infection occurs. Therefore, ACE2 is considered as a receptor for SARS-CoV-2 and this product (SARS-CoV-2 Spike glycoprotein Receptor-binding domain, Rabbit IgG1 Fc Tag) corresponds to the binding site of the Spike glycoprotein to the viral receptor ACE2 ⁽¹⁾.

As shown in the usage example, a highly sensitive binding assay can be performed by this product (HAK-SPD_bio-1) and human ACE2 His tag (HAK-ACE2_UL-1).

Product information

1. Protein Structure

Biotin-labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein Receptor-binding domain, Rabbit IgG1 Fc Tag (HAK-SPD_bio-1) contains Arg319-Phe541 of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein tagged with Fc region of rabbit IgG1 at its C-terminus. The protein was expressed and secreted from HEK293 cells, followed by the purification using a Protein A column and then biotinylated.

2. Purity

> 95% (SDS-PAGE)

3. Composition

SARS-CoV-2 Spike glycoprotein Receptor-binding domain, Rabbit IgG1 Fc Tag 1mg/mL

0.1M PBS(pH7.2~7.4)

0.1% BSA

4. Storage:

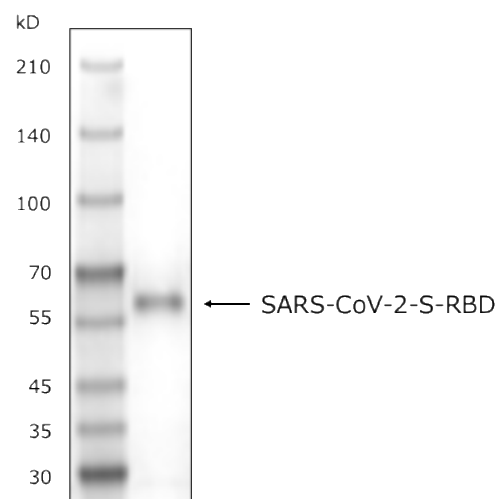
Please avoid repeated freeze-thaw cycles.

The product must be stored at -70°C or lower upon receipt.

It is recommended to make small aliquots when using.

5. SDS-PAGE

500ng of the product before biotinylation was electrophoresed on 4~20% gradient gel and stained with CBB.



Usage example

1. Binding assay

For research use only, not for diagnostic use.
Please read this manual carefully before use.

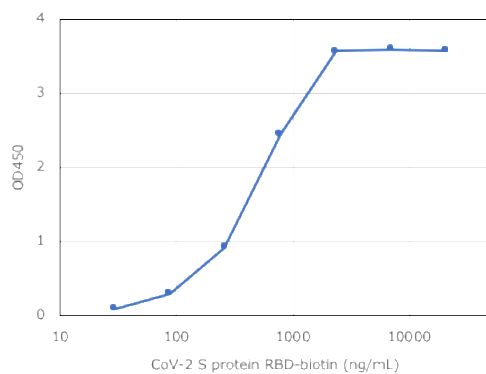
Biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein Receptor-binding domain, Rabbit IgG1 Fc Tag (20µg)



Code No. HAK-SPD_bio-1

Created on August 1, 2020

Human ACE2 His tag was immobilized in a 96-well plate by adding at 0.1µg/100 µL/well. Then 29-21000ng/mL of biotin labeled SARS-CoV-2 Spike glycoprotein Receptor-binding domain, Rabbit IgG1 Fc Tag was added to the wells. The binding was detected with HRP-labeled streptavidin. The linear range in the standard curve was 29-798ng/mL. Detail protocol for the binding assay is provided separately.



For research use only, not for diagnostic use.
Please read this manual carefully before use.

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

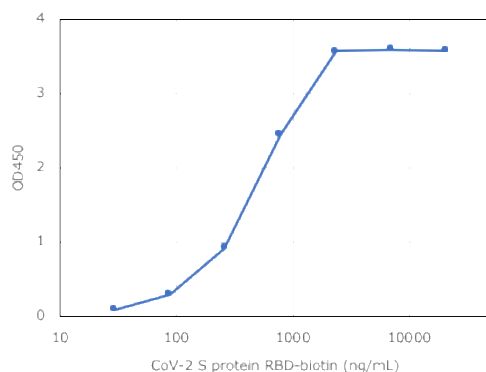
1. Dilute human ACE2, His Tag with PBS(-) to 1 μg /mL. 100 μL of the solution is needed per well.

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.

