

# - SulfoBiotics- Biotin-HPDP(WS) solution Technical Manual

はじめに

Biotin-HPDP(WS) は、Biotin-HPDP (製品コード B573) を改良した新しい水溶性ビオチンラベル化剤です。Biotin-HPDP は、タンパク質のスルフィドリル (SH) 基に可逆的なジスルフィド結合を介してビオチンを導入することができる試薬です。このジスルフィド結合は、還元剤によって容易に切断できるため、アビジン固定化樹脂などを用いたビオチンラベル化タンパク質の精製に有用です (Fig.1)。また、このような特性から、ニトロシル化、スルフィドリル化、パルミトイル化などのタンパク質のチオール修飾解析 (Biotin Switch Assay) に汎用されています。

しかしながら、Biotin-HPDP は DMSO、DMF、水などの溶媒に対する溶解性が低いため、溶液調製が困難という問題を抱えておりました。

-SulfoBiotics- Biotin-HPDP(WS) solution は、Biotin-HPDP の溶解性の問題を克服し、使用しやすい 20 mmol/l の水溶液タイプとした製品です。

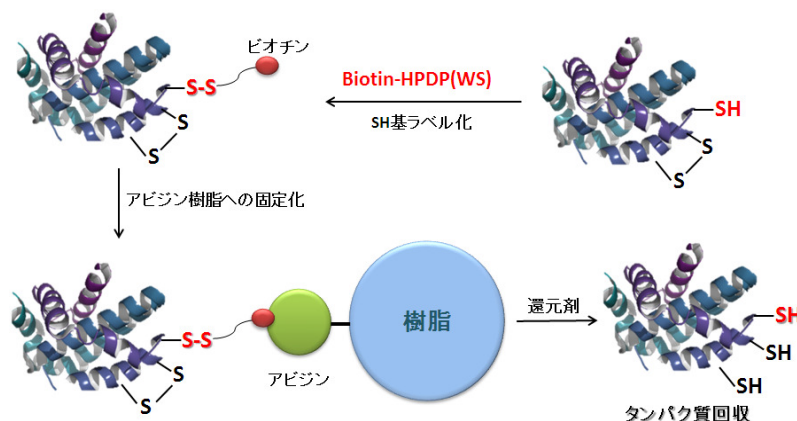


図 1 Biotin-HPDP(WS) によるチオール修飾およびタンパク質回収

内容 20 mmol/l Biotin-HPDP(WS) solution 500  $\mu$ l  $\times$  1

保存条件 冷蔵 (0-5  $^{\circ}$ C) にて保存してください。

使用上のご注意 **輸送中の振動により、内容物がチューブ壁面やキャップ表面に付着している場合がありますので、遠心してからご使用ください。**

使用方法 実験系に応じて適当なバッファーや水に希釈し、ご使用ください。  
**※ジチオスレイトール (DTT) やメルカプトエタノールなどの還元剤はラベル化反応に影響を及ぼすため、使用しないで下さい。**

実験例 - GAPDH のビオチンラベル化及びアビジン樹脂を用いた回収 -

<必要なもの>

- インキュベーター (37  $^{\circ}$ C)
- マイクロピペット (20  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1 ml)
- 遠心機
- マルチイメージャー
- 1.5 ml マイクロチューブ
- 10 K Filtration tube
- Lysis buffer : 6 mol/l Urea, 2% SDS, 150 mmol/l Tris-HCl (pH7.4) の水溶液
- RIPA buffer : 50 mmol/l Tris-HCl (pH8.0), 150 mmol/l NaCl, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% NP- 40
- Neutravidin<sup>TM</sup> Agarose (Thermo Fisher Scientific)
- Neutralization buffer : 20 mmol/l HEPES (pH7.7), 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 0.5% TritonX-100
- Neutralization buffer (+600 mmol NaCl) : Neutralization buffer, 600 mmol NaCl
- Elution buffer : 20 mmol/l HEPES (pH 7.7), 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 100 mmol/l 2-Mercaptoethanol
- Loading Buffer : 10% SDS, 50% Glycerol, 0.2 mol/l Tris-HCl (pH 6.8), 0.05% Bromophenol blue

<操作>

1. 1 mg/ml に調整した GAPDH (36 kDa) の PBS 溶液 10  $\mu$ l をマイクロチューブに入れ、Lysis buffer 35  $\mu$ l、100 mmol/l DTT (Lysis buffer) 溶液 5  $\mu$ l を加え、よく混合した。
2. マイクロチューブを 37  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした後、溶液全量を 10 K Filtration tube に移し、12,000 rpm で 10 分間遠心した。
3. PBS 50  $\mu$ l を操作 2 のチューブに加え、12,000 rpm で 10 分間遠心した。
4. 操作 3 をもう一度行った。
5. RIPA buffer 126  $\mu$ l、4 mmol/l Biotin-HPDP(WS) 水溶液 14  $\mu$ l を加え、よく混合した (終濃度 400  $\mu$ M)。
6. 37  $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした後、12,000 rpm で 10 分間遠心した。
7. PBS 50  $\mu$ l を操作 7 のチューブのメンブレン上に加え 12,000 rpm で 10 分間遠心した。
8. 操作 7 をもう一度行った。

9. Neutralization buffer 400  $\mu$ l を加えてピペティングでメンブレン上のタンパク質を溶解し、マイクロチューブに全量移した。
10. 操作 9 のマイクロチューブから 50  $\mu$ l の溶液をとり、あらかじめ Neutralization buffer で洗浄しておいた Neutravidin™ Agarose に加えよく混合した。
11. 4 °C で 1 時間静置した。
12. 2,500 rpm で 1 分間遠心し、ピペットマンで上澄みを除去した。
13. Neutralization buffer(+600 mmol/l NaCl) 1 ml を加え、2,500 rpm で 1 分間遠心し、上澄みを除去した。
14. 操作 13 を 2 回行った。
15. Neutralization buffer 1 ml を加え、2,500 rpm で 1 分間遠心し、上澄みを除去した。
16. 操作 15 をもう一度行った。
17. Elution buffer 50  $\mu$ l を加え、ボルテックスで良く混合した後、4 °C で 1 時間静置した。
18. 2,500 rpm で 1 分間遠心した後、上清 (回収したタンパク質溶液) を 1.5 ml マイクロチューブに移した。
19. 上清 10  $\mu$ l に Loading Buffer 2  $\mu$ l を加えよく混合し、SDS-PAGE (CBB 染色) およびウエスタンブロットにより解析した。

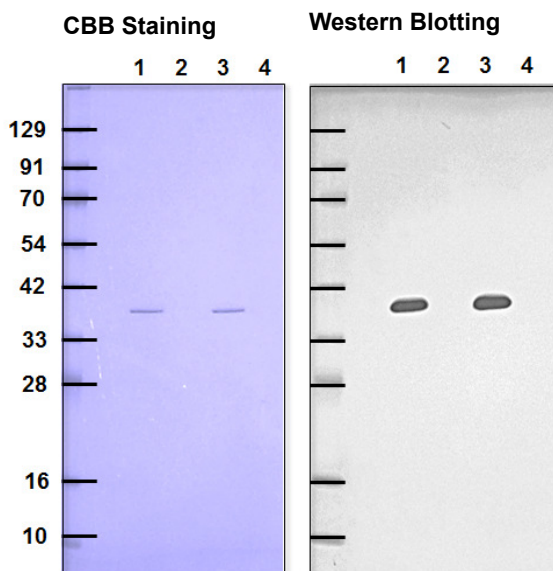


図 2 回収した GAPDH の検出  
(Biotin-HPDP と Biotin-HPDP(WS) の比較)

Lane 1: Biotin-HPDP  
 Lane 2: Biotin-HPDP (+NEM blocking)  
 Lane 3: Biotin-HPDP(WS) solution  
 Lane 4: Biotin-HPDP(WS) solution (+NEM blocking)  
 Primary antibody : Rabbit anti-GAPDH antibody  
 Secondary antibody : Goat anti-Rabbit antibody-POD conjugated  
 Chemiluminescence detection

※同濃度の Biotin-HPDP と Biotin-HPDP(WS) を使用して検討した結果、Biotin-HPDP と Biotin-HPDP(WS) は同等の性能であった。

#### 参考文献

- 1) S. R. Jaffrey and Solomon H. Snyder, "The Biotin Switch Method for the Detection of S-Nitrosylated Proteins", *Sci. STKE*, **2001**, 86, pl1.
- 2) X. Wang, N. Kettenhofen, S. Shiva, N. Hogg, and M. Gladwin, "Copper dependence of the biotin switch assay : modified assay for measuring cellular and blood nitrosated proteins", *Free Radic. Biol. Med.*, **2008**, 44, 1362.
- 3) M. T. Forrester, M. W. Foster, M. Benhar, and J. S. Stamler, "Detection of Protein S-Nitrosylation with the Biotin Switch Technique", *Free Radic. Biol. Med.*, **2009**, 46(2), 119.
- 4) M. D. Kornberg, N. Sen, M. R. Hara, K. R. Juluri, J. V. K. Nguyen, A. M. Snowman, L. Law, L. D. Hester, and S. H. Snyder, "GAPDH Mediates Nitrosylation of Nuclear Proteins", *Nat. Cell Biol.*, **2010**, 12(11), 1094.
- 5) J. Wan, A. F. Roth, A. O. Bailey, and N. G. Davis, "Palmitoylated proteins: purification and identification", *Nat. Protoc.*, **2007**, 1573.
- 6) A. K. Mustafa, M. M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. Mu, S. K. Gazi, R. K. Barrow, G. Yang, R. Wang, and S. H. Snyder, "H<sub>2</sub>S Signals Through Protein S-Sulfhydration", *Sci. Signal.*, **2009**, 2(96), ra72.

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.  
 30W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850 U.S.A.  
 Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687  
 URL: www.dojindo.com

<委託製造元>

株式会社 同仁化学研究所  
 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202  
 Tel:096-286-1515 Fax:096-286-1525 URL:www.dojindo.co.jp/  
 ドーজন・イースト (東京) Tel:03-3578-9651 Fax:03-3578-9650