

ビオチンを標識したい

利用製品

< ビオチン化試薬 >

- 少量抗体 (10 µg) 標識用 -	
Ab-10 Rapid Biotin Labeling Kit ※	[LK37]
- 抗体・タンパク質 (50-200 µg) 標識用 -	
Biotin Labeling Kit-NH ₂	[LK03]
Biotin Labeling Kit-SH	[LK10]
- 抗体・タンパク質 (1-5 mg) 標識用 -	
Biotinylation Kit (Sulfo-OSu)	[BK01]
- アミノ基標識用 -	
Biotin-OSu	[B304]
Biotin-AC ₅ -OSu	[B305]
Biotin-(AC ₅) ₂ -OSu	[B306]
Biotin-Sulfo-OSu	[B319]

-SH 基標識用 -	
Biotin-PE-maleimide	[B592]
Biotin-PEAC ₅ -maleimide	[B299]
- アルデヒド基・カルボン酸標識用 -	
Biotin-hydrazide	[B303]
Biotin-AC ₅ -hydrazide	[B302]
Biotin-(AC ₅) ₂ -hydrazide	[B301]

解析装置



※ 本製品の標識操作により、抗体中のアミノ基に標識体が結合します。そのため抗体によっては抗原認識能が失われる場合があります。ご不明な点は小社カスタマーサポート (Tel:0120-489548) へお問合せ下さい

1 はじめに

ビオチン-アビジン複合体を用いたシステムは、EIA(エンザイム免疫アッセイ)などの免疫学的測定や組織染色の分野で広く利用されている¹⁾。ビオチンは抗体や酵素の活性を消失することなく標識することが可能であり、アビジンはビオチン

に対して極めて高い親和性 ($K_a=10^{15} \text{ M}^{-1}$) をもつ²⁾。その結果、ビオチン-アビジン複合体を用いると、バックグラウンドの低減が可能となり検出感度が向上する。この特徴を利用した様々なアプリケーションが利用されている。

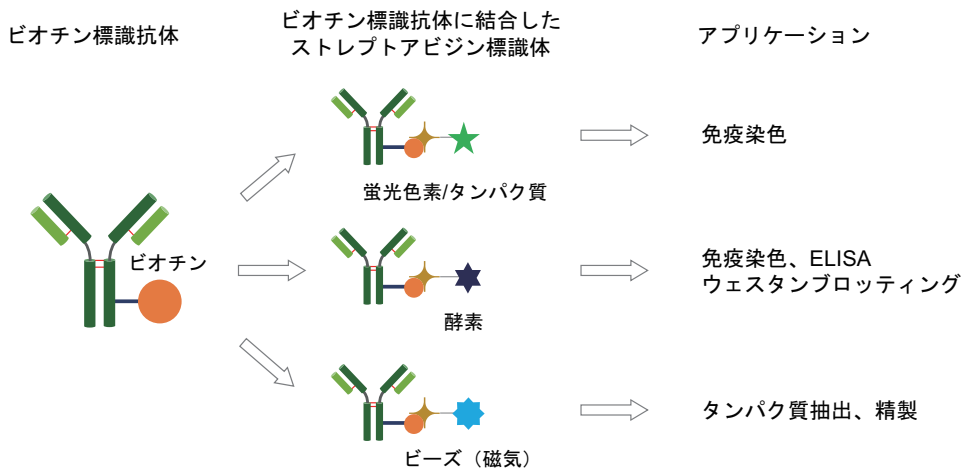


図1 ビオチン標識抗体とストレプトアビジン標識体によるアプリケーション選択例

一般にビオチン標識は各種抗原に対する一次抗体や抗 IgG、IgM 抗体などの二次抗体に対して行われる。ビオチン標識抗体で抗原抗体反応を行わせた後、酵素標識 (ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなど) または蛍光標識 (FITC など) されたアビジン、ストレプトアビジンなどを反応させ、酵素反応により生じた可視色素や標識された蛍光色素を検出するという方法がとられている³⁾。

ビオチンは、それ自身に化学修飾を施すことにより、抗体などのタンパクの各種官能基に結合させることが可能である。アビジンのビオチンに対する結合部位は深部にあるので、高分子へのビオチン化に際して、アビジンとの反応が阻害されることがある。この場合、ビオチン化試薬に適当なスペーサーを導入することにより、アビジンとの結合阻害を回避することができる⁴⁾。ビオチン化試薬は、標識するターゲットにより以下の3種に大別される。

1. アミノ基標識用
Succinimidyl タイプの試薬は、分子内に活性エステル基を有し、リシンの ε - アミノ基などの遊離の一級アミノ基と結合する。タンパク質のラベル化に適している。
2. チオール基標識用
Maleimide タイプや Pyridyl タイプの試薬は、システインなどの SH 基と結合する。タンパク質やチオール基をもつ含硫黄化合物のラベル化に適している (図 2)。
3. アルデヒド基標識用
Hydrazide タイプの試薬は、糖の還元末端のアルデヒド基と結合する。タンパク質や糖のラベル化に適している。

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

小社では、アミノ基およびチオール基への簡便なビオチン標識を可能にした、Ab-10 Rapid Biotin Labeling Kit、Biotin Labeling Kit -NH₂、Biotin Labeling Kit-SH 及び Biotinylation Kit (Sulfo-OSu) を製品化している。これらのキットを中心に、ビオチン標識体の作製法について紹介する。

ビオチン標識キット

サンプル量・種類	標識対象	品名
10 µg 抗体	-NH ₂	Ab-10 Rapid Biotin Labeling Kit
50-200 µg 抗体またはタンパク質	-NH ₂ -SH	Biotin Labeling Kit -NH ₂ Biotin Labeling Kit -SH
1-5 mg 抗体またはタンパク質	-NH ₂	Biotinylation Kit (Sulfo-OSu)

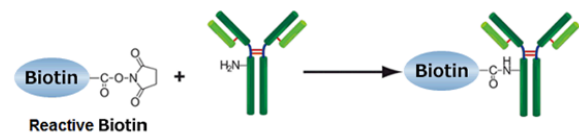


図2 IgGのアミノ基へのビオチン標識反応

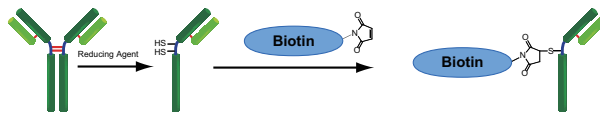


図3 IgGのSH基へのビオチン標識反応
(※ヒンジ部分以外のSS結合が還元される場合もある)

II Ab-10 Rapid Biotin Labeling Kit によるアミノ基へのビオチン標識 (Code: LK37)

1. キット内容

- Reactive Biotin
- Reaction Buffer
- Stop Solution

2. キット以外に必要なもの

- 20 µl, 200 µl マイクロピペット - マイクロチューブ (サンプル及び Working buffer 調製用)
- インキュベーター (37°C)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide)

3. 操作

- 1) Reaction Buffer を必要量 (最大 30 µl) マイクロチューブにとり、等量の DMSO を加え Working buffer を調製する。
- 2) 抗体量が 10 µg に相当する量の 0.5 ~ 1 mg/ml に調製した抗体溶液を別のマイクロチューブに入れる。
- 3) 操作2の抗体溶液に操作1で調製した Working buffer を加え、ピペッティングにより混合する。
- 4) 操作3の溶液を Reactive Biotin に加え、ピペッティングにより混合する。
- 5) 37°C で 10 分間反応する。
- 6) 操作5の溶液に Stop Solution を 28 µl 加え、ピペッティングにより混合する。
- 7) 37°C で 10 分間反応する。

- 8) 操作7の標識抗体を実験に用いる。または、冷蔵で保存する。
※ 抗体溶液に含まれる添加剤は、その濃度が高い場合に標識反応を妨害することがあります。詳細は取扱説明書参照。
※ 本製品の標識操作により、抗体中のアミノ基に標識体が結合します。そのため抗体によっては抗原認識能が失われる場合があります。ご不明な点は小社カスタマーサポート (Tel:0120-489548) へお問合せ下さい

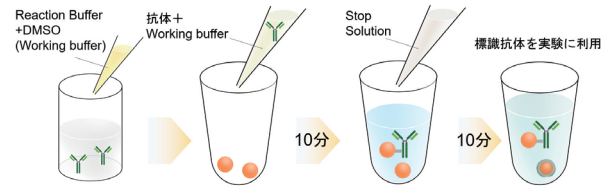


図4 ビオチン標識の操作

4. Biotin 標識抗体での検出例

< ミトコンドリアの免疫染色 >

- 1) µ-スライド 8 ウェル (ibidi 社製) に HeLa 細胞を播種し、37°C、5% CO₂ ガスインキュベーター内で一晩培養した。
- 2) 培地を取り除き、PBS で 3 回洗浄後、4% パラホルムアルデヒド / PBS 溶液を添加した。
- 3) 室温で 15 分間静置した。
- 4) 上清を取り除き、PBS で 3 回洗浄後、1% Triton-X / PBS 溶液を添加した。
- 5) 室温で 30 分間静置した。
- 6) 上清を取り除き、PBS で 3 回洗浄後、PBS で調製したブロッキング溶液を添加した。
- 7) 室温で 1 時間静置した。
- 8) ビオチン標識 - 抗ミトコンドリア抗体をブロッキング溶液で 50 倍希釈した。
※ 抗ミトコンドリア抗体 (ab3298) は abcam 社から購入。
- 9) 上清を取り除き 8 の溶液を添加した。
- 10) 冷蔵で一晩静置した。
- 11) 上清を取り除き、PBS-T で 3 回洗浄した。
- 12) 0.2 µg/ml ベルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを添加した。
- 13) 室温で 1 時間静置した。
- 14) 上清を取り除き、PBS-T で 3 回洗浄した。
- 15) 上清を取り除き、50 mmol/l トリス緩衝液 (pH 7.5) で 3 回洗浄した。
- 16) 上清を取り除き、0.2 mg/ml DAB (Code : D006)、0.003% H₂O₂、50 mmol/l トリス緩衝液 (pH 7.5) を添加した。
- 17) 室温で 10 分間静置した。
- 18) 上清を取り除き、50 mmol/l トリス緩衝液 (pH 7.5) で 3 回洗浄した後、50 mmol/l トリス緩衝液 (pH 7.5) を添加した。
- 19) 染色細胞を顕微鏡で観察した。

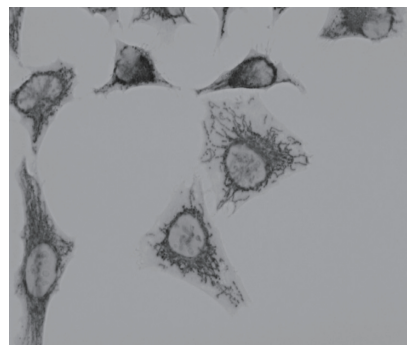


図5 ミトコンドリアの免疫染色画像

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

<HL60 細胞の蛍光染色>

- HL60 細胞の細胞懸濁液を 5.0×10^5 cells/tube となるようにマイクロチューブに分注した。
- $1,000 \times g$ で 2 分間、遠心分離を行い、上清を取り除いた。
- Suspension buffer [1% FBS (ウシ胎児血清), Hanks' HEPES balanced buffer] を $50 \mu\text{l}$ 添加した。
- 本キットで標識した Biotin 標識抗 CD44 抗体を $1 \mu\text{g}$ (抗体量として) 添加し、ボルテックスにより再懸濁した。
- 氷上で 30 分間静置した。
- $1,000 \times g$ で 2 分間、遠心分離を行い、上清を取り除いた。
- Fluorescein 標識ストレプトアビジンを添加し、ボルテックスにより再懸濁した。
- $1,000 \times g$ で 2 分間、遠心分離を行い、上清を取り除いた。
- Suspension Buffer を 0.5 ml 添加した。
- ボルテックスにより再懸濁し、フローサイトメーターにより蛍光強度を測定した。

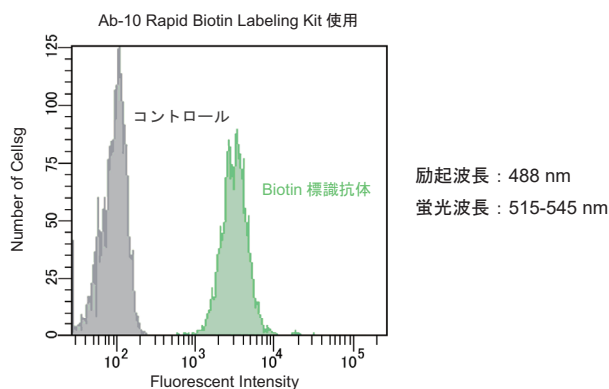


図 6 HL60 細胞の蛍光染色

FAQ

- Q: 抗体溶液に含まれる添加剤は標識反応に影響しますか?
 A: 抗体溶液中の添加剤によっては影響を受ける場合がございますので、ご使用前に必ず取り扱い説明書中の注意事項をご確認ください。
- Q: 使用可能な抗体のクラスには、どのようなものがありますか?
 A: 本製品は IgG 抗体へ標識するよう最適化しています。IgG 以外のクラス (IgM や IgA 等) では標識実績はございません。

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を弊社 HP にて掲載。ご興味のある方は、弊社 HP にて最新情報をご確認ください。

Ab-10 同仁 検索

III Biotin Labeling Kit - NH₂ によるアミノ基へのビオチン標識 (Code: LK03)

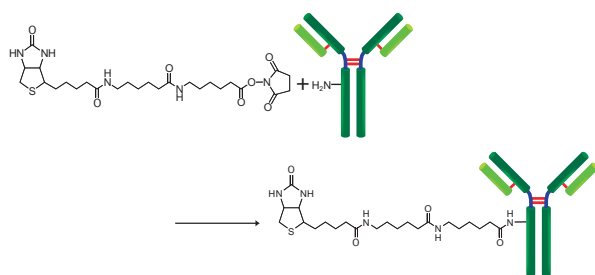


図 7 IgG のアミノ基へのビオチン標識反応

1. キット内容

- NH₂-Reactive Biotin
- WS Buffer
- Reaction Buffer
- Filtration Tube

2. キット以外に必要なもの

- $10 \mu\text{l}$ 、 $200 \mu\text{l}$ マイクロピペッター
- インキュベーター (37°C)
- マイクロチューブ (標識体保存用)
- 遠心機 (マイクロチューブ用)
- DMSO

3. 保存条件

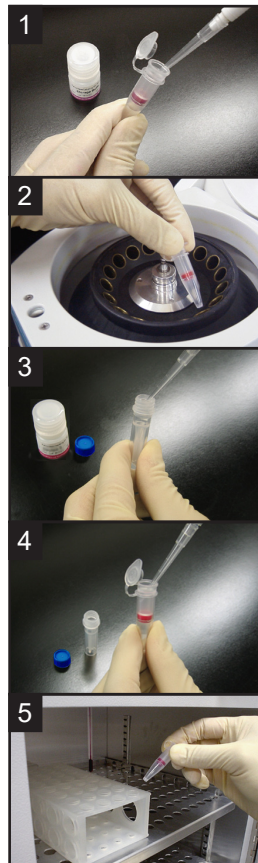
$0 \sim 5^\circ\text{C}$ で保存する。NH₂-Reactive Biotin は外袋を一旦開封後は -20°C で保存する。

4. 使用上の注意

本キットは分子量 $50,000$ 以上のタンパク質を対象としています。ビオチンを標識するタンパク質溶液に分子量 $10,000$ 以上の物質が含まれる場合は、あらかじめ精製を行なってください (抗体を精製したいを参照)。また、タンパク質溶液に不溶性の低分子物質が含まれる場合は、遠心して上清のみを標識反応に用いて下さい。

一回の標識操作に必要なタンパク質量は $50 \sim 200 \mu\text{g}$ です。冷蔵保存中もしくは室温に戻した際に、フィルトレーションチューブに水滴様の液粒が見られることがあります。これはメンブレンの乾燥防止剤が液粒化したもので、製品の性能に問題はありません。

5. 操作



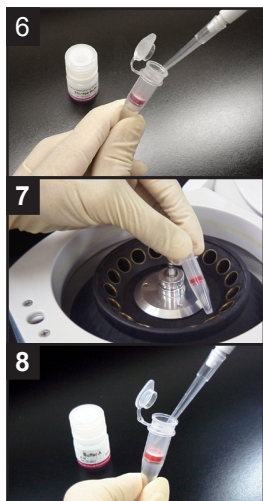
WS Buffer $100 \mu\text{l}$ とタンパク質 $50 \sim 200 \mu\text{g}$ を含むサンプル溶液^{a)}を Filtration Tube に入れ、ピペティングにより軽く混合する。

$8,000 \times g$ で 10 分間遠心する^{b)}。

NH₂-Reactive Biotin に $10 \mu\text{l}$ の DMSO を加え、ピペティングにより溶解する^{c)}。

Reaction Buffer $100 \mu\text{l}$ を加えた後、NH₂-Reactive Biotin を含む DMSO 溶液 $8 \mu\text{l}$ ^{d)} を Filtration Tube のメンブレン上加える。

ピペティングによりメンブレン上のタンパク質とよく混合した後、 37°C で 10 分間静置する。



6 WS Buffer 100 µl を Filtration Tube に入れ、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。遠心後、ろ液を捨てる。

7 WS Buffer 200 µl を Filtration Tube に入れ、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。この操作を再度

8 繰り返す。
WS Buffer 200 µl を Filtration Tube に入れ、10 回程度ピペティングし、標識体を回収する^{e)}。マイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する。

- 100 µl 以下のサンプル溶液量を使用すること。タンパク質濃度が 0.5 mg/ml 以下である場合には、操作 1 と 2 を繰り返す、タンパク質量が 50 ~ 200 µg となるようにすること。
- 溶液がフィルター上に残っている場合は、さらに 5 分間遠心する。
- NH₂-Reactive Biotin はチューブの底に入っているため、DMSO を加える際はチューブの底に入れ、軽くピペティングして溶解させる。
- タンパク質 200 µg に標識する場合、NH₂-Reactive Biotin DMSO 溶液は 10 µl 全量を加える。
- 標識体を回収する際は WS Buffer を使うことを推奨するが、必要に応じて各種の溶液を使用する。

IV アミノ基標識用ビオチンラベル化剤を用いたビオチンラベル化

1. 使用試薬

- 10 mmol/l Bicine Buffer(pH8.5)
- ビオチンラベル化剤
Biotin-OSu (Code: B304), Biotin-AC₅-OSu (Code: B305), Biotin-(AC₅)₂-OSu (Code: B306), Biotin Sulfo-OSu (Code: B319), Biotin-AC₅ Sulfo-OSu (Code: B320), Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu (Code: B321) Biotin-SS-Sulfo-OSu (Code: B572)
- DMSO (ジメチルスルホキシド, Code: SP10)
- NAP-5 (GE ヘルスケア社)
- PBS (pH7.4) (NaCl 8.0 g/l, KCl 0.2 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l)

2. タンパク質のビオチンラベル化の操作方法

(1) ビオチンラベル化剤溶液を、以下を参考に調製する (50 mmol/l)。

ビオチンラベル化剤	溶解方法 (50 mmol/l)
Biotin-OSu	3.4 mg/DMSO 200 µl
Biotin-AC ₅ -OSu	4.5 mg/DMSO 200 µl
Biotin-(AC ₅) ₂ -OSu	5.7 mg/DMSO 200 µl
Biotin Sulfo-OSu	4.4 mg/ 純水 200 µl
Biotin-AC ₅ Sulfo-OSu	5.6 mg/ 純水 200 µl
Biotin-(AC ₅) ₂ Sulfo-OSu	6.7 mg/ 純水 200 µl
Biotin-SS-Sulfo-OSu	6.1 mg/ 純水 200 µl

※ ビオチンラベル化剤は加水分解しやすいので、溶解後の操作は手早く行い、速やかに (2) の操作に移る。

(2) タンパク質のビオチンラベル化方法

- タンパク質を 10 mmol/l Bicine Buffer(pH8.5) に溶解する。
- タンパク質とビオチンラベル化剤の混合モル比が 1 : 2 ~ 1 : 10 となる様に (1) で調製したビオチンラベル化剤溶液を、(1) のタンパク質溶液に添加する。
- よく混和した後、振とうしながら恒温槽 (25°C) 中で 2 ~ 4 時間インキュベートする。

(3) ラベル化したタンパク質のゲルろ過精製

- NAP-5 の上部キャップを外し、充填液を捨てる。
- 流出口のキャップを外し、PBS を数 ml ずつピペットで取りカラムへロードする。
1 カラム当たり総量として 10 ml を流し、ゲルを平衡化させる。
- 2) でラベル化したタンパク質溶液のサンプルチューブから 500 µl をマイクロピペッターで測り取りカラムへロードする。この時の流出液は廃棄する。
- カラムの流出口に試験管などを置き、1.0 ml の PBS をマイクロピペッターでカラムにロードし、ビオチン標識したタンパク質を溶出する。

V Biotinylation Kit (Sulfo-OSu) を用いたビオチンラベル化 (Code: BK01)

1. キット内容

- Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu (ビオチン試薬)
- Sodium bicarbonate powder (NaHCO₃ 緩衝液用粉末)
- PBS Tablet
- Gel filtration column
- Sample Tube

2. タンパク質のビオチンラベル化の操作方法

1) 溶液調製

(1) NaHCO₃ 緩衝液

Sodium bicarbonate powder 入りポリ容器に、純水 10 ml を入れ、溶解する。

(2) PBS 溶液

PBS Tablet 1 錠を、100 ml メスフラスコに入れ、純水に溶解後、メスアップする。

(3) タンパク質溶液

サンプルチューブに、タンパク質 1.0 ~ 5.0 mg を精秤 (秤量値を記録) し、1) の NaHCO₃ 緩衝液をマイクロピペッターを用いて 500 µl 添加する。キャップを閉めた後、ボルテックス等を用いてタンパク質を攪拌溶解する。

(4) ビオチン試薬溶液

ビオチン試薬 Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu の入ったチューブ 1 本に純水を加え、溶解する。ラベル化率を制御するためにビオチン試薬を溶解する純水量と、ビオチン試薬溶液の添加量を調整する必要がある。表 1 を参考にされたい。

※ Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu は、加水分解しやすいので、溶解後の操作は手早く行い、速やかに (2) の操作に移る。

2) タンパク質のビオチンラベル化方法

(1) 目的とするラベル化率になるように (1) の 4) で作製したビオチン試薬溶液を、(1) の 3) のタンパク質溶液に添加する (表 1 参照)。

(2) キャップを閉め、ボルテックスを用いて混和した後、振とうしながら恒温槽 (25°C) 中で 2 時間インキュベートする。

3) ラベル化したタンパクのゲルろ過精製

- (1) カラムの上部キャップを外し、充填液を捨てる。
- (2) 流出口のキャップを外し、PBS 溶液を、数 ml ずつピペットでとり、カラムへロードする。1 カラム当り総量として 10 ml を流し、ゲルを平衡化させる。
- (3) (2) でラベル化したタンパク質溶液のサンプルチューブから、500 μ l をマイクロピペッターで測りとり、カラムへロードする。この時の流出液は廃棄する。
- (4) カラムの流出口に 2 ml サンプルチューブを置き、1.0 ml の PBS 溶液をマイクロピペッターにてカラムにロードし、ビオチン化されたタンパク質を溶出させる。
※ ビオチン化タンパク質の最終濃度は、ゲルろ過のため、ラベル化の際のタンパク質濃度の 1/2 となる。

3. 使用上の注意

- 1) キットは、冷蔵保存して下さい。
- 2) ビオチン試薬溶液は、用時調製して下さい。
(Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu は加水分解しやすいため、水溶液中での保存は避ける。)
- 3) ラベル化したタンパク質を保存する場合は、冷蔵保存して下さい。(0.1% アジ化ナトリウムなどの防腐剤を入れて保存する。)

VI Biotin Labeling kit-SH によるスルフィドリル基へのビオチン標識 (Code: LK10)

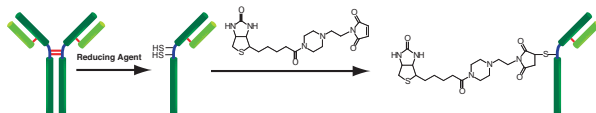


図 8 IgG のスルフィドリル基へのビオチン標識反応※
(※ ヒンジ部分以外の SS 結合が還元される場合もある。)

1. キット内容

- ・ SH-Reactive Biotin
- ・ Reducing Agent
- ・ WS Buffer
- ・ Reaction Buffer
- ・ Filtration Tube

2. キット以外に必要なもの

- ・ 10 μ l、200 μ l マイクロピペッター
- ・ インキュベーター (37°C)
- ・ マイクロチューブ (標識体保存用)
- ・ 遠心機 (マイクロチューブ用)
- ・ DMSO

3. 保存条件

0 ~ 5°C で保存する。SH-Reactive Biotin は外装袋を一旦開封後は -20°C で保存する。

4. 使用上の注意

本キットは分子量 50,000 以上のタンパク質を対象としています。ビオチンを標識するタンパク質溶液に分子量 10,000 以上の物質が含まれる場合は、あらかじめ精製を行なってください (抗体を精製したいを参照)。また、タンパク質溶液に不溶性の低分子物質が含まれる場合は、遠心して上清のみを標識反応に用いてください。

一回の標識操作に必要なタンパク質量は 50 ~ 200 μ g です。冷蔵保存中もしくは室温に戻した際に、フィルトレーションチューブに水滴様の液粒が見られることがあります。これはメンブランの乾燥防止剤が液粒化したもので、製品の性能に問題はありません。

5. 操作

1 WS Buffer 100 μ l とタンパク質 50 ~ 200 μ g を含むサンプル溶液^{a)} を Filtration Tube に入れ、ピペティングにより軽く混合する。

2 8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。

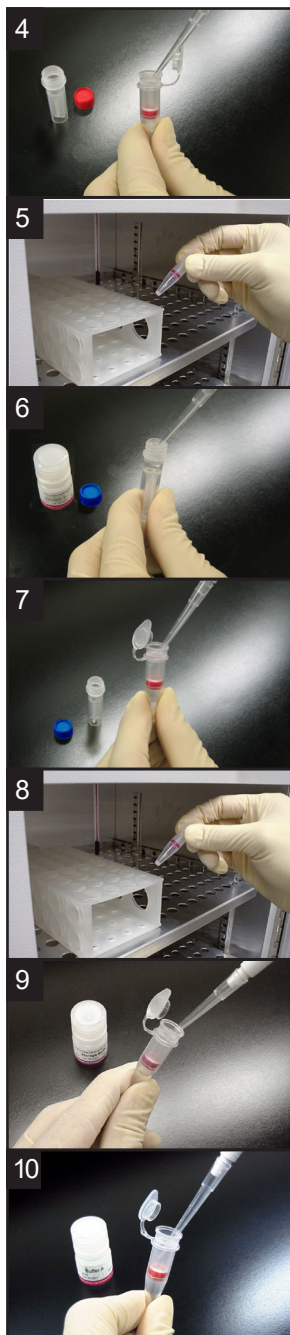
3 Reducing Agent^{c)} に 150 μ l の WS Buffer を加え、ピペティングにより溶解する。

表 1 Biotinylation Kit (Sulfo-OSu) を用いた場合の各種タンパク質に対するラベル化率

	タンパク質溶液の濃度	ビオチン試薬溶液添加量		混合比 ^{a)}	ラベル化率 ^{b)} (mol/mol)
		濃度	添加量 (μ l)		
rProtein A (MW=42,000)	5 mg/500 μ l	10 mg/355 μ l	5.7	2.0	1.8
			14.3	5.0	4.5
			28.6	10.1	7.5
	2.5 mg/500 μ l		2.9	2.0	1.5
			7.1	5.0	4.3
			14.3	10.1	8.1
	1.25 mg/500 μ l		1.4	2.0	1.8
			3.6	5.1	3.7
			7.1	10.0	7.3
BSA (MW=68,000)	2.5 mg/500 μ l	10 mg/567 μ l	2.9	2.1	1.6
			7.1	5.1	3.6
			14.3	10.2	6.4
IgG (MW=150,000)	2.5 mg/500 μ l	10 mg/1,218 μ l	2.9	2.1	1.3
			7.1	5.2	3.6
			14.3	10.5	6.6

上記結果は、小社での実測データであり、条件により若干変動する可能性がある。また、ラベル化率の算出は、VI の HABA 法により行った。

a) タンパク質 1 mol に対して混合したビオチン試薬のモル数 b) タンパク質 1 mol に結合したビオチンのモル数



4 操作3で調製した Reducing Agent 溶液 100 μ l を Filtration Tube のメンブレン上に加え、メンブレン上のタンパク質と混合する。

5 37°C で 30 分間静置した後、Reaction Buffer 100 μ l を Filtration Tube に入れ、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。

6 SH-Reactive Biotin に 10 μ l の DMSO を加え、ピペティングにより溶解する^{d)}。

7 Reaction Buffer 100 μ l を加えた後、SH-Reactive Biotin を含む DMSO 溶液 8 μ l^{e)} を Filtration Tube のメンブレン上に加え、メンブレン上のタンパク質と混合する。

8 37°C で 30 分間静置した後、WS Buffer 100 μ l を Filtration Tube に入れ、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。遠心後、ろ液を捨てる。

9 WS Buffer 200 μ l を Filtration Tube に入れ、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。この操作を再度繰り返す。

10 WS Buffer 200 μ l を Filtration Tube に入れ、10 回程度ピペティングし、標識体を回収する^{f)}。0.5 ml チューブに移し、0 ~ 5°C で保存する。

- a) 100 μ l 以下のサンプル溶液量を使用すること。タンパク質濃度が 0.5 mg/ml 以下である場合には、操作 1 と 2 を繰り返す、タンパク質量が 50 ~ 200 μ g となるようにする。
- b) 溶液がフィルター上に残っている場合は、さらに 5 分間遠心を行う。
- c) Reducing Agent がキャップの内側に付着している場合があるため開封にはご注意ください。
- d) SH-Reactive Biotin はチューブの底に入っているため DMSO を加える際はチューブの底に入れ、軽くピペティングして溶解させる。また、SH-Reactive Biotin は溶液状態では不安定である。DMSO に溶解後は直ちに操作 7へ進むこと。
- e) タンパク質 200 μ g に標識する場合、SH-Reactive Biotin DMSO 溶液は 10 μ l 全量を加える。
- f) 標識体を回収する際は WS Buffer の使用を推奨するが、必要に応じて各種の溶液を使用していただきたい。

VII SH 基標識用ビオチンラベル化剤を用いたビオチンラベル化

1. 使用試薬

- 10 mmol/l HEPES Buffer (pH8.0)
- 1,4-Dithiothreitol (DTT)
- ビオチンラベル化剤
 - Biotin-PE-maleimide (Code: B592), Biotin-PEAC₅-maleimide (Code: B299)
 - DMSO (ジメチルスルホキシド, Code: SP10)
 - NAP-5 (GE ヘルスケア社)
 - NAP-10 (GE ヘルスケア社)
 - PBS (pH7.4) (NaCl 8.0 g/l, KCl 0.2 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l)

2. 抗体のビオチンラベル化操作方法

1) SH 基を持つ抗体の調製方法

- (1) DTT を 200 mmol/l になるように PBS に溶解する。
- (2) タンパク質 1.0 ~ 5.0 mg を精秤 (秤量値を記録) し、マイクロピペッターにて HEPES Buffer を 500 μ l 添加し溶解する。
- (3) 2. のタンパク質溶液に (1) の DTT 溶液を 2 μ l 添加し、よく混和する。

2) ゲルろ過精製

- (1) NAP-5 の上部キャップを外し、充填液を捨てる。
- (2) 流出口のキャップを外し、PBS を数 ml ずつピペットで取り、カラムへロードする。1 カラム当たり総量として 10 ml を流し、ゲルを平衡化させる。
- (3) (1) で調製した抗体溶液のサンプルチューブから 500 μ l をマイクロピペッターで測り取り、カラムへロードする。この時の流出液は廃棄する。
- (4) カラムの流出口に試験管などを置き、1.0 ml の PBS をマイクロピペッターでカラムにロードし、還元した抗体を溶出する。

3) ビオチンラベル化方法

- (1) Biotin-PE-maleimide を DMSO に溶解する (50 mmol/l, 4.7 mg/200 μ l または 10 mg/424 μ l)。
※ Biotin-PEAC₅-maleimide の場合は 5.9 mg/200 μ l または 10 mg/342 μ l。
- (2) 抗体とビオチンラベル化剤のモル比が 1 : 10 程度となるように 3)-(1) で調製したビオチンラベル化剤溶液を、(2) の抗体溶液に添加する。
- (3) よく混和した後、振とうしながら恒温槽 (25°C) 中で一晩インキュベートする。

4) ラベル化した抗体のゲルろ過精製

- (1) NAP-10 の上部キャップを外し、充填液を捨てる。
- (2) 流出口のキャップを外し、PBS を数 ml ずつピペットで取りカラムへロードする。1 カラム当たり総量として 15 ml を流し、ゲルを平衡化させる。
- (3) 3) でラベル化した抗体溶液のサンプルチューブから 1 ml をマイクロピペッターで測り取りカラムへロードする。この時の流出液は廃棄する。
- (4) カラムの流出口に試験管などを置き、1.5 ml の PBS をマイクロピペッターでカラムにロードし、ビオチン標識した抗体を溶出する。

VIII アルデヒド基標識用ビオチンラベル化剤を用いたビオチンラベル化

1. 使用試薬

- ・ 150 mmol/l NaCl 含有 10 mmol/l MES Buffer (pH5.5)
- ・ 過ヨウ素酸ナトリウム溶液 (100 mmol/l NaIO₄; 上記 MES buffer で用時調製)
- ・ Biotin-hydrazide(Code: B303), Biotin-AC₅-hydrazide(Code: B302), Biotin-(AC₅)₂-hydrazide(Code: B301)
- ・ DMSO (ジメチルスルホキシド) (Code: SP10)
- ・ NAP-5(GE ヘルスケア社)
- ・ NAP-10(GE ヘルスケア社)
- ・ PBS buffer (pH7.4)

2. タンパク質のビオチンラベル化の操作方法

1) アルデヒド基を持つタンパクの調製方法

- (1) タンパク質 1.0 ~ 5.0 mg を精秤 (秤量値を記録) し、MES buffer を 500 μl 添加する。溶解後、氷浴上に冷却する。
- (2) 1) のタンパク質溶液に過ヨウ素酸ナトリウム溶液を 2 μl 添加し、よく混和して 0°C で 20 ~ 30 分反応させる。

2) タンパク質のゲルろ過精製

- (1) NAP-5 の上部キャップを外し、充填液を捨てる。
- (2) 流出口のキャップを外し、PBS を、数 ml ずつピペットでとり、カラムへロードする。1 カラム当り総量として 10 ml を流し、ゲルを平衡化させる。
- (3) 1) で調製したタンパク質溶液のサンプルチューブから 500 μl をマイクロピペットで測りとりカラムへロードさせる。この時の流出液は廃棄する。
- (4) カラムの流出口に試験管などを置き、1.0 ml の PBS をマイクロピペットにてカラムにロードし、酸化してアルデヒドを出したタンパク質を溶出する。

3) タンパク質のビオチンラベル化方法

- (1) ビオチン試薬 Biotin-hydrazide (50 mmol/l, 2.6 mg/200 μl) を DMSO に溶解する。(Biotin-AC₅-hydrazide の場合は 3.7 mg/200 μl, Biotin-(AC₅)₂-hydrazide の場合は 4.7 mg/200 μl)
- (2) 目的とするモル比になるように 1) で作製したビオチン試薬溶液を、(2) で得られたタンパク質溶液に添加する。
- (3) よく混和し、振とうしながら恒温槽 (25°C) 中で 4 時間インキュベートする。
- (4) ラベル化したタンパク質のゲルろ過精製
NAP-10 を使用し、(2) を参照して精製を行なう

IX HABA 法によるタンパクのラベル化率の算出

1. 原理

タンパク質へのビオチン試薬のラベル化率は、HABA(4-Hydroxy-azobenzene-2'-carboxylic acid) を用いた方法で調べることができる。

HABA はアビジンに取りこまれ 500 nm に吸収を持つ。一方、ビオチンは HABA よりアビジンに対する親和性が高いため、HABA-Avidin 溶液に、ビオチンラベル化したタンパク質を添加すると、HABA に代わってビオチンがアビジンと結合する。アビジンから HABA が解離すると 500 nm の吸光度が減少するため、その減少からビオチンのラベル化率を算出することができる。

2. 使用試薬

- ・ Avidin from Egg White : (nacalai tesque 035-53) 10 mg
- ・ HABA : (東京化成 H0586) 14 mg
- ・ DMSO : (Sp)DMSO (Code: SP10) 500 μl
- ・ PBS buffer (pH7.4) 20 ml
NaCl 8.0 g/l, KCl 0.2 g/l,
Na₂HPO₄ 1.15 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l

3. 測定及び算出方法

- 1) 2 ml サンプルチューブに HABA 14.0 mg を精秤し、マイクロピペットを用いて DMSO 500 μl を添加し溶解する。
- 2) 20 ml メスフラスコに Avidin 10.0 (± 0.1) mg を精秤し、PBS 15 ml を入れ溶解する (この時点では、20 ml 全量は添加しない)。これに上記 1) で調製した HABA-DMSO 溶液 200 μl をマイクロピペットで添加し、PBS で 20 ml に調整しよく混和する。
- 3) ミクロセル (容量 1 ml × セル長 1 cm) に、上記 2) の HABA-Avidin 溶液 900 μl をマイクロピペットを用いて入れ、500 nm の吸光度を測定する。3 回繰り返し測定し、3 回の平均値を Abs_A とする。このときの吸光度の値は Abs_A = 約 1.5 になる。
- 4) 2 ml サンプルチューブに、2) の HABA-Avidin 溶液 900 μl をマイクロピペットを用いて入れる。これにゲル濾過精製を行なったビオチン化タンパク質溶液 100 μl をマイクロピペットを用いて添加し、キャップを閉めた後、ボルテックスで攪拌する。
- 5) 5 分以上静置した後、マイクロピペットを用いてセルに移し変え 500 nm の値を読む (この値を Abs_B とする)。タンパク濃度が高い場合、系中のビオチンがアビジンよりも多くなるため、タンパク質に結合した正確なビオチン数が、HABA 法では算出できなくなることがある。このため、Abs_B = 0.7 以下の場合には、タンパク質溶液を適宜希釈 (希釈倍率: Z) した後、HABA-Avidin 溶液に添加してラベル化率を算出したほうが良い。
- 6) Abs_A と Abs_B の値より、下記の式に従いサンプル中のビオチン濃度 B (mol/l) を算出する。
$$B \text{ (mol/l)} = Z \times [10^{-2} \times (0.9 \times \text{Abs}_A - \text{Abs}_B) / 34]$$
- 7) タンパク質 1 分子に結合したビオチンの数を算出する。
例えば、Biotinylation Kit (Sulfo-OSu) を用いて、V の方法に従って、分子量 (MW) protein のタンパク質 Xg を標識したとすると、ゲルろ過精製後のタンパク濃度 A (mol/l) は、
$$A \text{ (mol/l)} = (X / \text{MW}_{\text{protein}}) \times 103$$

と表される。これから、
$$B / A = \text{タンパク質 1 分子に結合したビオチン数 (mol/mol)}$$
を得る。

X Biotin-SS-Sulfo-OSu でラベル化した細胞表面タンパク質の SDS-PAGE 解析¹⁾

Biotin-SS-Sulfo-OSu は、タンパク質のアミノ基と結合するビオチンラベル化剤で、スパーサー部分にジスルフィド結合を有する。ビオチン化したタンパク質をアビジンまたはストレプトアビジン固定化ビーズで精製した後、還元剤によりジスルフィド部分を還元することによって目的のタンパクを回収することができる。また、水溶性の高い試薬のため、試薬が細胞膜を透過しないことから細胞膜表面のタンパク質の解析にも応用される。

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

1. 使用試薬

- ・ ビオチンラベル化剤 Biotin-SS-Sulfo-OSu (Code: B572)
- ・ 反応停止液 (50 mmol/l Tris-HCl (pH8.0), 0.1mmol/l EDTA, 150mmol/l NaCl)
- ・ 細胞溶解液 (50 mmol/l Tris-HCl (pH8.0), 150 mmol/l NaCl, 0.2% NaN₃, 0.1% SDS, 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride^{*1}, 1 µg/ml aprotinin^{*1}, 1% Triton X-100, 0.5% Sodium deoxycholate (Code: D520))
- ・ Streptavidin 固定ビーズ
- ・ SDS-PAGE ローディングバッファー (60 mmol/l Tris-HCl(pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 350 mmol/l β-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)

2. 細胞表面タンパク質のビオチンラベル化の操作方法

- 1) 細胞を準備する (T-75 フラスコまたは 35 mm ディッシュ)。
- 2) 冷 PBS で 2 ~ 3 回洗浄する^{*2}。
- 3) 0.5 ~ 1 mg/ml Biotin-SS-Sulfo-OSu (PBS 溶液) を添加し、4°C で 30 分間、振とうしながら反応する。
- 4) 冷却した反応停止バッファーで 2 ~ 3 回洗浄後、冷 PBS にて 1 回洗浄する。
- 5) 細胞をスクレイパーでかき取り、遠沈管に移した後、遠心して細胞を沈殿させる。
- 6) 50 ~ 100 µl の細胞溶解液を添加し、30 分間氷上でインキュベートして細胞を溶解する。
- 7) 4°C で遠心して上清を新しいチューブに取り、タンパク質濃度を測定する。

3. 細胞表面タンパク質の分離精製

- 1) タンパク質 100 ~ 300 µg を含む細胞溶解液に Streptavidin 固定ビーズを添加し^{*3}、4°C で一晩振とうしながら反応させる。
- 2) 遠心してビーズを沈殿して上清を取り除く。
- 3) 細胞溶解液を加えた後^{*3}、遠心して上清を取り除く。この操作を 5 回繰り返す。
- 4) SDS-PAGE ローディングバッファーを沈殿ビーズに添加し^{*3}、37°C で 30 分間インキュベートする。
- 5) 遠心して得られた上清を新しいチューブに移して SDS-PAGE で電気泳動を行う。

4. 注意事項

- ※ 1 プロテアーゼ阻害剤：測定系に応じた阻害剤を選択する。
- ※ 2 細胞への影響を抑えるため素早く行う。
- ※ 3 Streptavidin 固定ビーズの取扱説明書を参考して、タンパク質濃度及び量、洗浄に用いる細胞溶解液及びローディングバッファー量を設定する。

参考文献

- 1) M. Wilchek, E. A. Bayer, Ed., "Methods Enzymol., Vol. 184 - Avidin-biotin technology", Academic Press, 1990.
- 2) N. M. Green, Avidin, Adv. Protein. Chem., 1975, 29, 85.
- 3) M. Wilchek, E. A. Bayer, "Applications of avidin-biotin technology Literature survey", Methods Enzymol., 1990, 184, 14.
- 4) N. M. Green, L. Konieczny, E. J. Toms, R. C. Valentine, "The use of bifunctional biotinyl compounds to determine the arrangement of subunits in avidin", Biochem. J., 1971, 125, 781.

以下に各種ビオチンを用いた標識および HABA 法についての文献をリストアップした。

Succinimidyl Biotins(Hydrophilic)

- 5) J. Wormmeester, F. Stiekema, C. de Groot, "Immunoselective cell separation", Methods Enzymol., 1990, 184, 314.
- 6) J. J. Leary, D. J. Ward, "Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose : Bio-Blots", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 4045.
- 7) W. T. Lee, D. H. Conrad, "The murine lymphocyte receptor for IgE. II. Characterization of the multivalent nature of the B lymphocyte receptor for IgE", J. Exp. Med., 1984, 159, 1790.
- 8) D. R. Gretsch, M. Suter, M. F. Stinski, "The use of biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin affinity chromatography to isolate herpesvirus hydrophobic proteins or glycoproteins", Anal. Biochem., 1987, 163, 270.
- 9) M. Shimkus, J. Levy, T. Herman, "A chemically cleavable biotinylated nucleotide : Usefulness in the recovery of protein-DNA complexes from avidin columns", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 2593.
- 10) W. J. LaRochelle, S. C. Froehner, "Immunochemical detection of proteins biotinylated on nitrocellulose replicas", J. Immunol. Methods, 1986, 92, 65.
- 11) P. S. R. Anjaneyulu, J. V. Staros, "Reactions of N-hydroxysulfosuccinimide active esters", Int. J. Peptide Protein Res., 1987, 30, 117.
- 12) H. M. Ingalls, C. M. Goodloe-Holland, E. J. Luna, "Junctional plasma membrane domains isolated from aggregating Dictyostelium discoideum amebae", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 4779.
- 13) J. Guesdon, T. Ternynck, S. Avrameas, "The use of Avidinbiotin interaction in immunoenzymatic techniques", J. Histochem. Cytochem., 1979, 27, 1131.
- 14) B. Feng and I. Tabas, "ABCA1-mediated Cholesterol Efflux Is Defective in Free Cholesterol-loaded Macrophages", J. Biol. Chem., 2002, 277 (45), 43271.
- 15) S. R. Witting, J. N. Maiorano and W. S. Davidson, "Ceramide Enhances Cholesterol Efflux to Apolipoprotein A-I by Increasing the Cell Surface Presence of ATP-binding Cassette Transporter A1", J. Biol. Chem., 2003, 278 (41), 40121.

Succinimidyl Biotins (Hydrophobic)

- 16) P. Kongtawelert, P. Ghosh, "A new sandwich-ELISA method determination of keratan sulfate peptides in biological fluids employing monoclonal antibody and labeled avidin biotin technique", Clin. Chem. Acta, 1990, 195, 17.
- 17) G. Paganelli, S. Perves, A. G. Siccardi, G. Rowlinson, G. Deleide, F. Chiolerio, M. Malcovati, G. A. Scassellati, A. A. Epenetos, "Interperitoneal radio-localization of tumors pretargeted by biotinylated monoclonal antibodies", Int. J. Cancer, 1990, 45, 1184.
- 18) C. Wagner, U. Kruger, J. E. Shivery, "Selective precipitation of biotin-labeled antigens or monoclonal antibodies by avidin for determining epitope specificities and affinities in solution- phase assays", Methods Enzymol., 1990, 184, 162.
- 19) D. M. Boorsma, J. VanBommel, E. M. H. VanderRaaij-Helmer, "Simultaneous immunoenzyme double labeling using two different enzymes linked directly to monoclonal antibodies or with biotin-avidin", J. Microscopy, 1986, 143, 197.
- 20) A. Komura, T. Tokushita, T. Nakagawa, A. Sasase, M. Ichihashi, S. Ferrone, Y. Mishima, "Specific killing of human melanoma cells with an efficient 10B-compound on monoclonal antibodies", Pigment Cell Res., 1989, 2, 259.
- 21) R. Rappuoli, P. Leoncini, P. Tarli, P. Neri, "Competitive enzyme immunoassay for human Chorionic somatomammotropin using the avidin-biotin system", Anal. Biochem., 1981, 118, 168.

Maleimido-type Biotin

- 22) S. Hashida, M. Imagawa, S. Inoue, K-H. Ruan, E. Ishikawa, T. Ueno, "More useful maleimide compounds for the conjugation of Fab' to horseradish peroxidase through thiol groups in the hinge", J. Appl. Biochem., 1984, 6, 56.
- 23) E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, T. Ueno, "Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining", J. Immunoassay, 1983, 4, 209.

24) H-J. Friesen, P. Hermentin P. Gronski, "Novel maleimidobiotins for the selective biotinylation of sulfhydryl", *Protides Biol. Fluids*, **1987**, *34*, 43.
 25) E. Ishikawa, S. Hashida, T. Kohno, T. Kotani, S. Ohtani, "Modification of monoclonal antibodies with enzymes, biotin and fluorochromes and their applications", *Immunol. Ser.*, **1987**, *33*, 113.
 26) R. B. del Rosalio, R. L. Wahl, "Disulfide bond-targeted radiolabeling : tumor specificity of a streptavidin-biotinylated monoclonal antibody complex", *Cancer Res. (Suppl.)*, **1990**, *50*, 804S.

Hydrazido-type Biotin

27) E. A. Bayer, H. Ben-Hur, M. Wilchek, "Biotin Hydrazide-A selective label for sialic acids, galactose and other sugars in glycoconjugates using avidin-biotin technology", *Anal. Biochem.*, **1988**, *170*, 271.
 28) N. F. Zaidi, C. F. Lagenaur, R. J. Hilker, H. Xiong, J. J. Abramson, G. Salama, "Disulfide linkage of biotin identifies a 106-kDa Ca²⁺ release channel in sarcoplasmic reticulum", *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 21737.
 29) M. Wilchek, J. M. Rosenberg, A. Reisfeld E. A. Edward, "Direct incorporation of biotin into DNA", *Methods Enzymol.*, **1990**, *184*, 608.
 30) M. R. Deziel, M. M. Mau, "Biotin conjugated reagent as sitespecific probes of membrane protein structure : application to the study of the human erythrocyte hexose transporter", *Anal. Biochem.*, **1990**, *190*, 297.
 31) D. J. O'Shannessy, "Antibodies biotinylated via sugar moieties", *Methods Enzymol.*, **1990**, *184*, 162.

HABA Assay

32) N. M. Green, "Spectrophotometric determination of avidin and biotin", *Methods Enzymol.*, **1970**, *18-A*, 418.

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料