

はじめに

Biotin Labeling Kit - NH₂ は、アミノ基を有するタンパク質、特に抗体ヘビオチンを標識するためのキットです。NH₂-Reactive Biotin は、その分子内に活性エステル基を有しているため、アミノ基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。標識反応を阻害するような低分子化合物（トリスやグリシンなど）や未反応の NH₂-Reactive Biotin は付属の Filtration Tube を用いて容易に除去することができます。本キットには、DMSO を除く標識に必要なすべての試薬と作製したビオチン標識体を保存するための溶液が含まれています。

キット内容

- NH₂-Reactive Biotin 1 tube
- WS Buffer 13 ml x 1
- Reaction Buffer 1.2 ml x 1
- Filtration Tube 1 tube
- 15 ml Tube (for counterbalance) 1 tube

保存条件

0 ~ 5°C で保存してください。ご購入後、未開封の状態 で 6 か月 安定です。

注意

アルミラミジップを一旦開封した後は、未使用の NH₂-Reactive Biotin は、アルミラミジップに入れたまま、チャックをしっかりと閉め、-20°C で保存してください。NH₂-Reactive Biotin 以外は、0 ~ 5°C で保存してください。

必要なもの (キット以外)

- 200 µl, 1 ml マイクロピペッター
- インキュベーター (37°C)
- DMSO
- 遠心機 (15 ml 遠沈管用)
- 2 ml 容量以上のチューブ (標識体保存用)

使用上の注意

- 分子量 50,000 以上で、反応性のアミノ基を有するサンプルへ標識することができます。
- 試料溶液中に標識対象以外の分子量 10,000 以上の物質が含まれる場合は、標識反応を阻害する恐れがあります。あらかじめ試料溶液を精製して、ご使用ください。
- 試料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。
- 冷蔵保存中もしくは室温に戻した際に、Filtration Tube に水適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ございません。
- 本キットには溶液の入ったマイクロチューブのコンポーネントが含まれています。チューブ内壁やキャップに溶液が付着していることがありますので、開封前に振り落としてからご使用ください。

プロトコール



操作 1.
WS Buffer 1 ml とタンパク質 1 mg を含む試料溶液^{a)}を Filtration Tube^{b)}に加える。15 ml Tube を用意する^{c)}。6,000 × g で 30 分間遠心する^{d)}。



操作 2.
ピペッティングにより軽く混合する。アングルローターの場合、6,000 × g で 30 分間遠心する^{d)}。



操作 3.
WS Buffer 1 ml を Filtration Tube^{b)}に加える^{b)}。



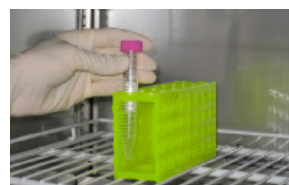
操作 4.
6,000 × g で 30 分間遠心する^{d)}。



操作 5.
DMSO 100 µl を NH₂-Reactive Biotin^{b)}に加える^{d)}、ピペッティングにより溶解する^{d)}。



操作 6.
Reaction Buffer 900 µl を Filtration Tube^{b)}に加えた後、NH₂-Reactive Biotin 溶液 80 µl を加える^{d)}。



操作 7.
ピペッティングにより混合した後、37°C で 10 分間反応する^{d)}。



操作 8.
WS Buffer 1 ml を Filtration Tube^{b)}に加える^{d)}。ろ液が 4 ml 以上の場合、操作 9 の前にろ液を捨てる^{d)}。



操作 9.
WS Buffer 2 ml を Filtration Tube^{b)}に加える^{d)}。6,000 × g で 30 分間遠心する^{d)}。この操作を再度繰り返す^{d)}。



操作 10.
WS Buffer 2 ml を加えて、10 ~ 15 回ピペッティングし、標識体を回収する。用意したチューブに移す。0 ~ 5°C で保存する^{d)}。

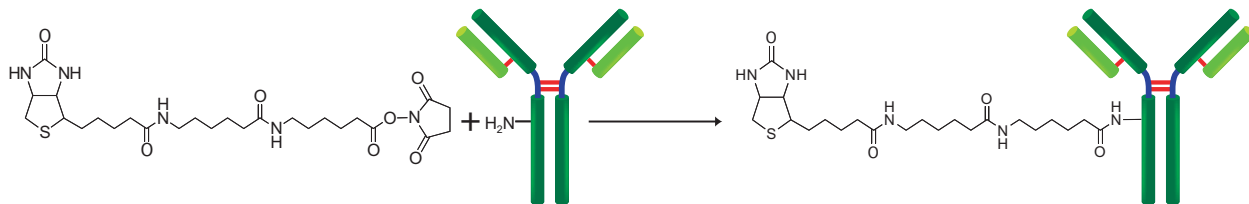
a) 液量は 3 ml 以下でご使用ください。IgG のサンプル溶液が 3 ml 以上となる場合には、操作 1 と 2 を繰り返して IgG 量が 1 mg となるように濃縮してください。濃縮操作において、ろ液が 4 ml 以上となった場合は、次の遠心操作を行う前にろ液を捨ててください。

b) Filtration Tube の重さを量り、同じ重さとなるように 15 ml Tube に水を入れてください。この 15 ml Tube を遠心時のバランスとして使用してください。

c) スイングローターの場合、4,000 × g 以下で遠心してください。溶液がメンブレン上に 100 µl 以上残っている場合には、さらに 10 分間遠心してください。遠心加速度が 6,000 × g 以下の場合、遠心時間を延長してください (例: 2,000 × g で 50 ~ 60 分間)。

d) NH₂-Reactive Biotin はチューブの底に入っています。DMSO を加える際はチューブの底に入れ、軽くピペッティングして溶解させてください。また、NH₂-Reactive Biotin は DMSO 中の水分により加水分解しやすいので、DMSO に溶解後は直ちに操作 6 へ進んでください。

e) 標識体を回収する際は WS Buffer を使うことを推奨しますが、必要に応じて各種の溶液をご使用ください。



Q & A

◆ 市販の抗体を用いて標識できますか？

標識できます。ただし、安定化剤としてゼラチンや血清アルブミンなどの高分子が添加されている抗体では、標識反応が阻害される場合があります。このような抗体をご使用の場合は、あらかじめアフィニティーカラムなどにより精製してご使用ください。精製法について、ご不明な点がございましたらお問い合わせください。

◆ このキットを使ってオリゴヌクレオチドやペプチドにペルオキシダーゼを標識することができますか？

オリゴヌクレオチドやペプチドは、Filtration Tube のメンブレンフィルター孔より分子量が小さく、メンブレンフィルター上に保持することができないため、ラベル化することはできません。

◆ 標識体を回収する際は、キット付属の WS Buffer を使う必要がありますか？

WS Buffer のご使用を推奨いたしますが、反応に応じて各種の保存溶液をご使用ください。

◆ ビオチン標識体はどのくらい安定ですか？

標識体の安定性はタンパク質自身の安定性に依存しますが、本キットを用いて rabbit IgG にビオチン標識した場合、4℃で2ヶ月は安定であることを確認しております。但し、長期保存する場合には等量のグリセロールを添加して、-20℃で保存してください。

◆ タンパク質1分子당にビオチンはいくつ導入できますか？

ビオチン導入数はタンパク質中の反応性のアミノ基数に依存します。IgG の場合、1分子당 7 ～ 10 個導入されます。

◆ ビオチン標識したタンパク質を生細胞へ添加したいのですが、注意点はありますか？

細胞状態をより安定に保つため、生細胞懸濁液を調製する際は、2 ～ 10% FBS を含む PBS を用いることをお勧めします。

◆ 標識体を回収する WS Buffer は、生細胞へ影響しませんか？

影響しません。WS Buffer 中には、細胞毒性を殆ど示さない量の安定化剤（界面活性剤）を含んでいます。もし細胞への影響が気になる場合は、別途任意のバッファーを用いて標識体を回収してください。

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.
30 W Gude Dr, Suite 260, Rockville, MD 20850
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
ドージン・イースト（東京） Tel: 03-3578-9651 Fax: 03-3578-9650