

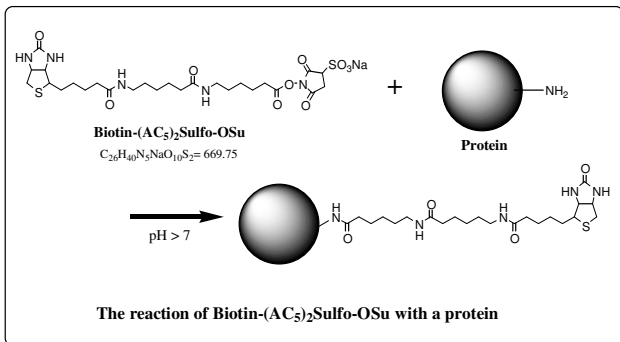
Technical Information

Biotinylation Kit (Sulfo-OSu)

I はじめに

アビジン-ビオチ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ます。ビオチンはタンパク質、抗体、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強い親和性 ($K_d \sim 10^{15} \text{mol/l}$) をもっています。ビオチンは、それ自身に化学修飾を施すことにより、タンパク質の各種の官能基に結合させることが可能です。

Biotinylation Kit (Sulfo-OSu) に用いたビオチン化試薬 : Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu は、結合部位としてタンパク質の遊離のアミノ基 (リジンの ϵ -アミノ基など) と結合する水溶性の活性エステルタイプ (Sulfosuccinimidyl biotins) であり、長いスペーサーを有するタイプです。キットには、1 ショットタイプの Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu (10mg) が 4 本、またラベル化用の NaHCO₃ 緩衝液用粉末、ゲルろ過カラム、カラム溶離用 PBS 錠剤も 4 つずつ入れております。



II キット内容

• Biotin-(AC ₅) ₂ Sulfo-OSu	× 4
• Sodium bicarbonate powder	× 4
• PBS tablet	× 4
• Gel filtration column	× 4
• Sample tube	× 8

III 特長

- このキットだけで、タンパク質のビオチンラベル化と精製が可能である。
- 1 ショットタイプ (10mg×4 vials) なので、それぞれ異なる 4 種類のタンパクラベル化が可能である。
- ビオチンラベル化剤である Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu の秤量等の手間がかからない。
- 用時調製タイプなので、開封を繰り返すことによる Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu の劣化がない。
- 水溶性のビオチンラベル化剤のため、DMF や DMSO などの有機溶媒を使用する必要がない。
- Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu 添加量を変えることで、ラベル化率のコントロールが可能である。
- Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu 1 vial 当たり、1~5mg までのタンパクのラベル化と精製が可能である。

IV キットの使用方法

(1) 溶液の調製

1) NaHCO₃ 緩衝液

Sodium bicarbonate powder 入りポリ容器に、純水 10 ml を入れ、NaHCO₃ 粉末を溶解する。

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トを用いて 500 μ l 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を攪拌溶解する。

4) ビオチン試薬溶液

Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu のチューブ 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。

(注) 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

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

表.1 各種タンパクに対するラベル化率

	タンパク溶液の濃度	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(μl)		
Protein A (MW=42,000)	5 mg / 500 μl	10 mg / 355 μl	5.7	2.0	1.8
			14.3	5.0	4.5
			28.6	10.1	7.5
	2.9		2.0	1.5	
	7.1		5.0	4.3	
	14.3		10.1	8.1	
BSA (MW=68,000)	2.5 mg / 500 μl	10 mg / 567 μl	1.4	2.0	1.8
			3.6	5.1	3.7
			7.1	10.0	7.3
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 μl	10 mg / 1218 μl	2.9	2.1	1.3
			7.1	5.2	3.6
			14.3	10.5	6.6

上記結果は、弊社での実測データである。また、ラベル化率の算出は、VのHABA法により行った。

a) タンパク1 molに対して混合したビオチン試薬溶液のモル比

b) タンパク1 molに結合したビオチンのモル数

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℃)中で2.0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

- 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10ml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、500μlをマイクロピペッターで測りとり、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2mlサンプルチューブを置き、1.0ml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。

ビオチン化されたタンパク質の最終濃度は、タンパク質の秤量値をXg、タンパク質を溶解させたNaHCO₃溶液の量をYml、タンパク質の分子量MW、ゲルろ過カラム操作によりタンパク質濃度は0.50mlロードして1.0ml流出することとなり1/2に希釈されることを考慮にいと、下記の式より算出される。

$$A \text{ (mol/l)} = (X \text{ g / MW Protein}) \times (1000 \text{ ml / Y ml}) \times 0.5$$

--- (式1)

例えば、Protein A (MW:42000) 15.0mgを精秤し、NaHCO₃溶液を3.0ml添加し溶解した時のProtein A濃度は、 1.19×10^{-4} mol/lである。ゲルろ過操作(2倍希釈)により、ビオチン化されたProtein Aの最終濃度は、 5.95×10^{-5} mol/lとなる。

V HABA法によるタンパク質のビオチン化率の算出

タンパク質にどの程度のビオチンがラベル化されたかを調べる手段として、HABA(4-Hydroxyazobenzene-2'-carboxylic acid)を用いた算出方法が知られている。

測定原理としては、HABA-アビジン溶液にビオチンを添加することで、HABAよりもビオチンの方がアビジンに対して高い親和性をもつため、HABAに代わってビオチンがアビジンと吸着する。その時の500nmにおける吸光度の減少からビオチンラベル化率を算出する方法である。

使用試薬

Avidin from Egg White (nacalai tesque社製 035-53)	10mg
HABA : [4-Hydroxyazobenzene-2'-carboxylic acid] (東京化成社製 H0586)	14mg
DMSO : (Sp)DMSO (同仁化学研究所社製)	500μl

測定方法

- 1) 2mlサンプルチューブにHABA 14.0 mgを精秤し、マイクロピペッターを用いてDMSO 500μlを添加し溶解する。
- 2) 20mlメスフラスコにAvidin 10.0(±0.1) mgを精秤し、PBS15 mlを入れ溶解する(この時点では、20ml全量は添加しない)。これにHABA-DMSO溶液200μlをマイクロピペッターを用いて加え、PBSで20 mlにメスアップしてよく混和する。
- 3) ミクロセル(容量1 ml・セル長1cm)に、上記1)のHABA-Avidin溶液900μlをマイクロピペッターを用いて入れ、500 nmの吸光度を測定する。これを3回繰り返し測定し、3回の平均値をAbs_Aとする。
- 4) 2 mlサンプルチューブに、1)のHABA-Avidin溶液900μlをマイクロピペッターを用いて入れる。これにビオチン化されたタンパク質溶液100μlをマイクロピペッターを用いて添加し、キャップを閉めた後、ボルテックスで攪拌する。5分間以上静置した後、マイクロピペッターを

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)

タンパク質濃度が高い場合、ビオチン添加量に比べてタンパク質に結合したビオチン数が頭打ちするような傾向が観測される。この現象は、ビオチンが結合したタンパク質がアビジンに対して過剰に存在する状態となり、HABA法からタンパク質に結合した正確なビオチン数が算出できなくなる。例えば、Protein A を例にとると、ビオチン化した Protein A 濃度が $30 \mu\text{mol/l}$ 以下になるように、カラム流出後の Protein A 溶液を希釈（希釈倍率：Z）してから、HABA-Avidin 溶液に添加してラベル化率を算出する。

5) 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を算出する。

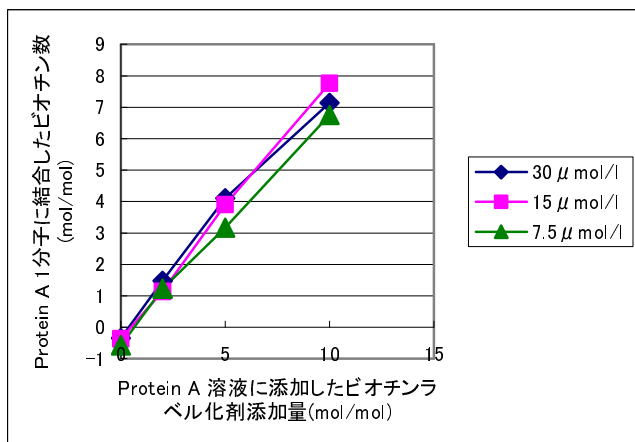
$$B \text{ (mol/l)} = Z \times [10^4 \times (0.9 \times Abs_A - Abs_B) / 34] \times 10^{-6}$$

= サンプル中のビオチン濃度 -- (式 2)

6) 式1と式2 よりタンパク質1分子をラベル化したビオチンの数を計算する。

$$(B / A) = \text{タンパク 1 分子に結合したビオチンの数 (mol/mol)}$$

-- (式 3)



- ◆ : Protein A 5 mg を 0.5 ml NaHCO_3 溶液に溶解し、所定のビオチン量でラベル化及びゲルろ過後の溶出液を 1/4 に希釈した濃度 ($30 \mu\text{mol/l}$)
- : Protein A 2.5 mg を 0.5 ml NaHCO_3 溶液に溶解し、所定のビオチン量でラベル化及びゲルろ過後の溶出液を 1/4 に希釈した濃度 ($15 \mu\text{mol/l}$)
- ▲ : Protein A 1.25 mg を 0.5 ml NaHCO_3 溶液に溶解し、所定のビオチン量でラベル化及びゲルろ過後の溶出液を 1/4 に希釈した濃度 ($7.5 \mu\text{mol/l}$)

使用上または取扱い上の注意

- ・キットは、冷蔵にて保存してください。
- ・ビオチン試薬は、用時調製してください。
(Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu は、加水分解しやすいので。水溶液による保存は避けて下さい。)
- ・ラベル化したタンパク質を保存する場合、冷蔵保存してください。
(防腐剤として、0.1%のアジ化ナトリウムを入れてください。)

参考文献

- 1) J. Wormmeester, F. Stiekema and C. Groot, *Methods Enzymol.*, **184**, 314 (1990).
- 2) J. J. Leary, D. J. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4045 (1983).
- 3) W. T. Lee, D. H. Conrad, *J. Exp. Med.*, **159**, 1790 (1984).
- 4) D. R. Gretch, M. Suter, M. F. Stinski, *Anal. Biochem.*, **163**, 270 (1987).
- 5) M. Shimkus, J. Levy, T. Herman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2593 (1985).
- 6) W. J. LaRoche, S. C. Froehner, *J. Immunol. Methods*, **92**, 65 (1986).
- 7) P. S. R. Anjaneyulu, J. V. Staros, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **30**, 117 (1987).
- 8) H. M. Ingalls, C. M. Goodloe-Holland, E. J. Luna, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4779 (1986).
- 9) J. Guesdon, T. Ternyck, S. Avrameas, *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 1131 (1979).

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
熊本テクノリサーチパーク 〒861-2202

Tel: 096-286-1515(代表) Fax: 096-286-1525

ドーজন・イースト(東京)

東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F
〒105-0012

Tel: 03-3578-9651(代表) Fax: 03-3578-9650