

## はじめに

Biotin Labeling Kit - NH<sub>2</sub>は、アミノ基を有するタンパク質、特に抗体へビオチンを標識するためのキットです。キット付属の NH<sub>2</sub>-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 NH<sub>2</sub>-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

- NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin ..... 3 tubes  
 - Reaction Buffer ..... 500 µl × 1  
 - WS Buffer ..... 4 ml × 1  
 - Filtration Tube ..... 3 tubes

## 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 1 年間安定です。

### 注意

NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin は、アルミラミジップに 3 本入っています。アルミラミジップを一旦開封した後は、未使用の NH<sub>2</sub>-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。NH<sub>2</sub>-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)

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

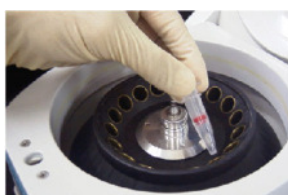
## 使用上の注意

- 分子量が 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ございません。

## プロトコール



操作 1.  
WS Buffer 100 µl とタンパク質 50~200 µg を含む試料溶液<sup>a)</sup>を Filtration Tube に加える。



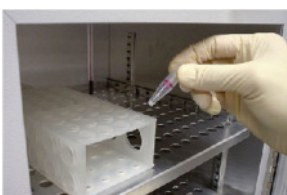
操作 2.  
ピペッティングにより軽く混合した後、8,000 × g で 10 分間遠心する<sup>b)</sup>。



操作 3.  
NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin に 10 µl の DMSO を加え、ピペッティングにより溶解する<sup>c)</sup>。



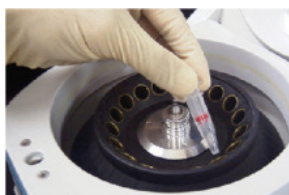
操作 4.  
Filtration Tube のメンブラン上に Reaction Buffer 100 µl を加えた後、NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin を含む DMSO 溶液 8 µl<sup>d)</sup>を加える。



操作 5.  
ピペッティングによりメンブラン上のタンパク質とよく混合した後、37°C で 10 分間反応する。



操作 6.  
WS Buffer 100 µl を Filtration Tube に入れ、8,000 × g で 10 分間遠心する<sup>b)</sup>。遠心後、ろ液を捨てる。

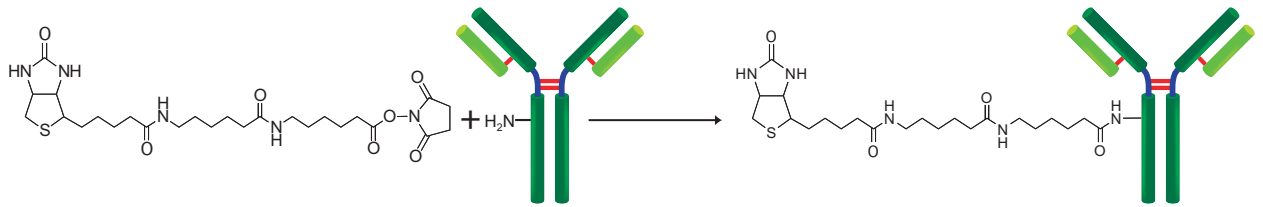


操作 7.  
WS Buffer 200 µl を Filtration Tube に入れ、8,000 × g で 10 分間遠心する<sup>b)</sup>。この操作を再度繰り返す。



操作 8.  
WS Buffer 200 µl を Filtration Tube に入れ、10 回程度ピペッティングし、標識体を回収する。マイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する<sup>e)</sup>。

- a) 液量は 100 µl 以下でご使用ください。タンパク質濃度が 0.5 mg/ml 以下の場合には、操作 1 と 2 を繰り返してタンパク質量が 50 ~ 200 µg となるように濃縮してください。  
 b) 溶液がメンブラン上に残っている場合は、さらに 8,000 × g で 5 分間遠心してください。  
 c) NH<sub>2</sub>-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、NH<sub>2</sub>-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 4 へ進んでください。  
 d) タンパク質 200 µg に標識する場合、NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin DMSO 溶液は 10 µl 全量を加えてください。  
 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

- ◆ このキットを使って、どのようなタンパク質にビオチンを標識することができますか？  
分子量が 50,000 以上で、反応性のアミノ基を有していれば標識できます。
- ◆ 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ご相談ください。
- ◆ 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°C で 2 ヶ月は安定であることを確認しております。ただし、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°C で保存してください。
- ◆ タンパク質 1 分子あたり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の数に依存します。rabbit IgG の場合、1 分子あたり 7 ~ 10 個導入されます。
- ◆ 使用できるタンパク質が少量しかないのですが？  
本キットはタンパク質量 50 ~ 200 µg でのご使用を推奨しておりますが、10 µg でも標識は可能です。ただし、10 µg のタンパク質を標識する場合は 50 ~ 200 µg の場合と比較して、バックグラウンドの上昇などの問題が生じる可能性があります。
- ◆ このキットを使ってタンパク質以外のオリゴヌクレオチドやペプチドにビオチンをラベル化することはできますか？  
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。
- ◆ 本キットと弊社製品 BK01 Biotinylation Kit(Sulfo-OSu) との違いは？  
推奨する標識タンパク質の量が異なります。Biotinylation Kit(Sulfo-OSu) は 1 ~ 5 mg のタンパク質のビオチン化と精製が可能ですが、本キットは 50 ~ 200 µg と Biotinylation Kit(Sulfo-OSu) に比べて、より少量のタンパク質のビオチンラベル化に適しています。
- ◆ ビオチン標識したタンパク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？  
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。細胞への影響が気になる場合は、別途任意の buffer 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