

ビオチン化プロトコル

ビオチン化試薬として、NHS-PEG4-biotin (Thermo 社) を用います。NHS 基がタンパク質のリジン残基などの 1 級アミンと共有結合を形成し、PEG4 リンカーを挟む形でビオチンが導入されます。

ほぼサプライヤー側のプロトコルに従いますが、混合モル比のみ 1 : 1 で行って下さい (元プロトコルではビオチン 20 のタンパク 1 の比)

弊社調整ビオチン試薬 : 100mM biotin-PEG4-NHS (/ 100%DMSO) (凍結保存)
一般的な反応バッファー : PBS (もしくはアミン不含の中性バッファー)

最も簡単な方法はタンパク質原液のモル濃度と同じ濃度のビオチン試薬を調整し、それをタンパク質溶液と 1 : 1 比で混ぜる方法です。

例 :

タンパク質 (30kDa) が 500ug/mL ある場合。タンパク質はおおよそ 17uM と計算される。

↓

ビオチン試薬は 100mM なので、5,800 倍希釈すれば 17uM 溶液となる。

①114uL PBS に 2uL の 100mM biotin を加える。(1.7mM) (58 倍希釈)

②990uL PBS に 10uL の①溶液を加える (17uM) (100 倍希釈)

↓

②の溶液 50uL とタンパク質溶液 50uL を加え良く攪拌する。

↓30 分 (常温) or 2 時間~オーバーナイト (4℃) などで静置反応

反応完了。未反応残ビオチンを取り除くために、カラム精製や透析を行う。(次項)

※ビオチン化試薬 (100%DMSO 中) は数回の凍結融解に耐えます。残った試薬溶液はできるだけ早く凍結して保存して下さい。水系に希釈したビオチン化試薬は数十分で反応が進行しますので、使い捨てになります。

カラム精製プロトコル

ビオチンが未反応で残ると SA センサーの固相化が阻害される場合があります。一般的にはゲルろ過スピンカラムレベルの精製でかまいません。透析などラボで汎用の手法ももちろん適用できます。ここでは GE Healthcare の PD SpinTrap G-25 の簡単な使い方を紹介します。

1. カラムの蓋を緩め、カラム底のフィンを折取って下さい。
2. 付属のチューブ、もしくはエッペンチューブの蓋を切り取ったものを用意し、カラムをセットします。。
2. 800xg で 1 分間遠心して保存バッファーを落とします。
3. チューブ内に落ちたバッファーを捨て、カラムの蓋を開け、PBS バッファー（もしくはタンパク質の保存に向いているバッファー）を 400uL、ゲルに染み込ませるように入れて下さい。
4. 同じく 800xg で 1 分間遠心します。
5. 3-4 の手順をあと 4 回繰り返します（元プロトコル）。煩雑な場合は 2 回程度でも問題ありません。
6. カラムの蓋を開け、遠心後の乾いたゲルに、サンプル溶液を 100-180uL 染み込ませます。
7. 800xg, 2 分間遠心します。
8. チューブ内に落ちたサンプル溶液を回収して終了です。