

# タンパク質のビオチン標識について

---

## 概要

- 弊社では Biacore の測定時に画一的なプロトコールで測定を行えるフォーマットを推進しており、その一環としてリガンド（固定化側）のビオチン化をご提案しています。
- リガンドをビオチン化してさえおけば、基本的に (1) SA チップあるいは NA チップへの固定化、(2) Biotin CAPture Kit を用いたキャプチャー法、のいずれかの方法を取ることができます。さらにこのプロトコールであれば測定成功の可能性も高いためお勧めしています。
- 本資料は、弊社国内ラボでの使用例に基づいており公式資料ではないことをご了承ください。  
公式な英文資料は下記 URL の Biacore lab procedure downloads より「Biotinylation for streptavidin/ neutravidin-biotin capture on Biacore sensor chips (CY14992-21Oct20-PD)」をダウンロードしてください。  
<https://www.cytivalifesciences.com/en/se/solutions/protein-research/Interaction-analysis-with-Biacore-surface-plasmon-resonance-SPR/Get-started-with-surface-plasmon-resonance-SPR-interaction-analysis>

## Biotin CAPture Kit について

- 弊社 HP の製品情報 <https://www.cytivalifesciences.co.jp/catalog/1564.html>
- 測定系を最速で立ち上げる方法  
[https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/biotin\\_capture\\_instruction1.html](https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/biotin_capture_instruction1.html)
- Biotin CAPture Kit を用いた実験を実際に行ってみよう  
[https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/biotin\\_capture\\_instruction2.html](https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/biacore/biotin_capture_instruction2.html)
- Webinar（ノウハウや経験がなくても Biacore の測定系を最速で立ち上げられる方法）  
[https://www.cytivalifesciences.co.jp/tech\\_support/webinar/fastest-way-to-start-up-biacore.html](https://www.cytivalifesciences.co.jp/tech_support/webinar/fastest-way-to-start-up-biacore.html)
- （注意）以下のサンプルの場合は Biotin CAPture Kit は用いることができません。SA/NA チップでのご測定やその他の固定化方法をお試ください。
  - A) DNA or オリゴヌクレオチドと結合するタンパク質
  - B) DNA を分解する酵素
  - C) 血清、血漿サンプル（非特異的結合の原因となるため）
  - D) 核酸の測定

## タンパク質のビオチン標識方法

- タンパク質のビオチン標識方法は以下の 2 つの方法がご提案できます。
  - A) ビオチン未標識のタンパク質に対して後からビオチンを標識する方法。
  - B) タンパク質発現時に AviTag™ベクターを用いて、目的のタンパク質をビオチン標識可能にする方法。

### A) 後からビオチンを標識する方法

- 以下にご案内する方法では標的タンパク質のアミノ基（すなわち、リジン残基と N 末端アミノ酸）にビオチンを導入する方法です。基本的にはランダムに導入されるため、仮に特定のアミノ基がアナライトとの結合に非常に重要であったとしても立体障害の影響は非常に小さいと考えられます。
- ビオチンの導入数は 1 個のタンパク質に対し 1 が望ましいです。複数導入されるとビオチン標識タンパク質は多点でチップ表面のストレプトアビジン（SA）と結合することになり、結果としてチップ表面に存在できるリガンド分子の密度が低下したり、網目状構造を取ったりすることでアナライト分子がデキストランマトリクス内を拡散しづらくなり、正しい評価が困難になります。
- メーカーが推奨する方法の場合ビオチンの導入数が多くなってしまうため、弊社独自の方法を用います。

以下では Protein A に対してビオチンを標識するプロトコールを紹介いたします。なお、紹介している EZ-Link の試薬は必ずしもこれである必要はありません。

#### 必要なもの

- Protein A, NACALAI TESQUE : 29435-14, MW 42kDa
- Biotin 化試薬  
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin, No-Weigh™ Format, Thermo Fisher Scientific: A39257, 10 x 1 mg, MW 556.59 Da  
EZ-Link™ NHS-LC-Biotin, Thermo Fisher Scientific: 21336, 50 mg , MW 454.54 Da など
- PD SpinTrap G-25, Cytiva : 28918004
- Biotin 化反応時のバッファー  
HBS-N, Cytiva : BR100828 (4 x 50mL) あるいは BR100670 (1 x 1000 mL)を超純水で 10 倍希釈  
0.1 M sodium-borate, pH8.5 : 自作 (6.183g 分の Boric acid を NaOH で pH 調整、1L にメスアップ) など  
\* 脱 Biotin に PD SpinTrap G-25 を使用する場合、20mM 以上の NaCl を添加してください。HBS-N は希釈後の濃度で 150 mM NaCl が含まれます。

## サンプル調整

タンパク質のビオチン標識には、モル比にしてタンパク質：NHS-biotin = 1：1.5となるよう、タンパク質溶液 90 $\mu$ L と NHS-biotin 10 $\mu$ L の割合で混合して反応させます。タンパク質の量は 10-100  $\mu$ g でビオチン標識を行います。以下、サンプルに Protein A、バッファーに HBS-N を用いた例をご案内します。

- Protein A 溶液：100  $\mu$ g 分の Protein A (=2.38 nmol) を 90 $\mu$ L HBS-N で希釈します。希釈倍率は特に指定はありませんが、Biotin 導入のアミンカップリング至適反応 pH は 8.5 付近となりますのでできるだけ高濃度のサンプルをストック溶液として用いた方が良いです（注意点にて後述）。
- NHS-Biotin 溶液：NHS-Biotin を  $2.38 \times 1.5 = 3.57$  nmol 分を 10 $\mu$ L の HBS-N で用意します。
- 上に紹介した製品 A39257 の場合、1 mg 分を 5.03 mL の HBS-N で溶解して 10  $\mu$ L のみを使用します。

【参考】以下の計算式から、NHS-Biotin の溶媒液量（ $V_w = 5.03$  mL）が計算できます。

$$V_w = (X \times M_{lg}) / (M_w \times C_i \times 15)$$

$V_w$  (mL) = NHS-Biotin 試薬を希釈する溶媒液量

$X$  (mg) = NHS-Biotin 試薬質量 = 1mg (1 バイアル分の質量)

$M_{lg}$  = リガンドの分子量 = 42000 Da (Protein A 分子量)

$M_w$  = NHS-biotin の分子量 = 556.59 Da (A39257 の NHS-Biotin 分子量)

$C_i$  (mg/mL) = 100  $\mu$ L の容量でビオチン化する際のリガンドの最終濃度 (100  $\mu$ g/100 $\mu$ L = 1 mg/mL)

\* 最後の数値は 1.5 ではなく 15 なのでご注意ください。

\* 21336 の場合、一度 DMSO に溶解する必要があります。弊社実施例では 2.3 mg NHS-Biotin を 500  $\mu$ L DMSO に溶解して一度 50mM NHS-Biotin in DMSO としたストックをバッファーで希釈しました。

- NHS-Biotin は溶解後速やかに使用します。90 $\mu$ L Protein A 溶液と 10 $\mu$ L NHS-Biotin 溶液を混合して 25 $^{\circ}$ C で 1 時間、あるいは、on ice もしくは 4-8 $^{\circ}$ C で 5 時間～一晩インキュベートします。

## PD SpinTrap G-25 によるフリービオチンの除去

- インキュベート後は未反応のフリービオチンを除去する必要があります。以下では弊社 PD SpinTrap G-25 を用いた例をご紹介します。以下、全ての遠心作業は 800 x g となります。
- フリービオチンの除去に PD SpinTrap を用いる場合、にはサンプルに 20mM 以上の NaCl が添加されている必要があります。HBS-N には 150 mM NaCl が含まれます。
- そのまま 1 分間遠心して保存溶液を除去します。
- HBS-N で平衡化します。1 分間 x 5 回遠心します。
- 100  $\mu$ L のビオチン標識タンパク質溶液に 40  $\mu$ L の HBS-N を加え総量 140  $\mu$ L とし、2 分間遠心し、フリービオチンを除去します。場合によってはこの抽出後の溶液を再度 PD SpinTrap で処理します。Biacore lab procedure では 2~3 回処理するよう記載されていますが、弊社内で実施した限りではロスが大きく、1 回の PD SpinTrap 処理で十分と判断されました。
- PD SpinTrap G-25 の使用方法に関しては Product booklet もご確認ください。

<https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=15012>

## 注意点

- タンパク質のストック溶液にアミン系組成が含まれる場合（Glycine や Tris、アジ化ナトリウムなどが代表例）、ビオチン標識前にバッファー交換を行い除去してください。
- 本プロトコールはモル比 1.5 の NHS-biotin を使用して 1 分子当たり 1 ビオチン残基の導入数となるように調製していますが、タンパク質の中にはビオチン標識が困難なものや、共有結合による修飾に敏感なものがあります。このような場合はビオチン標識の度合いの最適化が必要になり、0.5-5 モル相当の比にて検証してみてください。
- 市販のビオチン標識タンパク質をリガンドとして用いる場合は、使用前にフリービオチン除去操作を行ってください。
- ビオチン標識の反応バッファーについて、PBS pH7.4 など使用可能で、プロトコールも同様です。PBS を用いて 4-8℃ で一晩インキュベートした場合、Borate を用いて 25℃ で 1 時間インキュベートした場合と同等の標識量が得られます。
- リガンドの活性率が低い、アナライトの結合量が低いなどの場合は、NHS-biotin の量を減らしてみてください。スペーサーの長い NHS-biotin を使用する方法もあります。

## B) AviTag™ベクターを用いる方法

- AviTag™は Avidity 社の登録商標です。ビオチン・リガーゼ（BirA）は特異的な 15 ペプチド（GLNDIFEAQKIEWH: Avitag™）の **リジン残基** にビオチンを結合します。Biotin AviTag™ System は BirA を発現する大腸菌株 AviTag™融合タンパク質を発現する AviTag™ベクターを用いて、目的のタンパク質をビオチン標識可能にします。
- 詳細はメーカーHP をご確認ください。また、以下のページも大変参考になると思います。

一般社団法人 日本蛋白質科学会、蛋白質科学会アーカイブ, **13**, e096 (2020)、表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いた蛋白質に結合する低分子リガンドスクリーニング、妹尾 暁暢様、長門石 暁様、津本 浩平様  
([https://www.pssj.jp/archives/protocol/measurement/SPR\\_01/SPR\\_01.html](https://www.pssj.jp/archives/protocol/measurement/SPR_01/SPR_01.html))

## ■ 総合お問合せ窓口

TEL : 03-5331-9336

### ● 機器アフターサービス

(営業日の 9:00～17:30、音声案内に従い①を選択)

FAX : 03-5331-9324 (常時受付)

### ● 製品技術情報に関して

(バイオダイレクトライン、営業日の 9:00～12:00、13:00～17:30)

音声案内に従い②を選択後、対象の製品別の番号を押してください。

① : ÄKTA、クロマトグラフィー関連製品

② : ビアコア関連製品

③ : 電気泳動関連製品、画像解析装置

④ : IN Cell Analyzer、ワットマン製品、その他製品

e-mail : Tech-JP@cytiva.com (常時受付)

### ● 納期／在庫お問合せ

(営業日の 9:00～12:00、13:00～17:30、音声案内に従い③を選択)

注) お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

注) アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。オペレーターにつながります。

[www.cytivalifesciences.co.jp](http://www.cytivalifesciences.co.jp)

論文に掲載いただく際の名称・所在地

Cytiva / Tokyo, Japan

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社

〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ : バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336

e-mail : Tech-JP@cytiva.com

掲載されている内容は 2022 年 2 月現在のもので予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問い合わせに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。