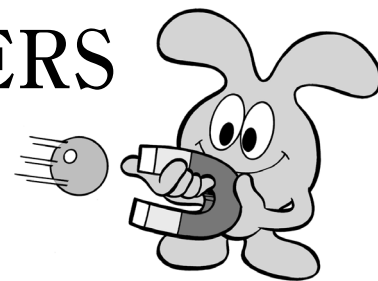


# DYNABEADS LETTERS



## テクニカルヒント --- ビオチン化の方法

ビオチン化核酸および蛋白は、Dynabeads® M-280 Streptavidinに容易に結合される。結合したビオチン化産物は、Dynabeads® M-280 Streptavidinのユニークな磁性とbiotin/streptavidinの強力で安定( $K_d = 10^{-15}$  M)な結合のため取扱いが簡単で、buffer 交換のような実験上の操作が容易に行える。

- ・立体障害を減らすために、すべてのビオチン化試薬は少なくとも6-C原子の長さの、スペーサー腕を含まなければならない。
- ・サンプル中の固定されていないビオチンは、Dynabeads M-280 Streptavidinの結合能力を減らす。  
取り込まれないビオチンを除去するには、Sephadex® (Pharmacia Biotech Europe、ブリュッセルベルギー)を充填したディスパーザブルカラムが有効である。
- ・ビオチン化オリゴヌクレオチド・プライマーは、HPLC 精製することが好ましい。
- ・伸長のため3'末端を固定しないために5'末端の特異的なビオチン化を薦める。

### 核酸のビオチン化

#### A. オリゴヌクレオチドプライマー

DNA合成中にビオチン phosphoramidite を使用して5'末端にビオチンを導入する方法を薦める。(1,2)

- ・DYNAL の薦める、ビオチン phosphoramidite :

Cambridge Research Biochemicals Ltd., Cheshire, UK ----- DMT-BIOTIN-C6-PA, Cat. No. DR-16-100A/B  
 Pharmacia Biotech Europe, Brussels, Belgium ----- Biodite™ biotin amidite, Code No. 27-1793-01  
 Amersham International plc, Aylesbury, UK ----- Biotin phosphoramidite, ZRPN 2012  
 Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, CA, USA ----- 5'-Biotin-C16-CEP, Cat. No. N4038  
 Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA ----- Biotin-ON™ Phosphoramidite, Cat. No. 5191-1/2/3  
 Cruachem Ltd., Glasgow, Scotland ----- Biotin-CE Phosphoramidite, Cat. No. 22-0001-35/17  
 Applied Biosystems Division of the Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA, USA ----- Biotin Amidite, Cat.No. 401395/6

#### B. Amino-modified DNA

Amino-modified核酸フラグメントは、biotin-X-NHSエステル™ (3)を使用して、化学的にビオチン化できる。

##### 【 amino-modified DNAビオチン化の方法 】

1. Aminolink 2™ 試薬 (Applied Biosystems Division of the Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA, USA)を使用して5' amino-modified oligoを合成する。
2. Biotin-X-ester 試薬を使用してoligoのアミノ基にビオチン残基を付ける。室温で一晩インキュベートする

- ・DYNAL の薦めるBiotin-X-ester 試薬 :

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany ----- D-Biotin-N-hydroxysuccinimide Product #732 494  
 Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA ----- Biotin-X-NHS Ester, Cat.No. 5002-1/2

- ・ビオチン化oligoは、製造業者の記述に従って逆相HPLCで精製する
- ・取り込まれないbiotin-X-esterは、NAP™-10 Columnで除去する。  
(Pharmacia Biotech Europe, Brussels, Belgium, Product #170854-01/02).

## C. DNA FRAGMENTS

### 1. 酵素を用いたbiotin-dUTPラベル

Klenow DNA ポリメラーゼ、nick translation あるいはmixed primer labeling(4,5)法により酵素的に二本鎖 DNA に biotin-dUTP ラベルを導入することができる。

- DYNALの薦めるbiotin-dUTP:  
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany ----- Biotin-16 - dUTP Product #1093 070  
Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA ----- Biotin-21-dUTP, Cat.No. 5021-1

### 2. Photobiotinylation

Photoactivatedされたビオチンは、UV(6)によってランダムにDNAフラグメントに取りこまれる。

- DYNALの薦める photobiotin :  
Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA ----- Photobiotin™ Labeling System Product #530-8186SA

### 3. ビオチン化プライマーによるPCRを使用したEnd-labeling

## D. CLEAVABLE DNA FRAGMENTS

ビオチン / streptavidin 結合は非常に安定なので、簡単に解離することはない。  
修飾されたビオチン・アナログを使用することにより、Dynabeads M-280 Streptavidin からビオチン化DNAフラグメントを解離させることができる。

### 1. ビオチンdUTPアナログの酵素による導入

disulfide リンクはdithiothreitol ( DTT ) によって簡単に開裂されるので、S - S 結合を含むリンカー腕をもつビオチンを導入することにより、DNA フラグメントを簡単に解離させることができる。  
この試薬は、end-labeling、nick translation あるいは mixed primer labeling 法により酵素的に導入される。

- DYNALの薦めるビオチンdUTP :  
Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA ----- Biotin-21-SS-dUTP Product #5014-1

### 2. NHS-ビオチンguanidoアナログの化学的導入

iminobiotinを導入することにより、単純な pH 変化によって結合した核酸フラグメントを解離できる。  
Streptavidin / iminobiotin complex は、pH 4.0で解離する。pH 9.5またはそれ以上で、iminobiotinは Dynabeads M-280 Streptavidinに固く結合する。解離したiminobiotinは、Dynabeads M-280 Streptavidin上へ再結合できる。

- DYNALの薦めるビオチン:  
Pierce Chemical Corp., Rockford, IL, USA ----- NHS-Iminobiotin Product #21117

## E. RNA FRAGMENTS

RNAをピオチン化するとき、ほとんどのケースにおいてDNAのピオチン化の方法を準用することができる。amino-modifying DNAと同じ方法に従って、Aminolink 2™ をRNAフラグメントのamino-modifyに使用できる。amino-modified フラグメントは、biotin-X-NHS エステル(3)を参照して、化学的にピオチン化できる。DNAからtranscribeされる際に、非放射性のRNA Labeling System ( Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA, Product #8093SA )を使用することができる。すでに、合成されたRNAフラグメントは、photobiotin 化することができる。DNAと同様にphotoactivatedされた型のピオチンは、UVによってランダムに RNA fragment に取り入れられる。

- DYNALが薦めるphotobiotin :  
Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA ----- Photobiotin™ Labeling System Product#530-8186SA

## .蛋白質のピオチン化

### A. 蛋白質

蛋白質は、biotin-X-NHS エステル(7)を用い、化学的にピオチン化できる。

- DYNALの薦めるピオチン:  
Pierce Chemical Corp., Rockford, IL, USA NHS-LC-Biotin Product #21335

### B. CLEAVABLE PROTEINS

S - S 結合を有すNHS-biotinを利用することにより、ピオチン / streptavidin complex からの蛋白質の容易な解離を可能にする。

- DYNAL の薦めるピオチン:  
Pierce Chemical Corp., Rockford, IL, USA ----- NHS-SS-Biotin Product #21331
1. Arnold C, Hodgson IJ  
Vectorette PCR: A Novel Approach to Genomic Walking  
PCR Methods and Applications 1991; 1 (1) : 39-42 ( Ref. No. 580 )
  2. Hultman T, Bergh S, Moks T, Uhlen M  
Bidirectional solid-phase sequencing of in vitro-amplified plasmid DNA.  
Biotechniques 1991 ; 10 ( 1 ) : 84-93 ( Ref No. 425 )
  3. Gibbs RA, Nguyen PN, Edwards A, Civitello AB, Caskey CT  
Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyl-transferase gene in Lesch-Nyhan families  
Genomics 1990; 7 : 235-244 ( Ref No. 388 )
  4. Hultman T, Murby M, Stahl S, Hornes E, Uhlen M  
Solid phase in vitro mutagenesis using plasmid DNA template  
Nucleic Acids Research. 1990 : 18 ( 17 ) : 5107-5112 ( Ref No. 401 )
  5. Gabrielsen OS, Hornes E, Korsnes L, Ruet A, Oyen TB  
Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor t - a new purification principle for the ultrarapid isolation of near homogeneous factor  
Nucleic Acid Research 1989 ; 17 : 6253-6267 ( Ref No. 319 )
  6. Nelson WM, Wojnar WA  
The use of photo-biotinylated PCR primers for magnetic bead-based solid phase sequencing  
Human Genome III October 21- 23, 1991 San Diego, CA. Poster # T41 (Ref No.:622)

7. Coffe A, Sinnett-Smith J, Rozengurt E  
Bombesin receptor from Swiss 3T3 cells. Affinity chromatography and reconstitution into phospholipid vesicles  
FEBS 1990 ; 275 ( 1,2, ): 159-164 ( Ref No : 462 )

Biotin-X-NHS ester™ is a trademark of Clontech Corp., Palo Alto, CA, USA

Aminolink 2™ is a trademark of Applied Biosystems Division of the Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA, USA.

Gene Amp® is a registered trademark of Hoffmann-La Roche, Inc., USA.

Sephadex® is a registered tradenark of Pharmacia A.B, Uppsala, Sweden.

Biodite™ and NAP™ are trademarks of Pharmacia AB, Uppsala, Sweden

The Gene Amp PCR process is covered by U.S. patents owned by Hoffmann-La Roche, Inc.

Dynal®, Dynabeads®, and Dynal MPC® are registered trademarks of Dynal AS, Oslo, Norway and the products are covered by several international patents.

お問合せは 日本総代理店

株式会社

**ベリタス**

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル  
TEL( 03 )5993-3211 [ 代 ] FAX( 03 )5993-3216