

## Isolation of drug target protein (4)

### Biotin-Streptavidin Binding assay [Biotinylated MTX]

#### Introduction

ストレプトアビジンとはビオチンと非常に強いアフィニティで結合するタンパク質であり、ビオチンは化合物、タンパク質、核酸などに簡便で効果的にラベルとして導入できる低分子化合物として利用されています。このことから、ビオチン化リガンドのストレプトアビジンビーズへの固定化と、それを用いた標的物質の精製実験は、幅広い研究分野で行われています。

ケミカルプルダウンを行なう際、リガンドとなる化合物にビオチンを導入しておけば、ストレプトアビジンビーズによる実験系が可能となります。ケミカルプルダウンにおけるリガンド化合物のビオチン化には、化学反応を利用するリガンドとビーズの固定化とは異なり、ワンステップで簡便にそれらを固定化できる点や、間接法(後付け法)によるプルダウン操作(ライセートにビオチン化リガンドのみを先に添加して反応させ、ビオチン化リガンドとその結合物質の複合体を、後からストレプトアビジンビーズを添加することにより回収する方法)が選択可能となる点などがメリットとなります。

今回は、MTX(メトトレキサート)によるDHFRのケミカルプルダウンを、ビオチン化MTXとストレプトアビジンビーズを用いて行いました。他社ビーズとの性能比較に加え、MTXとビオチンを結ぶスペーサーアームの長さの重要性についても示しています。ストレプトアビジンが立体障害となり、リガンドと標的タンパク質の結合が妨げられることがあるためです。

#### Result

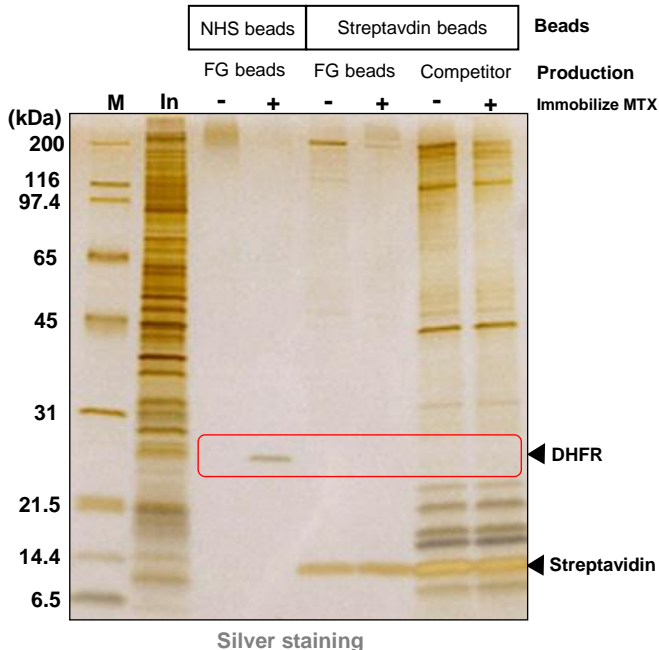
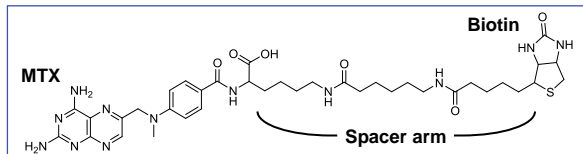
スペーサーアームの長さが異なるビオチン化MTXを、それぞれストレプトアビジンビーズに固定化し、HeLa細胞破砕液からDHFRのアフィニティ精製を行ないました。なお、コントロールとして、MTXアミノ基誘導体(ビオチン化無し)をNH<sub>2</sub>ビーズに固定化したものについても同様の操作を行なっています。

下図の2つから、以下の点を確認できます。

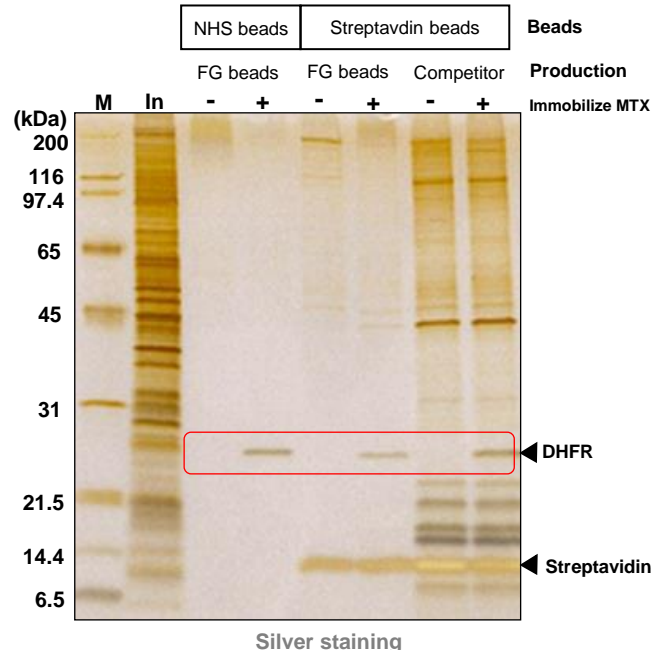
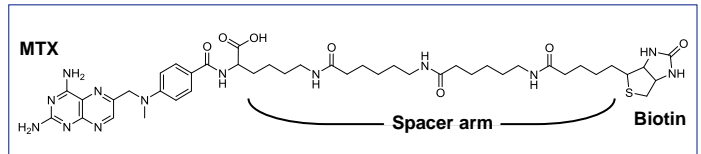
- ・他社ビーズよりもFGビーズの方が非特異的吸着が少ない。

- ・約20 ÅのスペーサーアームではDHFRが回収できず、約30 Åの場合に回収ができた。このことから、低分子化合物をビオチン化する際は、スペーサーアームの長さを約30 Å以上に設定することが良いと確認できた。

#### Biotinylated MTX (Spacer arm Length : about 20 Å)



#### Biotinylated MTX (Spacer arm Length : about 30 Å)



## Materials and method

### Materials

1. Streptavidin beads
2. Biotinylated MTX
3. PBS(-)(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
4. Wash buffer (10mM HEPES-NaOH(pH7.9), 50mM KCl, 0.2mM EDTA, 10% glycerol)
5. HeLa cell extracts (cytosolic fraction) — 3mg/ml
6. 100mM KCl buffer (20mM HEPES-NaOH(pH7.9), 100mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 1mM DTT, 0.2mM PMSF)
7. SDS sample buffer (62.5mM Tris-HCl(pH6.8), 0.005% BPB, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercapto ethanol)

### FG beads® information

Product name	Streptavidin beads
Product number	TAS8848N1170
Storage temperature	2-8°C
Storage buffer	10mM HEPES(pH7.9), 50mM KCl, 1mM EDTA, 10%glycerol
Size of beads	190nm ± 20 nm
Binding capacity (for 1mg of beads)	Free biotin >1200pmol
	Biotinylated Antibody >13ug
	Biotinylated ssDNA (50mer) >13ug
	Biotinylated BSA >3ug

### Method 1 (Immobilize biotinylated MTX)

#### 1. Immobilize biotinylated MTX on beads

Transfer 0.5mg beads to a tube, and wash beads with PBS(-) 3times at 4°C.

Add 0.1mM biotinylated MTX diluted in 200ul PBS(-) to beads, and 200ul PBS(-) to another beads (Control beads). Mix for 2hour at 4°C.

#### 2. Wash

Wash biotinylated MTX immobilized beads and Control beads with Wash buffer 3 times at 4°C, and storage with 200ul Wash buffer.

### Method 2 (Affinity Purification)

#### 1. Beads equilibration

Wash 0.5mg of each MTX immobilized beads with 100mM KCl buffer 3 times at 4°C.

#### 2. Reaction

Add 200ul HeLa cell extract and resuspend beads. Incubate with rotation for 2hour at 4°C.

#### 3. Wash

Separate magnetically and remove supernatant . Wash beads with 100mM KCl buffer 3 times at 4°C.

#### 4. Elution

Add 40ul of SDS sample buffer and resuspend beads. Boil for 5min at 98°C, and remove beads.

#### 5. Analyze the samples by SDS-PAGE and silver staining.

### Influence of Spacer Length on Steric hindrance

