



Biotin Quantitation Kit

製品コード: B7077

使用プロトコル

キュベットでの使用方法	2
計算方法(キュベット版)	2
計算例(キュベット版)	3
96 穴プレートでの使用方法	3
計算方法(96 穴プレート版)	3
計算例(96 穴プレート版)	4

東京化成工業株式会社

Tel : 03-3668-0489 • 06-6228-1155
Fax : 03-3668-0520 • 06-6228-1158

TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.

Tel : +81 (0)3-5640-8878
Fax : +81 (0)3-5640-8902

TCI AMERICA

Tel : 800-423-8616 • 503-283-1681
Fax : 888-520-1075 • 503-283-1987

TCI EUROPE N.V.

Tel : +32 (0)3 735 07 00
Fax : +32 (0)3 735 07 01

梯希爱(上海)化成工业发展有限公司

Tel : 800-988-0390 • 021-67121386
Fax : 021-6712-1385

TCI Chemicals (India) Pvt. Ltd.

Tel : +91 (0)44-2262 0909
Fax : +91 (0)44-2262 8902

キュベットでの使用方法

1. Avidin Buffer と HABA Buffer を室温に戻し、1:4 の割合で混合して HABA/Avidin 溶液を調製します。
例: 0.6 mL の Avidin Buffer と 2.4 mL の HABA Buffer を混合して、HABA/Avidin 溶液を調製します。
注意: HABA/Avidin 溶液は用時調製してください。
2. 分光光度計のオートゼロは、PBS または TBS をブランクとして実行します。1 mL キュベットに HABA/Avidin 溶液 900 μ L を加え、500 nm における吸光度を測定します。測定値を「A500_{HABA/Avidin}」として記録します。
3. 次に、HABA/Avidin 溶液が入ったキュベットに、ビオチン化サンプル 100 μ L を加え、よく混合します。
4. 最後に、500 nm における吸光度を測定します。測定値を「A500_{HABA/Avidin/Biotin sample}」として記録します。
注意: 500 nm における吸光度の測定結果が 0.25 未満の場合は、ビオチン化サンプルを希釈して再度測定してください。

計算方法(キュベット版)

1. $\Delta A500 = (0.9 \times A500_{\text{HABA/Avidin}}) - A500_{\text{HABA/Avidin/Biotin sample}}$
2. ビオチン濃度 (M) = $\Delta A500 / 34,000 \times 10^* \times \text{希釈倍率}^{**}$
注意: $\epsilon_{\text{HABA/Avidin}} = 34,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Light path = 1.0 cm
*反応溶液中で 10 倍に希釈されたため、元のビオチン化サンプルは 10 倍の倍率で補正する必要があります。
ビオチン定量前にビオチン化サンプルを希釈している場合は、追加の「希釈倍率」を用いて補正してください。
3. タンパク質濃度 (M) = タンパク質濃度 (mg/mL) / タンパク質の分子量
4. ビオチンとタンパク質のモル比 = ビオチン濃度 (M) / タンパク質濃度 (M)

ポジティブコントロール(陽性対照)

ポジティブコントロール(100 μ M ビオチン)の調製には、Biotin Standard(in DMSO)を PBS または TBS で 100 倍に希釈してください。

得られたポジティブコントロールを用いて定量を行い、上記の式に従ってビオチン濃度を算出してください。算出値を既知濃度(100 μ M)と比較し、手順および計算が適切に行われていることを確認してください。正しく実施された場合、算出値は 100 μ M に近い値となります。

計算例(キュベット版)

ビオチン標識 IgG (MW 150,000)、タンパク質濃度 1.210 mg/mL、
 $A500_{\text{HABA/Avidin}} = 0.985$ で、 $A500_{\text{HABA/Avidin/Biotin sample}} = 0.707$ の場合。

1. $\Delta A500 = (0.9 \times 0.985) - 0.707 = 0.1795$
2. ビオチン濃度 (M) = $0.1795 / 34,000 \times 10 = 5.279 \times 10^{-5}$
3. タンパク質濃度 (M) = $1.21 / 150,000 = 8.067 \times 10^{-6}$
4. ビオチンとタンパク質のモル比 = $5.279 \times 10^{-5} / 8.067 \times 10^{-6} = 6.544$

96 穴プレートでの使用方法

1. Avidin Buffer と HABA Buffer を室温に戻し、1:4 の割合で混合して HABA/Avidin 溶液を調製します。
例: 0.6 mL の Avidin Buffer と 2.4 mL の HABA Buffer を混合して、HABA/Avidin 溶液を調製します。
注意: HABA/Avidin 溶液は用事調製してください。
2. 96 穴プレートの各ウェルに HABA/Avidin 溶液 180 μL を加えます。500 nm における吸光度を測定し、測定値を「 $A500_{\text{HABA/Avidin}}$ 」として記録します。
3. 吸光度測定後に、HABA/Avidin 溶液が入った各ウェルに、ビオチン化サンプル 20 μL を加え、よく混合します。
4. 室温で 10 分間反応させます。
5. 最後に、500 nm における吸光度を測定し、測定値を「 $A500_{\text{HABA/Avidin/Biotin sample}}$ 」として記録します。

計算方法(96 穴プレート版)

1. $\Delta A500 = A500_{\text{HABA/Avidin}} - A500_{\text{HABA/Avidin/Biotin sample}}$
2. ビオチン濃度 (M) = $\Delta A500 / (34,000 \times 0.5) \times 10^* \times \text{希釈倍率}^{**}$
注意: $\epsilon_{\text{HABA/Avidin}} = 34,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Light path = 0.5 cm
*反応溶液中で 10 倍に希釈されたため、元のビオチン化サンプルは 10 倍の倍率で補正する必要があります。
ビオチン定量前にビオチン化サンプルを希釈している場合は、追加の「希釈倍率」を用いて補正してください。
3. タンパク質濃度 (M) = タンパク質濃度 (mg/mL) / タンパク質の分子量
4. ビオチンとタンパク質のモル比 = ビオチン濃度 (M) / タンパク質濃度 (M)

ポジティブコントロール(陽性対照)

ポジティブコントロール(100 μ M ビオチン)の調製には、Biotin Standard(in DMSO)を PBS または TBS で 100 倍に希釈してください。

得られたポジティブコントロールを用いて定量を行い、上記の式に従ってビオチン濃度を算出してください。算出値を既知濃度(100 μ M)と比較し、手順および計算が適切に行われていることを確認してください。正しく実施された場合、算出値は 100 μ M に近い値となります。

計算例(96 穴プレート版)

ビオチン標識 IgG (MW 150,000)、タンパク質濃度 1.110 mg/mL、
A500_{HABA/Avidin} = 0.503 で、A500_{HABA/Avidin/Biotin sample} = 0.423 の場合。

1. $\Delta A500 = 0.503 - 0.423 = 0.080$
2. ビオチン濃度 (M) = $0.080 / (34,000 \times 0.5) \times 10 = 4.706 \times 10^{-5}$
3. タンパク質濃度 (M) = $1.110 / 150,000 = 7.400 \times 10^{-6}$
4. ビオチンとタンパク質のモル比 = $4.706 \times 10^{-5} / 7.400 \times 10^{-6} = 6.359$