

Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kit

Technical Manual

はじめに

Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kitは、10 µgの抗体にR-Phycoerythrinを30分以内に標識するためのキットです。Reactive R-Phycoerythrinは、活性エステル基を導入したR-Phycoerythrinであり、抗体と混合するだけで安定な共有結合を形成します。本キットには標識に必要なすべての試薬が含まれています。

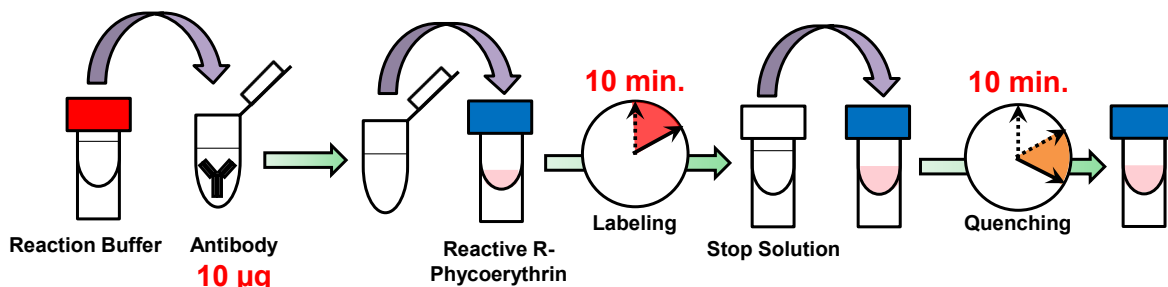


図 1 標識手順

キット内容

- Reactive R-Phycoerythrin x 1
- Reaction Buffer 100 µL x 1
- Stop Solution 100 µL x 1

保存条件

0–5 °Cで保存してください。
ご購入後、未開封の状態ですべて1年間安定です。

必要なもの
(キット以外)

- 20 µL マイクロピペッター
- インキュベーター (37 °C)
- マイクロチューブ (サンプル調製用)
- PBS (Phosphate buffered saline)

使用上の注意

- 0.5–1 mg/mLの抗体溶液を使用してください。抗体濃度が1 mg/mLを超える場合はPBSで希釈してください。
- 試料溶液に不溶性の低分子物質が含まれる場合は、遠心して上清のみを標識反応に用いてください。
- 本キットには溶液の入ったマイクロチューブのコンポーネントが含まれています。チューブ内壁やキャップに溶液が付着していることがありますので、開封前に溶液を遠心等でチューブの底に落としてからご使用ください。
- 抗体溶液に含まれる添加剤は、その濃度が高い場合に標識反応を妨害したり、実験における非特異的吸着の原因となる可能性があります。標識反応の妨害または非特異吸着が著しい場合には、標識操作の前に添加剤を除去することを推奨します。表1には標識に影響を及ぼさない添加剤の例を、表2には小社で検討した標識に影響を及ぼす可能性のある添加剤の例を示しました。

表 1. 標識に影響を及ぼさない添加剤の最大濃度

添加剤		添加剤	
Buffering agents (PBS, HEPES)	○	Sodium azide	< 0.1%
Sodium chloride	○	BSA*	< 1%
Chelating agents (EDTA)	○	Gelatin	< 0.1%
Sugars (Glucose, Trehalose)	○	Tris	< 50 mmol/L
Glycerol	< 50%	Primary amines and thiols	×

* BSAは抗体の種類により非特異吸着の原因となる場合があります。非特異吸着が著しい場合には、標識操作の前にBSAを除去することを推奨します。

1. 抗体量が 10 µg に相当する量の 0.5–1 mg/mL に調製した抗体溶液をマイクロチューブに入れる。
2. 操作 1 の抗体溶液に Reaction Buffer を加え、ピペッティングにより混合する。
※ Reaction Buffer の添加量：抗体溶液の 1/10 量 (表 2)
3. 操作 2 の溶液を Reactive R-Phycoerythrin に加え、ピペッティングにより混合する。
4. 37 °C で 10 分間反応する。
5. 操作 4 の溶液に Stop Solution を加え、ピペッティングにより混合する。
※ Stop Solution の添加量：抗体溶液の 1/10 量 (表 2)
6. 室温で 10 分間反応する。
7. 操作 6 の標識抗体を実験に用いる。または、冷蔵で保存する。
※標識抗体は、4 °C で 2 週間は安定です。長期保存する場合には、等量のグリセロールを添加して、-20 °C で保存してください。

表 2. Reaction Buffer と Stop Solution の添加量

抗体濃度 (mg/mL)	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Reaction Buffer 添加量 (µL)	2.00	1.67	1.43	1.25	1.11	1.00
Stop Solution 添加量 (µL)	2.00	1.67	1.43	1.25	1.11	1.00

実験例

HL60 細胞の蛍光染色

1. HL60 細胞の細胞懸濁液を 5.0×10^5 cells/tube となるようにマイクロチューブに分注した。
2. $1,000 \times g$ で 2 分間、遠心分離を行い、上清を取り除いた。
3. Suspension buffer [1% FBS (ウシ胎児血清), Hank's HEPES balanced buffer] を 50 µL 添加した。
4. 本キットで標識した R-Phycoerythrin 標識抗体を 1 µg (抗体量として) 添加し、ボルテックスにより再懸濁した。
※抗 CD13 抗体 (商品コード: 555393) は Becton Dickinson, マウス抗体 (Isotype, 商品コード: 015-000-003) は Jackson Immuno Research Laboratories より購入した。
5. 氷上で 30 分間静置した。
6. $1,000 \times g$ で 2 分間、遠心分離を行い、上清を取り除いた。
7. Suspension Buffer を 1 mL 添加した。
8. ボルテックスにより再懸濁し、フローサイトメーターにより蛍光強度を測定した。

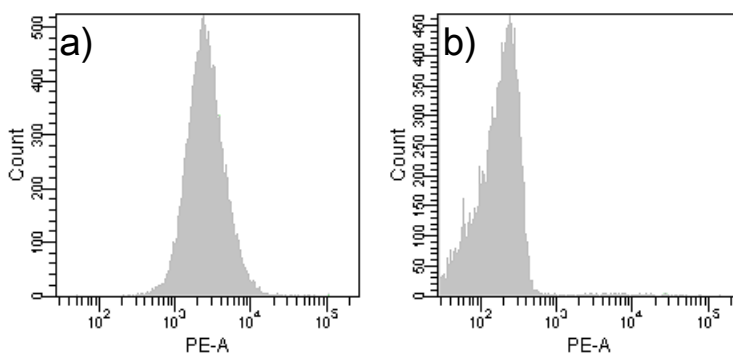


図 2 R-Phycoerythrin 標識抗体を用いた HL60 細胞の蛍光染色
a) 抗 CD13 抗体、b) Isotype

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.
30 W Gude Dr, Suite 260, Rockville, MD 20850
Tel: +1-301-987-2667, Fax: +1-301-987-2687, URL: www.dojindo.com

<委託製造元>

株式会社 同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202
Tel: 096-286-1515 Fax: 096-286-1525 URL: www.dojindo.co.jp
ドージン・イースト (東京) Tel: 03-3578-9651 Fax: 03-3578-9650