

## はじめに

Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH は、SH 基を有する分子にアルカリホスファターゼ (ALP) を標識するためのキットです。SH-Reactive Alkaline Phosphatase は、マレイミド基を導入した ALP です。SH 基を有する標的分子と混合するだけで安定な共有結合を形成します。標的タンパク質が SH 基を持っていない場合、付属の還元剤を用いて遊離 SH 基を調製することが可能です (ただし、S-S 結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合があります)。低分子化合物に ALP を標識する場合には、未反応の低分子化合物は付属の Filtration Tube を用いて容易に除去することができます。また、IgG のような高分子タンパクに ALP を標識する場合、アルカリホスファターゼ活性を阻害するような低分子化合物 (リン酸など) は、Filtration Tube を用いた前処理によって除去されます。本キットには標識に必要なすべての試薬と作製した標識体を保存するための溶液が含まれています。

## キット内容

- SH-Reactive Alkaline Phosphatase ...	3 tubes	- Reducing Agent .....	3 tubes
- Solution A .....	4 ml x 1	- Solution B .....	1 ml x 1
- Reaction Buffer .....	200 $\mu$ l x 1	- Storage Buffer .....	4 ml x 1
- Filtration Tube .....	3 tubes		

## 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 1 年間安定です。

## 注意

SH-Reactive Alkaline Phosphatase は、アルミラミジップに 3 本入っています。アルミラミジップを一旦開封した後は、未使用の SH-Reactive Alkaline Phosphatase は、アルミラミジップに入れたまま、チャックをしっかりと閉め、-20°C で保存してください。SH-Reactive Alkaline Phosphatase 以外は、0 ~ 5°C で保存してください。

必要なもの  
(キット以外)

## 使用上の注意

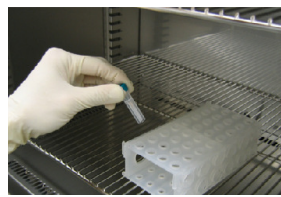
- 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l マイクロピペッター
- 遠心機 (マイクロチューブ用)
- インキュベーター (37°C)
- マイクロチューブ (標識体保存用)
- 以下のサンプルへ標識することができます。
  - ・ SH 基を有するタンパク質 (分子量 50,000 以上; 標識タンパク量: 50 ~ 200  $\mu$ g)
  - ・ SH 基を有する低分子化合物 (分子量 5,000 以下)
- 試料溶液中に標識対象以外の分子量 10,000 以上の物質が含まれる場合は、標識反応を阻害する恐れがあります。あらかじめ試料溶液を精製して、ご使用ください。
- Reducing Agent は、IgG への標識用として最適化されています。IgG 以外の S-S 結合を有するサンプルをご使用になる場合は、S-S 結合の切断によって標識対象分子の活性が失われる場合がありますので、検討が必要です。
- 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。
- 冷蔵保存中もしくは室温に戻した際に、Filtration Tube に水滴様の液粒が見られることがあります。これはメンブランの乾燥防止剤が液粒化したもので、製品の性能に問題はございません。
- 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、開封前に振り落としてからご使用ください。

## プロトコール 1

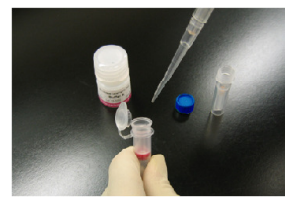
## SH 基を有する低分子化合物 (分子量 5,000 以下) への標識



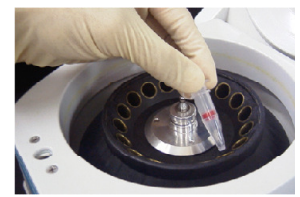
操作 1.  
Reaction Buffer で調製した 1 mmol/l サンプル溶液<sup>a)</sup> 50  $\mu$ l を、SH-Reactive Alkaline Phosphatase に加える。



操作 2.  
ビベットングにより SH-Reactive Alkaline Phosphatase を溶解した後、37°C で 1 時間反応する。



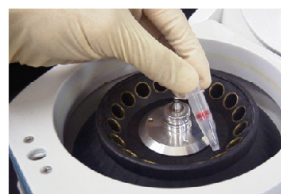
操作 3.  
Solution A 100  $\mu$ l を反応溶液に加え、この溶液を Filtration Tube に移す。



操作 4.  
8,000 x g で 10 分間遠心する<sup>b)</sup>。



操作 5.  
ろ液を捨てた後、Solution A 200  $\mu$ l を加える。



操作 6.  
8,000 x g で 10 分間遠心する<sup>b)</sup>。再度、Solution A 200  $\mu$ l を加えて、8,000 x g で 10 分間遠心する<sup>b)</sup>。



操作 7.  
Storage Buffer 200  $\mu$ l を加えて、10 回程度ビベットングし、標識体を回収する<sup>c)</sup>。マイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する<sup>d)</sup>。

a) サンプルが溶液の場合、10 mmol/l サンプル溶液 5  $\mu$ l と Reaction Buffer 45  $\mu$ l を混合し、1 mmol/l サンプル溶液を調製してください。サンプルが Reaction Buffer に溶解しない場合、DMSO を用いて 10 mmol/l のサンプル溶液を調製し、この溶液 5  $\mu$ l と Reaction Buffer 45  $\mu$ l を混合し、1 mmol/l サンプル溶液としてください。サンプル以外に SH 基を有する物質が含まれる場合には取り除いてください。

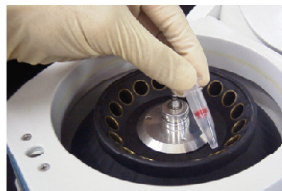
b) 溶液がメンブレン上に残っている場合には、さらに、8,000 x g で 5 分間遠心してください。

c) アルカリホスファターゼ 1 分子に対し、1 ~ 2 分子の低分子化合物が標識されます。

d) 標識体を回収する際は Storage Buffer のご使用を推奨しますが、必要に応じて各種の溶液をご使用ください。



操作 1.  
IgG 50 ~ 200 µg を含むサンプル溶液<sup>b)</sup>と Solution A 100 µl を Filtration Tube に加える。



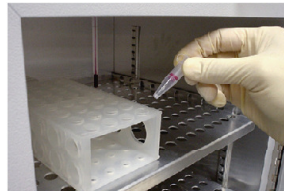
操作 2.  
ビベッティングにより軽く混合した後、8,000 x g で 10 分間遠心する<sup>c)</sup>。



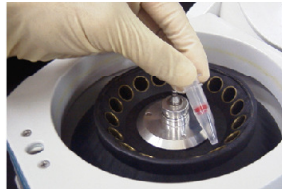
操作 3.  
Solution A 150 µl を Reducing Agent<sup>d)</sup>に加え、ビベッティングにより溶解する。



操作 4.  
この溶液 100 µl を IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上加え、ビベッティングにより IgG とよく混合する<sup>e)</sup>。



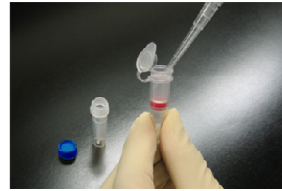
操作 5.  
37°C で 30 分間反応した後、Solution B 100 µl を Filtration Tube に加え、8,000 x g で 10 分間遠心する<sup>c)</sup>。



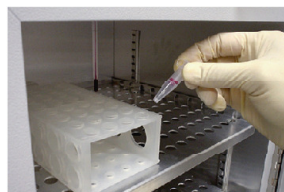
操作 6.  
ろ液を捨てた後、Solution B 200 µl を Filtration Tube に加え、8,000 x g で 10 分間遠心する<sup>c)</sup>。



操作 7.  
SH-Reactive Alkaline Phosphatase に加え、ビベッティングにより溶解する<sup>f)</sup>。



操作 8.  
SH-Reactive Alkaline Phosphatase を含む溶液を還元 IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上加える。



操作 9.  
ビベッティングによりメンブレン上の IgG とよく混合した後、37°C で 1 時間反応する。



操作 12.  
Storage Buffer 150 µl を加えて、10 回程度ビベッティングし、標識体を回収する<sup>g)</sup>。マイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する<sup>h)</sup>。

- a) SH 基を有するサンプルの場合、還元操作 (操作 3 ~ 6) を省略できます。  
 b) 液量は 100 µl 以下でご使用ください。IgG 濃度が 0.5 mg/ml 以下の場合には、操作 1 と 2 を繰り返して IgG 量が 50 ~ 200 µg となるように濃縮してください。  
 c) 溶液がメンブレン上に残っている場合は、さらに 8,000xg で 5 分間遠心してください。  
 d) Reducing Agent がキャップの内側に付着している場合があります。開封にはご注意ください。  
 e) Reducing Agent による還元反応では、IgG のヒンジ部分以外も還元される場合があります。  
 f) SH-Reactive Alkaline Phosphatase は Reaction Buffer 中で不安定です。Reaction Buffer に溶解後は直ちに操作 8 へ進んでください。  
 g) 2 ~ 4 分子のアルカリホスファターゼが IgG 1 分子に標識されます。未反応のアルカリホスファターゼは通常のイムノアッセイには影響を及ぼしません。希釈してご使用ください。精製が必要な場合には、ゲルろ過カラムあるいは IgG のアフィニティーカラムにより精製を行ってください。  
 h) 標識体を回収する際は Storage Buffer のご使用を推奨しますが、必要に応じて各種の溶液をご使用ください。

## Q & A

### ◆ 市販の抗体を用いて標識できますか？

標識できます。ただし、安定化剤としてゼラチンや血清アルブミンなどの高分子が添加されている抗体では、標識反応が阻害される場合があります。このような抗体をご使用の場合は、あらかじめアフィニティーカラムなどにより精製してご使用ください。精製法について、ご不明な点がございましたらお問い合わせください。

### ◆ このキットを使って抗体以外のタンパク質にアルカリホスファターゼを標識することはできますか？

分子量が 5,000 以下あるいは 50,000 以上で、SH 基あるいは還元操作によって活性を失わないジスルフィド基があれば標識できます。分子量が 50,000 以上の場合には「IgG への標識」のプロトコールに従ってください。分子量が 5,000 以下の場合には「SH 基を有する低分子化合物への標識」のプロトコールに従ってください。分子量が 5,000 以上 50,000 以下の場合には、お問い合わせください。

### ◆ アルカリホスファターゼ標識体はどのくらい安定ですか？

標識体の安定性はタンパク質自身の安定性に依存しますが、本キットを用いて goat IgG に標識した場合、4°C で 2 ヶ月は安定であることを確認しています。長期保存する場合には -20°C で保存してください。

### ◆ このキットを使ってオリゴヌクレオチドやペプチドにアルカリホスファターゼを標識することはできますか？

分子量が 5,000 以下で、SH 基があれば標識できます。- 低分子化合物への標識 - のプロトコールに従ってください。

### ◆ 使用できる IgG が少量しかないのですが…

本キットは、タンパク質量 50 ~ 200 µg でのご使用を推奨しておりますが、10 µg でも標識は可能です。ただし、10 µg のタンパク質を標識する場合、その後のアッセイでバックグラウンドの上昇などの問題が生じる可能性があります。

#### <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