

はじめに

Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit は、10 µg の抗体にペルオキシダーゼを 30 分以内に標識するためのキットです。Reactive Peroxidase は、活性エステル基を導入したペルオキシダーゼであり、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。

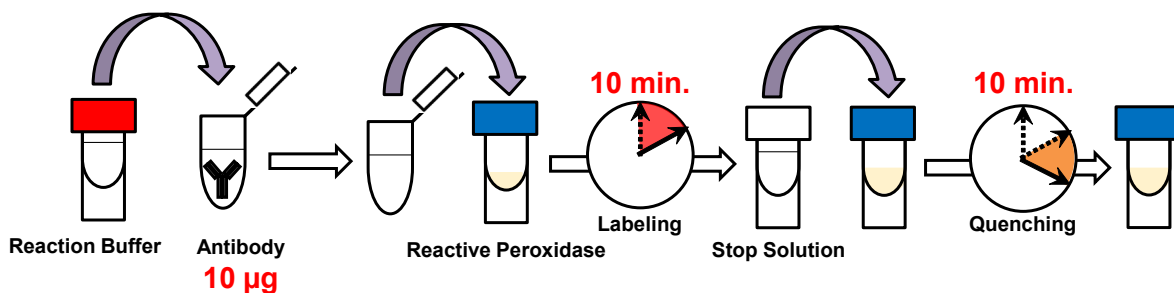


図 1 標識手順

注意

Reactive Peroxidase 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 Reactive Peroxidase 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。Reactive Peroxidase 以外は、0 ~ 5°C で保存してください。

キット内容

- Reactive Peroxidase x 3
- 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 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することがあります。表 1 に標識に影響を及ぼさない添加剤の最大濃度を示しました。

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 Peroxidase 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

ミトコンドリアの免疫染色

1. µ-スライド 8 ウェル (ibidi 社製) に HeLa 細胞を播種し、37°C、5% 炭酸ガスインキュベーター内で一晩培養した。
2. 培地を取り除き、PBS で 3 回洗浄後、4% パラホルムアルデヒド / PBS 溶液を添加した。
3. 室温で 1 時間静置した。
4. 上清を取り除き、1% Triton-X / PBS 溶液を添加した。
5. 室温で 30 分間静置した。
6. 上清を取り除き、PBS で 3 回洗浄後、PBS で調製したブロッキング溶液を添加した。
7. 冷蔵で 1 時間静置した。
8. ペルオキシダーゼ標識 - 抗ミトコンドリア抗体をブロッキング溶液で 50 倍希釈した。
※ 抗ミトコンドリア抗体 (商品コード: ab3298) は abcam 社から購入した。
9. 上清を取り除き 8 の溶液を添加した。
10. 冷蔵で一晩静置した。
11. 上清を取り除き、50 mmol/l トリス緩衝液 (pH 7.5) で 3 回洗浄した。
12. 上清を取り除き、0.2 mg/ml DAB (同仁化学研究所、品コード: D006)、0.003% H₂O₂、50 mmol/l トリス緩衝液 (pH 7.5) を添加した。
13. 室温で 10 分間静置した。
14. 上清を取り除き、50 mmol/l トリス緩衝液 (pH 7.5) で 3 回洗浄した後、50 mmol/l トリス緩衝液 (pH 7.5) を添加した。
15. 染色細胞を顕微鏡で観察した。

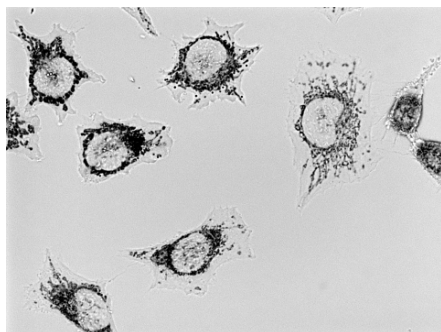


図 2 HeLa 細胞のミトコンドリアの免疫染色画像

<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