

はじめに

Peroxidase Labeling Kit - NH₂ は、アミノ基を有する分子にペルオキシダーゼを標識するためのキットです。NH₂-Reactive Peroxidase は、活性エステル基を導入したペルオキシダーゼです。アミノ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。低分子化合物にペルオキシダーゼを標識する場合、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ペルオキシダーゼを標識する場合、ペルオキシダーゼ活性や標識反応を阻害するような低分子化合物（アジ化ナトリウムやトリスなど）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

- NH ₂ -Reactive Peroxidase	1 tube	- Washing Buffer	10 ml x 1
- Reaction Buffer	1.2 ml x 1	- Storage Buffer	10 ml x 1
- Filtration Tube	1 tube	- 15 ml Tube (for counterbalance)...	1 tube

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

アルミラミジップを一旦開封した後は、未使用の NH₂-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。NH₂-Reactive Peroxidase 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)

- 200 µl, 1 ml マイクロピペッター	- インキュベーター (37°C)
- 遠心機 (15 ml 遠沈管用)	- 2 ml 容量以上のチューブ (標識体保存用)

使用上の注意

- 以下のサンプルへ標識することができます。

- ・ アミノ基を有するタンパク質 (分子量 50,000 以上 ; 標識タンパク量 : 1 mg)
- ・ アミノ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。

- 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。

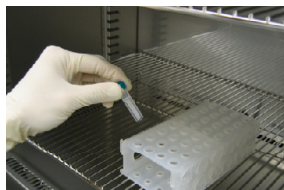
- 冷蔵保存中もしくは室温に戻した際に、Filtration Tube に水滴様の液粒が見られることがあります。これはメンブランの乾燥抑制剤が液粒化したもので、製品の性能に問題はございません。

プロトコール 1

アミノ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 0.5 ml を^{a)}、NH₂-Reactive Peroxidase に加える。



操作 2.
ピペティングにより NH₂-Reactive Peroxidase を溶解した後、37°C で 1 時間反応する。



操作 3.
操作 2 の反応溶液と Washing Buffer 1 ml を Filtration Tube に移す。15 ml Tube を用意する^{b)}。



操作 4.
アンギュレーターの場合、6,000×g で 20 分間遠心する^{c)}。



操作 5.
ろ液を捨てた後、Washing Buffer 2 ml を加える。



操作 6.
6,000×g で 20 分間遠心する^{b,c)}。再度、Washing Buffer 2 ml を加えて、6,000×g で 20 分間遠心する^{b,c)}。



操作 7.
Storage Buffer 2 ml を加えて、10 ~ 15 回ピペティングし、標識体を回収する^{d)}。用意したチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する^{e)}。

- a) 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 50 µl と Reaction Buffer 450 µl を混合し、1 mmol/l サンプル溶液としてください。サンプル以外にアミノ基を有する物質 (トリスやグリシンなど) が含まれる場合には取り除いてください。
- b) Filtration Tube の重さを量り、同じ重さとなるように 15 ml Tube に水を入れてください。この 15 ml Tube を遠心時のバランスとして使用してください。
- c) スイングローターの場合、4,000×g 以下で遠心してください。溶液がメンブレン上に 100 µl 以上残っている場合には、さらに 10 分間遠心してください。遠心加速度が 6,000×g 以下の場合、遠心時間を延長してください (例: 2,000×g で 50 ~ 60 分間)。
- d) ペルオキシダーゼ 1 分子に対し、1 ~ 2 分子の低分子化合物が標識されます。
- e) 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 1 mg を含むサンプル溶液^{a)}と Washing Buffer 1 ml を Filtration Tube に加える。15 ml Tube を用意する^{b)}。



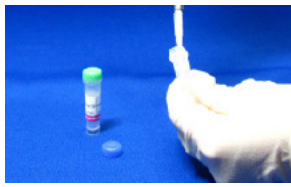
操作 2.
ピペティングにより軽く混合した後、6,000×g で 30 分間遠心する^{b), c)}。



操作 3.
Reaction Buffer 1 ml を Filtration Tube に加える。



操作 4.
アングルローターの場合、6,000×g で 30 分間遠心する^{b), c)}。



操作 5.
Reaction Buffer 50 µl を NH₂-Reactive Peroxidase に加え、ピペティングにより溶解する^{d)}。



操作 6.
NH₂-Reactive Peroxidase 溶液を IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上に加える。



操作 7.
ピペ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 2 時間反応する。



操作 8.
Washing Buffer 1 ml を Filtration Tube に加える。ろ液が 4 ml 以上の場合、操作 9 の前にろ液を捨てる。



操作 9.
6,000×g で 30 分間遠心する^{b), c)}。



操作 10.
Storage Buffer 2 ml を加えて、10 ~ 15 回ピペティングし、標識体を回収する^{e)}。用意したチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する^{f)}。

- a) 液量は 3 ml 以下でご使用ください。IgG 濃度が低くサンプル溶液が 3 ml 以上となる場合には、操作 1 と 2 を繰り返して IgG 量が 1 mg となるように濃縮してください。濃縮操作において、ろ液が 4 ml 以上となった場合は、次の遠心操作を行う前にろ液を捨ててください。
- b) Filtration Tube の重さを量り、同じ重さとなるように 15 ml Tube に水を入れてください。この 15 ml Tube を遠心時のバランスとして使用してください。
- c) スイングローターの場合、4,000 × g 以下で遠心してください。溶液がメンブレン上に 100 µl 以上残っている場合には、さらに 10 分間遠心してください。遠心加速度が 6,000 × g 以下の場合、遠心時間を延長してください(例: 2,000 × g で 50 ~ 60 分間)。
- d) NH₂-Reactive Peroxidase は Reaction Buffer 中で不安定です。Reaction Buffer に溶解後は直ちに操作 6 へ進んでください。
- e) 1 ~ 3 分子のペルオキシダーゼが IgG 1 分子に標識されます。未反応のペルオキシダ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。
- f) 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 IgG 以外のタンパク質にペルオキシダーゼを標識することができますか？

分子量が 50,000 以上あるいは 5,000 以下で、反応性のアミノ基を持っていれば標識できます。分子量が 50,000 以上である場合、-IgG への標識- のプロトコールに従って、50 ~ 200 µg のサンプルをご使用ください。分子量が 5,000 以下の場合には、-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。

◆ ペルオキシダ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。

◆ このキットを使ってオリゴヌクレオチドやペプチドにペルオキシダーゼを標識することができますか？

分子量が 5,000 以下で、反応性のアミノ基を有していれば標識できます。
-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。

◆ NH₂-Reactive Peroxidase は標識反応の間にオリゴマーを形成しますか？

NH₂-Reactive Peroxidase のアミノ基はすべて保護されていますので、オリゴマーは形成されません。

<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