



タンパク質架橋剤、ラベル化剤

DOJINDO

<http://www.dojindo.co.jp>

目次

1. ビオチンラベル化剤

Biotin-SS-Sulfo-OSu5
Biotin-HPDP6
Biotin-OSu7
Biotin-AC ₅ -OSu	
Biotin-(AC ₅) ₂ -OSu	
Biotin Sulfo-OSu8
Biotin-AC ₅ Sulfo-OSu	
Biotin-(AC ₅) ₂ Sulfo-OSu	
Biotin-PE-maleimide	
Biotin-PEAC ₅ -maleimide	
Biotin-hydrazide9
Biotin-AC ₅ -hydrazide	
Biotin-(AC ₅) ₂ -hydrazide	
ARP	
プロトコル10

2. 二価性試薬

< Hetero-bifunctional Reagents >

EMCS14
GMBS	
HMCS	
KMUS	
Sulfo-EMCS15
Sulfo-GMBS	
Sulfo-HMCS	
Sulfo-KMUS	
Sulfo-SMCC	
SPDP16
Sulfo-AC ₅ -SPDP	

< Homo-bifunctional Reagents >

BS3	
DTSSP	
DSP17
Dithiobis(succinimidyl undecanoate)	
Dithiobis(succinimidyl octanoate)	
Dithiobis(succinimidyl hexanoate)	
プロトコル18

3. タンパク質標識試薬

CFSE 20
IC3-OSu special packaging	
IC5-OSu special packaging	
FITC-I	
Sulforhodamine 101 acid chloride 21
ICG-Sulfo-OSu	
プロトコル 22

4. HPLC 用誘導体化試薬

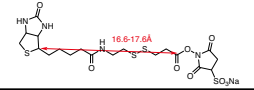
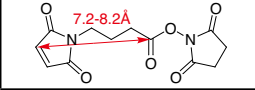
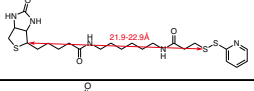
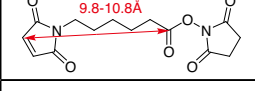
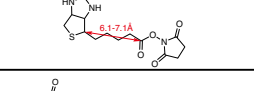
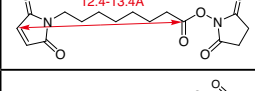
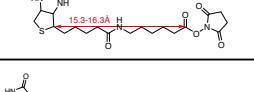
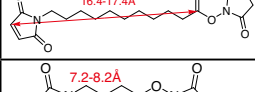
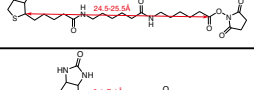
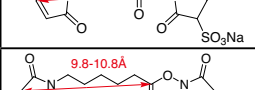
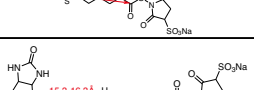
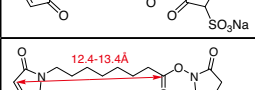
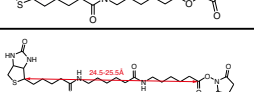
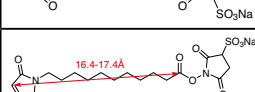
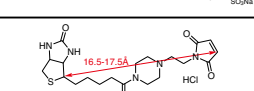
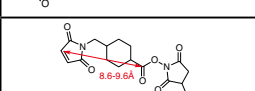
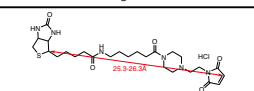
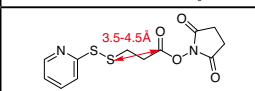
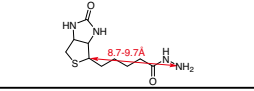
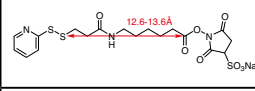
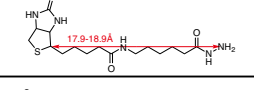
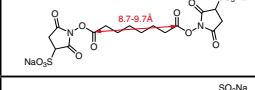
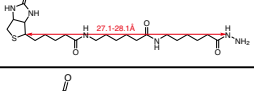
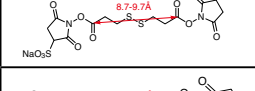
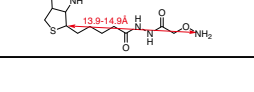
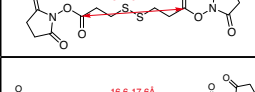

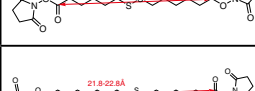
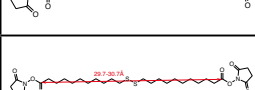
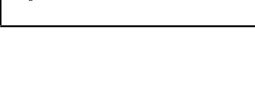

NBD-F 23
ABD-F	
NAM	
SBD-F	
DDB 24
MDB	
Br-DMEQ	
Br-Mmc	
DMEQ-COCl	

5. 関連試薬

DTPA anhydride 25
BABE	
FeBABE	
AB-NTA free acid	
Aminobenzyl-EDTA 26
Isothiocyanobenzyl-EDTA	
Maleimido-C ₃ -NTA	
Isothiocyanobenzyl-NTA	
Dithiobis(C ₂ -NTA)	

タンパク質架橋剤、ラベル化剤

Spacer length 一覧表

ビオチン試薬類				二価性試薬類			
品コード	品名	構造式	Spacer length (Å)	品コード	品名	構造式	Spacer length (Å)
B572	Biotin-SS-Sulfo-OSu		16.6-17.6	G005	GMBS		7.2-8.2
B573	Biotin-HPDP		21.9-22.9	E018	EMCS		9.8-10.8
B304	Biotin-OSu		6.1-7.1	H257	HMCS		12.4-13.4
B305	Biotin-AC ₅ -OSu		15.3-16.3	K214	KMUS		16.4-17.4
B306	Biotin-(AC ₅) ₂ -OSu		24.5-25.5	S025	Sulfo-GMBS		7.2-8.2
B319	Biotin Sulfo-OSu		6.1-7.1	S024	Sulfo-EMCS		9.8-10.8
B320	Biotin-AC ₅ Sulfo-OSu		15.3-16.3	S026	Sulfo-HMCS		12.4-13.4
B321	Biotin-(AC ₅) ₂ Sulfo-OSu		24.5-25.5	S250	Sulfo-KMUS		16.4-17.4
B300	Biotin-PE-maleimide		16.5-17.5	S330	Sulfo-SMCC		8.6-9.6
B299	Biotin-PEAC ₅ -maleimide		25.3-26.3	S291	SPDP		3.5-4.5
B303	Biotin-hydrazide		8.7-9.7	S359	Sulfo-AC ₅ -SPDP		12.6-13.6
B302	Biotin-AC ₅ -hydrazide		17.9-18.9	B574	BS3		8.7-9.7
B301	Biotin-(AC ₅) ₂ -hydrazide		27.1-28.1	D630	DTSSP		8.7-9.7
A305	ARP(Aldehyde Reactive Probe)		13.9-14.9	D629	DSP		8.7-9.7
				D539	Dithiobis(succinimidyl hexanoate)		16.6-17.6
				D538	Dithiobis(succinimidyl octanoate)		21.8-22.8
				D537	Dithiobis(succinimidyl undecanoate)		29.7-30.7

はじめに

概要

標識したタンパク質は、抗原抗体反応などとの組み合わせにより、多くの分析に用いられる。原理的には様々な化合物をタンパク質に標識することができるが、抗体への標識に限ると、蛍光やビオチン、キレート、酵素等がよく用いられる。タンパク質に標識する場合は、アミノ基 (NH₂)、スルフヒドリル基 (SH)、カルボキシル基 (COOH)、還元糖末端や過ヨウ素酸化により生じるアルデヒド基 (CHO) 等が標識部位として利用できる。

アミノ基に対しては、一般的に *N*-ヒドロキsuccinimidエステル (NHS)、SH 基に対してはマレイミド基、アルデヒド基に対してはヒドラジド (NHNH₂) が用いられる。カルボキシル基は、NHS を用いて活性化して、アミノ基を持つ標識試薬と結合させることができるが、タンパク質にはアミノ基が数多く存在し自己カップリングするため、通常使用されることはない。アルデヒド基は、糖タンパク質の糖鎖を過ヨウ素酸で酸化することにより生じる。一級アミノ基と反応し Schiff 塩基としたのち、還元して安定な結合を形成する。

それぞれの標識方法は、目的に応じて使い分けることになる。アミノ基への標識は、部位を特定できないため、場合によっては、タンパク質の活性に大きく影響を与える場合があるが、標識方法が極めて単純なので抗体などのタンパク質標識に利用される。スルフヒドリル基への導入は、システインを導入した組換えタンパク質に用いられることが多く、部位を特定した標識になる。糖鎖を酸化し調製したアルデヒド基を用いる場合は、一級アミノ基を持つ化合物よりも安定な構造を形成するヒドラジド化合物あるいはアミノオキシ基の方が還元操作を必要としない分、有利である。以下に、タンパク質標識に一般的に用いられるアミノ基およびスルフヒドリル基への反応についてまとめた。

タンパク質のアミノ基への標識

アミノ基 (NH₂ 基) へ結合できる反応基は、上記の NHS 以外に、イソチオシアノ基 (ITC)、スルホン酸クロリド、カルボン酸クロリド、エチレンオキシド、アルキルクロリド、アルデヒド基、カルボン酸無水物など、数多く知られている。しかしながら、タンパク質のアミノ基を介して目的とする標識化合物を共有結合的に付加させる場合には、水系での反応が必須で、反応溶液の pH が中性～弱アルカリ性領域にあること、氷冷下から 37°C 程度の反応温度で短時間に反応が進むことなど、反応化合物を使用できる条件が限られており、NHS や ITC が用いられる場合が多い。

NHS や ITC は中性の条件で、遊離一級アミノ基と反応する。アルキルアミンは弱塩基性で遊離アミノ基となるため、反応時の pH は 8.5～9 が一般的である。タンパク質などの高分子への反応では、普通アミノ基が複数個あり pKa が低いアミノ基が存在するため、pH7 程度の pH 領域でも反応できる。アミノ基との反応は、加水分解との競争反応でもあるので、加水分解を抑えるには、低い pH や低温での反応が望ましい。

標識試薬の水溶性が低い場合には、普通、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して、反応バッファーに加え、均一溶液として反応させる。溶解しにくい化合物を付加すると、タンパク質が不溶化することもあり、付加する分子数を必要以上に上げないことが求められる。また、蛍光試薬を結合させる場合には、蛍光試薬同士が近接すると蛍光消光が起こり、分子あたりの蛍光量が大きく減少するため、導入量のコントロールが極めて重要である。

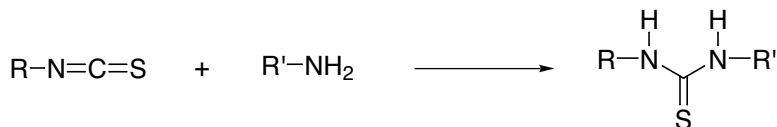
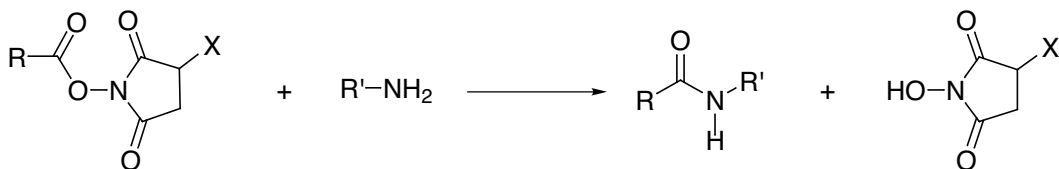


図1 イソチオシアノ基と一級アミノ基の反応



X = H, SO₃Na

図2 NHS 基と一級アミノ基の反応

タンパク質のスルヒドリル基への標識

スルヒドリル基 (SH 基) は、通常、タンパク質中ではジスルフィド (S-S) となっており、SH 基として存在する場合には、金属イオンと結合した構造をとり反応の活性中心となっているなど、タンパク質機能に大きく影響する。このような SH 基は、標識部位としては使用できない。そのため、タンパク質の SH 基を標識部位として用いるには、ジスルフィド構造を還元し、SH 基として使うことになる。ジスルフィドの還元には、ジチオスレイトール (DTT) や、 β -メルカプトエタノール (β -ME) などが使用される。タンパク質中のジスルフィドを全て還元して SH とすると、タンパク質機能が失われてしまう可能性があるため、一部の SH 基を還元し標識部位として使用する。

SH 基への標識にはマレイミド基やプロモアセトアミド基などが一般的に用いられる。いずれも pH6 ~ 7.5 の中性条件で使用でき、加水分解も受けにくいので、タンパク質標識に広く用いられている。但し、タンパク質によっては還元で活性がなくなってしまうものもあり、どのタンパク質にでも使用できる標識方法ではないが、抗体の場合は、還元が特異性を出す部分に与える影響は比較的小さいため、よく使用されている。還元によって失活する危険性はモノクローナル抗体の方がポリクローナル抗体の場合よりも高いと考えられるが、モノクローナル抗体の場合も還元剤の量を加減することにより、還元による活性低下を防ぐことができるため、適当な還元剤によって抗体のジスルフィドを SH としマレイミド基やプロモアセトアミド基を使って目的化合物を導入することが一般的に行われている。抗体のヒンジ部位にあるジスルフィドが還元され SH となった部分に目的化合物が付加することが理想的であるが、それ以外の部位のジスルフィドも還元されるため、還元剤の使用量を必要以上に用いないことが重要である。

また、マレイミド基は中性の状態では安定であるが、pH7.5 を超えると加水分解によりマレイン酸構造となるため、あまり pH を上げすぎないようにする。SH 基を介して標識した抗体は、アミノ基を介して標識した抗体に比べ一般的に抗体の抗原認識活性が高い。これは、抗体への結合が部位特異的であるためと考えられる。しかしながら、還元操作を加えることによって抗体の構造変化が起こり、非特異的吸着の度合いも高くなるのが観察される場合もある。シグナル/ノイズ比 (S/N 比) を向上させる目的としては、ブロッキング剤やバッファーの検討も必要である。

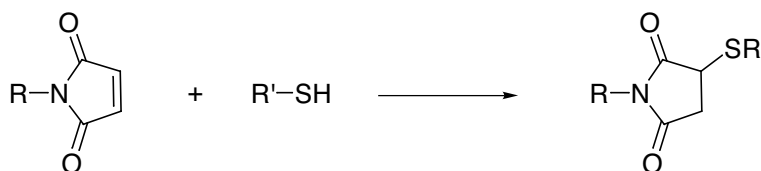


図3 マレイミド基と SH 基の反応

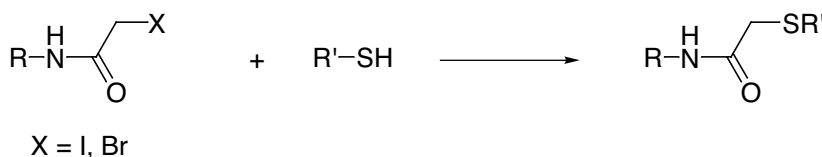


図4 プロモ (ヨード) アセトアミド基と SH 基の反応

弊社では、その他、フルオレセインや Sulforhodamine 101、インドシアニン色素を標識するための試薬、HPLC 分析用のラベル化剤、種々のリンカーを持つビオチン標識試薬および二種類のタンパク質を架橋するための二価性試薬を取り揃えている。

また、酵素 (ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)、蛍光タンパク質、蛍光色素およびビオチンをタンパク質に標識するためのキットも取り揃えている。これらの試薬には、あらかじめ活性エステル基あるいはマレイミド基が導入されており、タンパク質のアミノ基あるいはスルヒドリル基を介して標識することができる。反応条件はすでに最適化されており、標識に必要な試薬やバッファー類などが全て含まれているため、本キットを用いて簡便に標識タンパク質を調製することができる。

詳しくは、小社 HP をご参照されたい。(http://dominoweb.dojindo.co.jp/goodsr7.nsf/ByItemLInfo/09)

表. ラベル化剤の特性一覧表

	対象官能基	品名	検出	λ_{ex}	λ_{em}	備考
タンパク質標識試薬	アミノ基	CFSE	蛍光	496	516	細胞質標識剤
		FITC-I	〃	495	520	タンパク質等のアミノ基ラベル化剤
		IC3-OSu special packaging	〃	550	570	アミノ酸やペプチド中のアミノ基用のラベル化剤
		IC5-OSu special packaging	〃	640	660	〃
		Sulforhodamine 101 acid chloride	〃	568	590 ~ 630	タンパク質等のアミノ基ラベル化剤
		ICG-Sulfo-OSu	〃	768	807	〃
HPLC用誘導体化試薬	アミノ基	NBD-F	蛍光	470	530	HPLCのプレカラムラベル化剤
		ABD-F	蛍光	389	513	HPLCのプレカラムラベル化剤
	SH基	NAM	〃	365	435 ~ 440	HPLCのプレカラムラベル化剤
		SBD-F	〃	385	515	〃
	アルデヒド基	DDB	蛍光	338	402	芳香族アルデヒドの検出
		MDB	〃	367	445	α -ケト酸のHPLCプレカラムラベル化剤
	カルボン酸	Br-DMEQ	蛍光	370	450	HPLCのプレカラムラベル化剤
		Br-Mmc	〃	360	410	〃
水酸基	DMEQ-COCl	蛍光	400	500	HPLCのプレカラムラベル化剤	
ビオチンラベル化剤	アミノ基	Biotin-OSu	〃	—	—	アミノ基へのビオチン導入剤、AC基の数でビオチンと被標識分子の距離を調整する。
		Biotin-AC ₅ -OSu	〃	—	—	
		Biotin-(AC ₅) ₂ -OSu	〃	—	—	
		Biotin Sulfo-OSu	〃	—	—	アミノ基へのビオチン導入剤、AC基の数でビオチンと被標識分子の距離を調整する。水に溶け易い。
		Biotin-AC ₅ Sulfo-OSu	〃	—	—	
		Biotin-(AC ₅) ₂ Sulfo-OSu	〃	—	—	
	SH基	Biotin-SS-Sulfo-OSu	〃	—	—	アミノ基へのビオチン導入剤。スパーサーのジスルフィド結合は還元剤で切断可能。
		Biotin-PE-maleimide	〃	—	—	SH基へのビオチン導入剤、AC基の数でビオチンと被標識分子の距離を調整する。
	アルデヒド基 カルボン酸	Biotin-PEAC ₅ -maleimide	〃	—	—	
		Biotin-HPDP	〃	—	—	
Biotin-hydrazide		〃	—	—	アルデヒド基、カルボン酸へのビオチン導入剤、AC基の数でビオチンと被標識分子の距離を調整する。	
その他	アミノ基	Biotin-(AC ₅) ₂ -hydrazide	〃	—	—	
		DTPA anhydride	—	—	—	アミノ基へのキレート残基の導入剤。
		SPDP	—	—	—	SH化合物標識用。
		Sulfo-AC ₅ -SPDP	—	—	—	SH化合物標識用。水に溶け易い。

1. ビオチンラベル化剤

対象反応基、蛍光波長は 4 ページ (表. ラベル化剤の特性一覧表) を参照下さい。

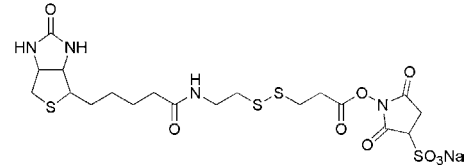
Biotin-SS-Sulfo-OSu

100 mg ; 348-09091 同仁品コード (B572)

N-[[2-Biotinylamino)ethyl]dithiopropionyloxy]sulfosuccinimide, sodium salt
[CAS No. 325143-98-4]

- 規格** (1) 性状：白色～殆ど白色粉末
(2) 純度 (HPLC)：80.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
- 溶解例** 15 mg/ml(水), 10 mg/ml(ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷凍, 2. 吸湿注意

構造式

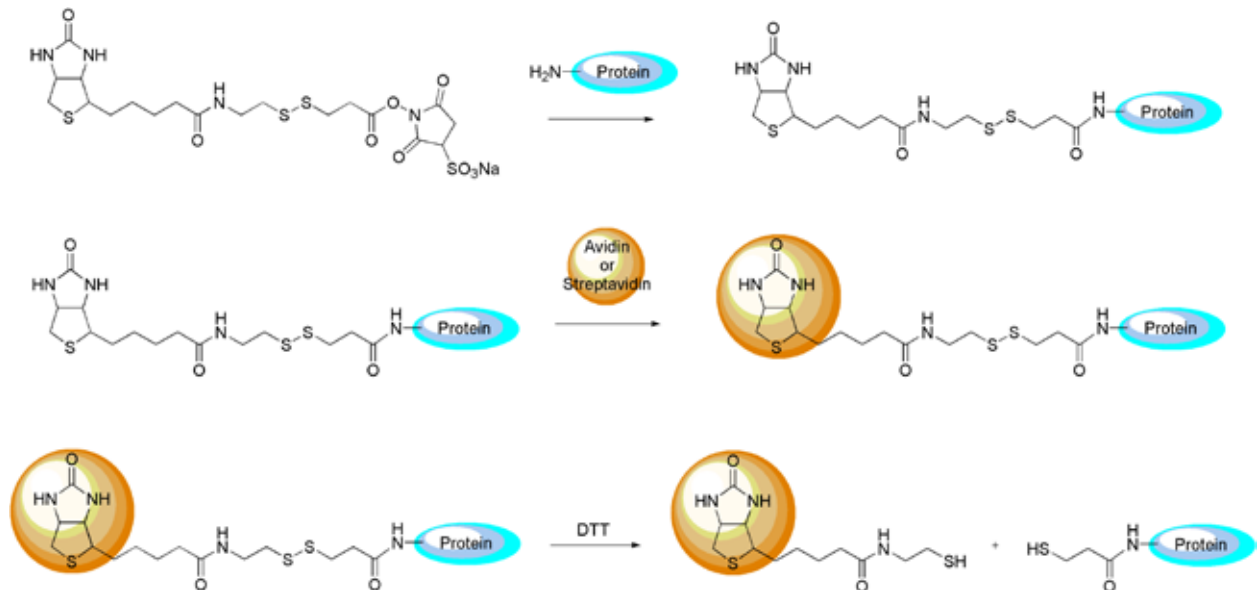


$C_{19}H_{27}N_4NaO_9S_4=606.69$

Spacer length : 16.6-17.6Å

性質 Biotin-SS-Sulfo-OSu は分子内に *N*-ヒドロキシスクシンイミド活性エステル基を持つため、抗体や酵素等のタンパク質のアミノ基にビオチンを導入することができる。Biotin Sulfo-OSu または Biotin-AC₉ Sulfo-OSu 等のリンカーにアルキル鎖のみを有するビオチン標識剤とは異なり、リンカー部位に導入されたジスルフィド基は還元剤により容易に還元されるためリンカー部位の切断が可能である。

Biotin-SS-Sulfo-OSu を用いて標識した分子をアビジンあるいはストレプトアビジンの固定化カラムへ捕捉後、還元操作によるリンカー部位の切断により回収することができる。



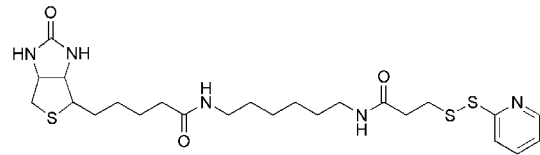
Biotin-HPDP

50 mg ; 341-09101 同仁品コード (B573)

N-[6-(Biotinamide)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide
[CAS No. 129179-83-5]

- 規格** (1) 性状：白色～殆ど白色粉末
(2) 純度 (HPLC): 90.0% 以上
(3) ジメチルホルムアミド溶液：試験適合
- 溶解例** 2 mg/ml(ジメチルホルムアミド)
- 取扱注意** 保存方法：冷蔵

構造式

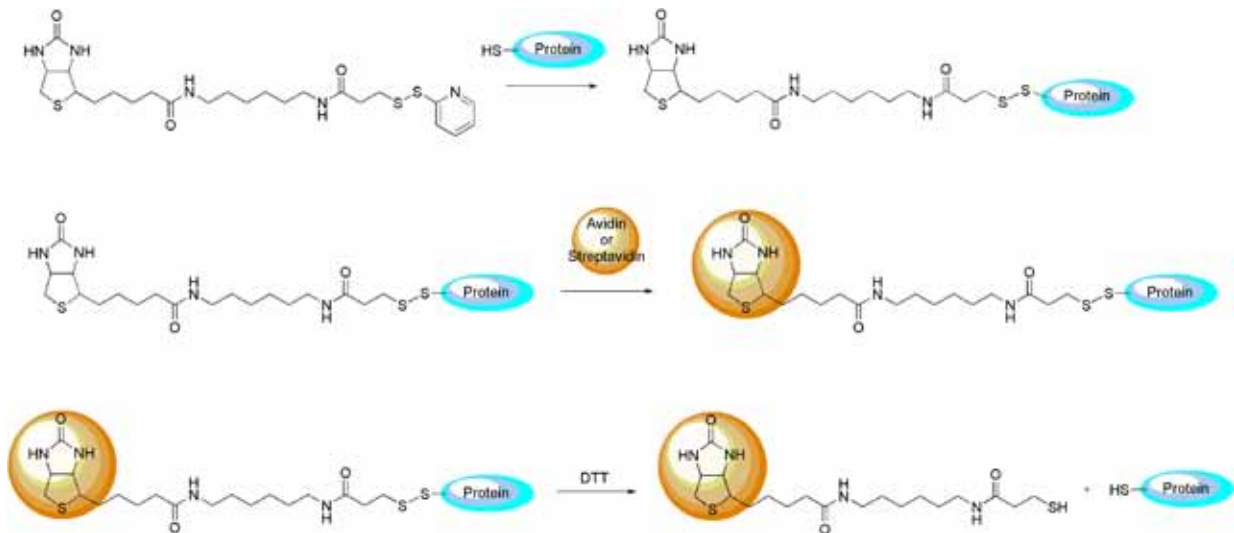


$C_{24}H_{37}N_5O_3S_3=539.78$

Spacer length : 21.9-22.9Å

性質 Biotin-HPDP は、分子内にビオチンおよびピリジルジスルフィド基を有するため、SH 基にビオチンを導入することができる。ピリジルジスルフィド基は還元剤により容易に還元でき、また、タンパク質などの SH 基と交換反応することが可能である。Biotin-SS-Sulfo-OSu と同様、還元操作によるリンカー部位が切断可能な特徴を有しているが、Biotin-HPDP は対象のタンパク質の SH 基と反応するため、ジスルフィド基を還元した後に現れる SH 基は元のタンパク質由来の SH 基に戻ることができる。

Biotin-HPDP を用いて標識した分子をアビジンあるいはストレプトアビジンの固定化カラムへ捕捉後、還元操作によるリンカー部位の切断により回収することができる。



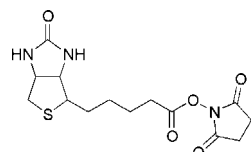
Biotin-OSu

10 mg ; 346-06351 同仁品コード (B304)

Biotin *N*-hydroxysuccinimide ester
[CAS No. 35013-72-0]

- 規格 (1) 性状：白色～微黄色粉末
(2) 純度 (HPLC): 95.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
- 溶解例 10 mg/ml (ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意 保存方法：冷凍

構造式



$C_{14}H_{19}N_3O_5S=341.38$

Spacer length : 6.1-7.1Å

性質 ビオチンはアビジンと強く結合することが知られており、その性質を利用して高感度分析に広く利用されている。ビオチンとアビジンの結合安定度定数は 10^{15} で、抗原-抗体反応よりも 3～4 桁高いため、一旦アビジンと結合したビオチンは生理的条件下では外れない。また、ビオチンはカルボキシル基を持つ低分子であり、容易に化学修飾することができ、タンパク質等の活性をほとんど損なうことなく標識することができる。したがって、抗体を用いた免疫分析のための標識剤として、数多くのビオチン化合物が開発されてきた。タンパク質のアミノ基 (NH_2 基) との結合には、通常、活性エステル基を持つビオチンが用いられ、スルフヒドリル基 (SH 基) には、マレイミド基を持つビオチンが用いられる。

目的に応じて、アビジンが認識するビオチンヘッドと反応基の間のスペーサーの長さを選択する必要があるが、一般にスペーサーが長い方が、アビジンを結合させた際の抗体への抗原認識活性への影響が少ないと考えられている。ただし、スペーサー部分が非特異的吸着を起こす場合もあり、測定の際のバックグラウンドが高くなることもあるため、測定感度を向上させるには、S/N(シグナル・ノイズ比)を見て、適当な長さのスペーサーを選択する必要がある。

スペーサーには通常、アミノカプロン酸が用いられ、アミド結合でビオチンに一分子のアミノカプロン酸を導入した化合物と二分子導入した化合物がある。カプロン酸スペーサーが長くなると水溶性が乏しくなるため、ビオチン標識試薬を DMSO に溶解し、タンパク質を含むバッファー溶液に添加する方法が一般的である。

タンパク質のアミノ基標識の際に有機溶媒が使用できない場合には、スルホン酸基を持つ活性エステル化合物が利用できる。また、スルフヒドリル基への反応に際しては、同様に DMSO で調整した溶液が用いられるが、スペーサー部分にピペラジン構造を持つため、中性領域では、プロトン化されることにより、水溶性を示す。

還元糖に用いられるビオチンヒドラジド化合物は、水溶性が低く DMSO 溶液での調整が必要となる。

ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) では、ビオチン標識した抗体に対して、酵素標識ストレプトアビジンを結合させる方法が一般的である。ストレプトアビジンに比べ、アビジンは安価であるが ELISA などに用いられるケースは極めて少ない。理由は、バックグラウンドが極めて高くなるため、PI が高いことが原因であると考えられている。カラムによるビオチン結合タンパク質などの分離目的には一般的にアビジンが用いられる。

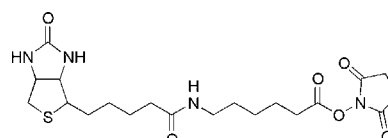
Biotin-AC₅-OSu

10 mg ; 343-06361 同仁品コード (B305)

6-(Biotinylamino)hexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester
[CAS No. 72040-63-2]

- 規格 (1) 性状：白色～微黄色粉末
(2) 純度 (HPLC): 95.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
- 溶解例 10 mg/ml (ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意 保存方法：冷凍

構造式



$C_{20}H_{30}N_4O_6S=454.54$

Spacer length : 15.3-16.3Å

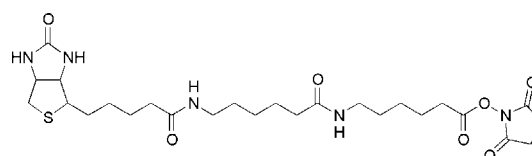
Biotin-(AC₅)₂-OSu

10 mg ; 340-06371 同仁品コード (B306)

6-[6-(Biotinylamino)hexanoylamino]hexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester
[CAS No. 89889-52-1]

- 規格 (1) 性状：白色～微黄色粉末
(2) 純度 (HPLC): 90.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
(4) IR スペクトル：試験適合
(5) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例 10 mg/ml (ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意 保存方法：冷凍

構造式



$C_{26}H_{41}N_5O_7S=567.70$

Spacer length : 24.5-25.5Å

Biotin Sulfo-OSu

10 mg ; 345-06821 同仁品コード (B319)

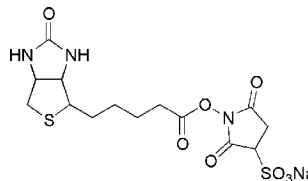
Biotin *N*-hydroxy-sulfosuccinimide ester
[CAS No. 119616-38-5]

規格 (1) 性状：白色～淡赤褐色粉末
(2) 純度 (HPLC): 95.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
(4) IR スペクトル：試験適合

溶解例 10 mg/ml(水)

取扱注意 保存方法：冷凍

構造式



$C_{14}H_{18}N_3NaO_8S_2=443.43$
Spacer length : 6.1-7.1Å

Biotin-AC₅ Sulfo-OSu

10 mg ; 348-06811 同仁品コード (B320)

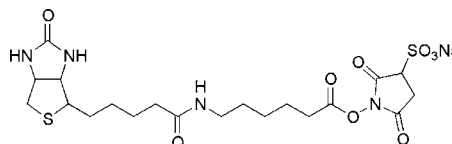
6-(Biotinylamino)hexanoic acid *N*-hydroxy-sulfosuccinimide ester
[CAS No. 109940-19-4]

規格 (1) 性状：白色～淡赤褐色粉末
(2) 純度 (HPLC): 95.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
(4) NMR スペクトル：試験適合

溶解例 10 mg/ml(水)

取扱注意 保存方法：冷凍

構造式



$C_{20}H_{29}N_4NaO_9S_2=556.59$
Spacer length : 15.3-16.3Å

Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu

10 mg ; 341-06801 同仁品コード (B321)

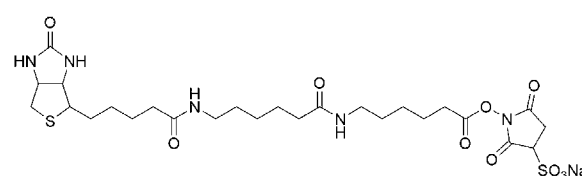
6-[6-(Biotinylamino)hexanoylamino]hexanoic acid *N*-hydroxy-sulfosuccinimide ester
[CAS No. 180028-78-8(free acid)]

規格 (1) 性状：白色～淡赤褐色粉末
(2) 純度 (HPLC): 95.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
(4) NMR スペクトル：試験適合

溶解例 10 mg/ml(水)

取扱注意 保存方法：冷凍

構造式



$C_{26}H_{40}N_5NaO_{10}S_2=669.75$
Spacer length : 24.5-25.5Å

Biotin-PE-maleimide

10 mg ; 347-06381 同仁品コード (B300)

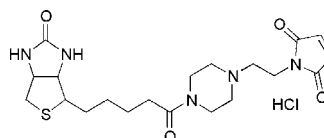
N-Biotinyl-*N'*-[2-(*N*-maleimido)ethyl]piperazine, hydrochloride

規格 (1) 性状：白色～微黄色粉末
(2) 純度 (HPLC): 90.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合

溶解例 10 mg/ml(ジメチルスルホキシド)

取扱注意 保存方法：冷凍

構造式



$C_{20}H_{30}ClN_5O_4S=472.00$
Spacer length : 16.5-17.5Å

Biotin-PEAC₅-maleimide

10 mg ; 344-06391 同仁品コード (B299)

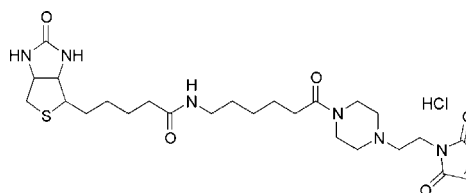
N-6-(Biotinylamino)hexanoyl-*N'*-[2-(*N*-maleimido)ethyl]piperazine, hydrochloride

規格 (1) 性状：白色～微黄色粉末
(2) 純度 (HPLC): 90.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合

溶解例 10 mg/ml(ジメチルスルホキシド)

取扱注意 保存方法：冷凍

構造式



$C_{26}H_{41}ClN_6O_5S=585.16$
Spacer length : 25.3-26.3Å

Biotin-hydrazide

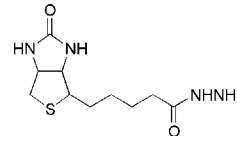
10 mg ; 347-06401 同仁品コード (B303)

Biotin hydrazide

[CAS No. 66640-86-6]

- 規格** (1) 性状：白色～微黄色粉末
(2) 純度 (HPLC): 95.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
- 溶解例** 10 mg/ml(ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 保存方法：冷凍

構造式



$C_{10}H_{16}N_4O_2S=258.34$

Spacer length : 8.7-9.7Å

Biotin-AC₅-hydrazide

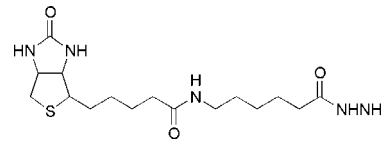
10 mg ; 344-06411 同仁品コード (B302)

6-(Biotinylamino)hexanoylhydrazine

[CAS No. 109276-34-8]

- 規格** (1) 性状：白色～微黄色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 95.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
- 溶解例** 10 mg/ml(ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 保存方法：冷凍

構造式



$C_{16}H_{29}N_5O_3S=371.50$

Spacer length : 17.9-18.9Å

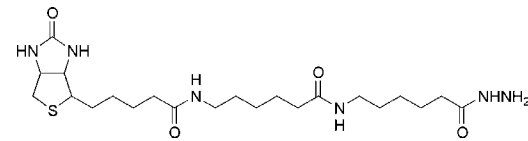
Biotin-(AC₅)₂-hydrazide

10 mg ; 341-06421 同仁品コード (B301)

6-[6-(Biotinylamino)hexanoylamino]hexanoylhydrazine

- 規格** (1) 性状：白色～微黄色粉末
(2) 純度 (HPLC): 95.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
- 溶解例** 10 mg/ml(ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 保存方法：冷凍

構造式



$C_{22}H_{40}N_6O_4S=484.66$

Spacer length : 27.1-28.1Å

ARP(Aldehyde Reactive Probe)

10 mg ; 340-07611 同仁品コード (A305)

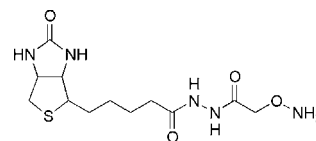
N-(Aminoxyacetyl)-*N'*-biotinyl-hydrazine

[CAS No.139585-03-8]

- 規格** (1) 性状：白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 95.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
(4) IR スペクトル：試験適合
(5) NMR スペクトル：試験適合

- 溶解例** 10 mg/ml(水)
- 取扱注意** 保存方法：冷凍

構造式



$C_{12}H_{21}N_5O_4S=331.39$

Spacer length : 13.9-14.9Å

プロトコル

I 細胞表面タンパク質のビオチンラベル化¹⁾

1. 使用試薬

- ・ビオチンラベル化剤 Biotin-SS-Sulfo-OSu (Code: B572)
- ・Quench buffer (50 mmol/l Tris-HCl (pH8.0), 0.1 mmol/l EDTA, 150 mmol/l NaCl)
- ・Lysis Buffer (50 mmol/l Tris-HCl (pH8.0), 150 mmol/l NaCl, 0.2% NaN₃, 0.1% SDS, 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate (Code: D520))
- ・Streptavidin 固定ビーズ
- ・Loading dye (60 mmol/l Tris-HCl (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 350 mmol/l β-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)

2. タンパク質のビオチンラベル化の操作方法

(1) 細胞表面タンパク質のビオチンラベル化方法

- 1) 薬剤で処理をした細胞を準備する (T-75 フラスコ)。
- 2) 冷 PBS で 2 回洗浄した後、1 mg/ml Biotin-SS-Sulfo-OSu (in PBS) を添加し、4°C で 30 分間、振とうしながら反応する。
- 3) 反応後、冷 Quench buffer で 2 回洗浄後、冷 PBS にて 1 回洗浄する。
- 4) 細胞をフラスコ上からかき取り、遠沈管に移した後、遠心して細胞を沈殿させる。

- 5) 100 µl の Lysis Buffer を添加し、30 分間氷上でインキュベートして細胞を溶解する。
- 6) 4°C で遠心し、上清を新しいチューブに取る。タンパク質濃度を測定する。

(2) 細胞表面タンパク質の分離精製

- 1) タンパク質量 200 ~ 250 µg (200 µl Lysis Buffer) に Streptavidin 固定ビーズを添加し、4°C で一晩振とうしながら反応させる。
- 2) 遠心してビーズを沈殿させながら、Lysis Buffer で 5 回洗浄する。
- 3) 55 µl の Loading Dye を沈殿ビーズに添加し、37°C で 30 分間インキュベートする。
- 4) 遠心して得られた上清を新しいチューブに移す。
- 5) 4 ~ 15% SDS- ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行う。

<参考文献>

- 1) Scott R. Witting *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 40121.

II アミノ基標識用ビオチンラベル化剤を用いたビオチンラベル化

1. 使用試薬

- ・10 mmol/l Bicine Buffer (pH8.5)
- ・ビオチンラベル化剤
Biotin-OSu (Code: B304), Biotin-AC₅-OSu (Code: B305),
Biotin-(AC₅)₂-OSu (Code: B306), Biotin Sulfo-OSu (Code: B319),
Biotin-AC₅ Sulfo-OSu (Code: B320),
Biotin-(AC₅)₂ Sulfo-OSu (Code: B321)
- ・DMSO (ジメチルスルホキシド, Code: SP10)
- ・NAP-5 (GE ヘルスケア社)
- ・PBS (pH7.4) (NaCl 8.0 g/l, KCl 0.2 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l)

2. タンパク質のビオチンラベル化の操作方法

(1) ビオチンラベル化剤溶液を、以下を参考に調製する (50 mmol/l)。

ビオチンラベル化剤	溶解方法 (50 mmol/l)
Biotin-OSu	3.4 mg/DMSO 200 µl
Biotin-AC ₅ -OSu	4.5 mg/DMSO 200 µl
Biotin-(AC ₅) ₂ -OSu	5.7 mg/DMSO 200 µl
Biotin Sulfo-OSu	4.4 mg/ 純水 200 µl
Biotin-AC ₅ Sulfo-OSu	5.6 mg/ 純水 200 µl
Biotin-(AC ₅) ₂ Sulfo-OSu	6.7 mg/ 純水 200 µl

(2) タンパク質のビオチンラベル化方法

- 1) タンパク質を 10 mmol/l Bicine Buffer (pH8.5) に溶解する。
- 2) タンパク質とビオチンラベル化剤の混合モル比が 1 : 2 ~ 1 : 10 となる様に (1) で調製したビオチンラベル化剤溶液を、1) のタンパク質溶液に添加する。
- 3) よく混和した後、振とうしながら恒温槽 (25°C) 中で 2 ~ 4 時間インキュベートする。

(3) ラベル化したタンパク質のゲルろ過精製

- 1) NAP-5 の上部キャップを外し、充填液を捨てる。
- 2) 流出口のキャップを外し、PBS を数 ml ずつピペットで取りカラムへロードする。1 カラム当たり総量として 10 ml を流し、ゲルを平衡化させる。
- 3) (2) でラベル化したタンパク質溶液のサンプルチューブから 500 µl をマイクロピペットで測り取りカラムへロードする。この時の流出液は廃棄する。
- 4) カラムの流出口に試験官などを置き、1.0 ml の PBS をマイクロピペットでカラムにロードし、ビオチン標識したタンパク質を溶出する。

* ビオチンラベル化剤は加水分解しやすいので、溶解後の操作は手早く行い、速やかに (2) の操作に移る。

III SH 基標識用ビオチンラベル化剤を用いたビオチンラベル化

1. 使用試薬

- ・ 10 mmol/l HEPES Buffer (pH8.0)
- ・ 1,4-Dithiothreitol (DTT)
- ・ ビオチンラベル化剤
Biotin-PE-maleimide (Code: B300), Biotin-PEAC₅-maleimide (Code: B299)
- ・ DMSO (ジメチルスルホキシド, Code: SP10)
- ・ NAP-5 (GE ヘルスケア社)
- ・ NAP-10 (GE ヘルスケア社)
- ・ PBS (pH7.4) (NaCl 8.0 g/l, KCl 0.2 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l)

2. 抗体のビオチンラベル化操作方法

(1) SH 基を持つ抗体の調製方法

- 1) DTT を 200 mmol/l になるように PBS に溶解する。
- 2) タンパク質 1.0 ~ 5.0 mg を精秤 (秤量値を記録) し、マイクロピペットにて HEPES Buffer を 500 μl 添加し溶解する。
- 3) 2) のタンパク質溶液に 1) の DTT 溶液を 2 μl 添加し、よく混和する。

(2) ゲルろ過精製

- 1) NAP-5 の上部キャップを外し、充填液を捨てる。
- 2) 流出口のキャップを外し、PBS を数 ml ずつピペットで取り、カラムへロードする。1 カラム当たり総量として 10 ml を流し、ゲルを平衡化させる。

3) (1) で調製した抗体溶液のサンプルチューブから 500 μl をマイクロピペットで測り取り、カラムへロードする。この時の流出液は廃棄する。

4) カラムの流出口に試験官などを置き、1.0 ml の PBS をマイクロピペットでカラムにロードし、還元した抗体を溶出する。

(3) ビオチンラベル化方法

1) Biotin-PE-maleimide を DMSO に溶解する (50 mmol/l, 4.7 mg/200 μl または 10 mg/424 μl)。

* Biotin-PEAC₅-maleimide の場合は 5.9 mg/200 μl または 10 mg/342 μl。

2) 抗体とビオチンラベル化剤のモル比が 1 : 10 程度となるように (3)-1) で調製したビオチンラベル化剤溶液を、(2) の抗体溶液に添加する。

3) よく混和した後、振とうしながら恒温槽 (25°C) 中で一晩インキュベートする。

(4) ラベル化した抗体のゲルろ過精製

1) NAP-10 の上部キャップを外し、充填液を捨てる。

2) 流出口のキャップを外し、PBS を数 ml ずつピペットで取りカラムへロードする。1 カラム当たり総量として 15 ml を流し、ゲルを平衡化させる。

3) (3) でラベル化した抗体溶液のサンプルチューブから 1 ml をマイクロピペットで測り取りカラムへロードする。この時の流出液は廃棄する。

4) カラムの流出口に試験官などを置き、1.5 ml の PBS をマイクロピペットでカラムにロードし、ビオチン標識した抗体を溶出する。

表 各種タンパク質に対するラベル化率

	タンパク質溶液の濃度	ビオチン試薬溶液添加量		混合比 ^{a)}	ラベル化率 ^{b)} (mol/mol)
		濃度	添加量 (μl)		
rProtein A (MW=42,000)	5 mg/500 μl	10 mg/355 μl	5.7	2.0	1.8
			14.3	5.0	4.5
			28.6	10.1	7.5
	2.5 mg/500 μl		2.9	2.0	1.5
			7.1	5.0	4.3
			14.3	10.1	8.1
	1.25 mg/500 μl		1.4	2.0	1.8
			3.6	5.1	3.7
			7.1	10.0	7.3
BSA (MW=68,000)	2.5 mg/500 μl	10 mg/567 μl	2.9	2.1	1.6
			7.1	5.1	3.6
			14.3	10.2	6.4
IgG (MW=150,000)	2.5 mg/500 μl	10 mg/1,218 μl	2.9	2.1	1.3
			7.1	5.2	3.6
			14.3	10.5	6.6

上記結果は、小社での実測データであり、条件により若干変動する可能性がある。また、ラベル化率の算出は、V の HABA 法により行った。

a) タンパク質 1 mol に対して混合したビオチン試薬のモル数

b) タンパク質 1 mol に結合したビオチンのモル数

IV アルデヒド基（還元糖末端）標識用ビオチンラベル化剤を用いたビオチンラベル化

1. 使用試薬

- ・ 150 mmol/l NaCl 含有 10 mmol/l MES Buffer (pH5.5)
- ・ 過ヨウ素酸ナトリウム溶液 (100 mmol/l NaClO₄; 上記 MES buffer で用時調製)
- ・ Biotin-hydrazide(Code: B303), Biotin-AC₅-hydrazide(Code: B302), Biotin-(AC₅)₂-hydrazide(Code: B301)
- ・ DMSO (ジメチルスルホキシド) (Code: SP10)
- ・ NAP-5(GE ヘルスケア社)
- ・ NAP-10(GE ヘルスケア社)
- ・ PBS(pH7.4)

2. タンパク質のビオチンラベル化の操作方法

(1) アルデヒド基（還元糖末端）を持つタンパク質の調製方法

- 1) タンパク質 1.0 ~ 5.0 mg を精秤（秤量値を記録）し、MES buffer を 500 μl 添加する。溶解後、氷浴上に冷却する。
- 2) 1) のタンパク質溶液に過ヨウ素酸ナトリウム溶液を 2 μl 添加し、よく混和して 0°C で 20 ~ 30 分反応させる。

(2) タンパク質のゲルろ過精製

- 1) NAP-5 の上部キャップを外し、充填液を捨てる。
- 2) 流出口のキャップを外し、PBS を数 ml ずつピペットでとり、カラムへロードする。1 カラム当り総量として 10 ml を流し、ゲルを平衡化させる。

3) (1) で調製したタンパク質溶液のサンプルチューブから 500 μl をマイクロピペットで測りとりカラムへロードさせる。この時の流出液は廃棄する。

4) カラムの流出口に試験管などを置き、1.0 ml の PBS をマイクロピペットにてカラムにロードし、還元したタンパク質を溶出する。

(3) タンパク質のビオチンラベル化方法

1) ビオチン試薬 Biotin-hydrazide (50 mmol/l, 2.6 mg/200 μl) を DMSO に溶解する。(Biotin-AC₅-hydrazide の場合は 3.7 mg/200 μl, Biotin-(AC₅)₂-hydrazide の場合は 4.7 mg/200 μl)

2) 目的とするモル比になるように 1) で作製したビオチン試薬溶液を、(2) で得られたタンパク質溶液に添加する。

3) よく混和し、振とうしながら恒温槽 (25°C) 中で 4 時間インキュベートする。

(4) ラベル化したタンパク質のゲルろ過精製

NAP-10 を使用し、(2) を参照して精製を行なう。

V HABA 法によるタンパク質のラベル化率の算出

1. 原理

タンパク質へのビオチン試薬のラベル化率は、HABA(4-Hydroxy-azobenzene-2'-carboxylic acid) を用いた方法で調べることができる。

HABA はアビジンに取りこまれ 500 nm に吸収を持つ。一方、ビオチンは HABA よりアビジンに対する親和性が高いため、HABA-Avidin 溶液に、ビオチンラベル化したタンパク質を添加すると、HABA に代わってビオチンがアビジンと結合する。アビジンから HABA が解離すると 500 nm の吸光度が減少するため、その減少からビオチンのラベル化率を算出することができる。

2. 使用試薬

- ・ Avidin from Egg White : (nacalai tesque 035-53) 10 mg
- ・ HABA : (東京化成 H0586) 14 mg
- ・ DMSO : (Sp)DMSO (Code: SP10) 500 μl
- ・ PBS(pH7.4) 20 ml
 - NaCl 8.0 g/l, KCl 0.2 g/l,
 - Na₂HPO₄ 1.15 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l

3. 測定及び算出方法

- 1) 2 ml サンプルチューブに HABA 14.0 mg を精秤し、マイクロピペットを用いて DMSO 500 μl を添加し溶解する。
- 2) 20 ml メスフラスコに Avidin 10.0(±0.1) mg を精秤し、PBS 15 ml を入れ溶解する（この時点では、20 ml 全量は添加しない）。これに上記 1) で調製した HABA-DMSO 溶液 200 μl をマイクロピペットで添加し、PBS で 20 ml に調整しよく混和する。

3) ミクロセル（容量 1 ml × セル長 1 cm）に、上記 2) の HABA-Avidin 溶液 900 μl をマイクロピペットを用いて入れ、500 nm の吸光度を測定する。3 回繰り返し測定し、3 回の平均値を Abs_A とする。このときの吸光度の値は Abs_A = 約 1.5 になる。

4) 2 ml サンプルチューブに、2) の HABA-Avidin 溶液 900 μl をマイクロピペットを用いて入れる。これにゲル濾過精製を行なったビオチン化タンパク質溶液 100 μl をマイクロピペットを用いて添加し、キャップを閉めた後、ボルテックスで攪拌する。

5) 5 分間以上静置した後、マイクロピペットを用いてセルに移し変え 500 nm の値を読む（この値を Abs_B とする）。タンパク濃度が高い場合、系中のビオチンがアビジンよりも多くなるため、タンパク質に結合した正確なビオチン数が、HABA 法では算出できなくなることがある。このため、Abs_B = 0.7 以下の場合には、タンパク質溶液を適宜希釈（希釈倍率：Z）した後、HABA-Avidin 溶液に添加してラベル化率を算出したほうが良い。

6) Abs_A と Abs_B の値より、下記の式に従いサンプル中のビオチン濃度 B (mol/l) を算出する。

$$B \text{ (mol/l)} = Z \times [10^{-2} \times (0.9 \times \text{Abs}_A - \text{Abs}_B) / 34]$$

7) タンパク質 1 分子に結合したビオチンの数を算出する。

例えば、分子量 MW_{protein} のタンパク質 X g を標識したとすると、ゲルろ過精製後のタンパク濃度 A (mol/l) は、

$$A \text{ (mol/l)} = (X / \text{MW}_{\text{protein}}) \times 10^3$$

と表される。これから、

B / A = タンパク質 1 分子に結合したビオチン数 (mol/mol) を得る。

参考文献

- 1) M. Wilchek, E. A. Bayer, Ed., "Methods Enzymol., Vol. 184 - Avidin-biotin technology", *Academic Press*, **1990**.
- 2) N. M. Green, Avidin, *Adv. Protein. Chem.*, **1975**, *29*, 85.
- 3) M. Wilchek, E. A. Bayer, "Applications of avidin-biotin technology Literature survey", *Methods Enzymol.*, **1990**, *184*, 14.
- 4) N. M. Green, L. Konieczny, E. J. Toms R. C. Valentine, "The use of bifunctional biotinyl compounds to determine the arrangement of subunits in avidin", *Biochem. J.*, **1971**, *125*, 781.

以下に各種ビオチンを用いた標識および HABA 法についての文献をリストアップした。

Succinimidyl Biotins(Hydrophilic)

- 5) J. Wormmeester, F. Stiekema C. Groot, "Immunoselective cell separation", *Methods Enzymol.*, **1990**, *184*, 314.
- 6) J. J. Leary, D. J. Ward, "Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose : Bio-Blots", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, *80*, 4045.
- 7) W. T. Lee, D. H. Conrad, "The murine lymphocyte receptor for IgE. II. Characterization of the multivalent nature of the B lymphocyte receptor for IgE", *J. Exp. Med.*, **1984**, *159*, 1790.
- 8) D. R. Gretch, M. Suter, M. F. Stinski, "The use of biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin affinity chromatography to isolate herpesvirus hydrophobic proteins or glycoproteins", *Anal. Biochem.*, **1987**, *163*, 270.
- 9) M. Shimkus, J. Levy, T. Herman, "A chemically cleavable biotinylated nucleotide : Usefulness in the recovery of protein-DNA complexes from avidin columns", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 2593.
- 10) W. J. LaRochelle, S. C. Froehner, "Immunochemical detection of proteins biotinylated on nitrocellulose replicas", *J. Immunol. Methods*, **1986**, *92*, 65.
- 11) P. S. R. Anjaneyulu, J. V. Staros, "Reactions of *N*-hydroxysulfosuccin-imide active esters", *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1987**, *30*, 117.
- 12) H. M. Ingalls, C. M. Goodloe-Holland, E. J. Luna, "Junctional plasma membrane domains isolated from aggregating Dictyostelium discoideum amebae", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, *83*, 4779.
- 13) J. Guesdon, T. Ternynck, S. Avrameas, "The use of Avidinbiotin interaction in immunoenzymatic techniques", *J. Histochem. Cytochem.*, **1979**, *27*, 1131.

Succinimidyl Biotins (Hydrophobic)

- 14) P. Kongtawelert, P. Ghosh, "A new sandwich-ELISA method determination of keratan sulfate peptides in biological fluids employing monoclonal antibody and labeled avidin biotin technique", *Clin. Chem. Acta*, **1990**, *195*, 17.
- 15) G. Paganelli, S. Perves, A. G. Siccardi, G. Rowlinson, G. Deleide, F. Chiolerio, M. Malcovati, G. A. Scassellati, A. A. Epenetos, "Interperitoneal radio-localization of tumors pretargeted by biotinylated monoclonal antibodies", *Int. J. Cancer*, **1990**, *45*, 1184.
- 16) C. Wagner, U. Kruger, J. E. Shivery, "Selective precipitation of biotin-labeled antigens or monoclonal antibodies by avidin for determining epitope specificities and affinities in solution- phase assays", *Methods Enzymol.*, **1990**, *184*, 162.
- 17) D. M. Boorsma, J. VanBommel, E. M. H. VanderRaaij-Helmer, "Simultaneous immunoenzyme double labeling using two different enzymes linked directly to monoclonal antibodies or with biotin-avidin", *J. Microscopy*, **1986**, *143*, 197.
- 18) A. Komura, T. Tokushita, T. Nakagawa, A. Sasase, M. Ichihashi, S. Ferrone, Y. Mishima, "Specific killing of human melanoma cells with an efficient 10B-compound on monoclonal antibodies", *Pigment Cell Res.*, **1989**, *2*, 259.
- 19) R. Rappuoli, P. Leoncini, P. Tarli, P. Neri, "Competitive enzyme immunoassay for human Chorionic somatomammotropin using the avidin-biotin system", *Anal. Biochem.*, **1981**, *118*, 168.

Maleimide Biotins

- 20) S. Hashida, M. Imagawa, S. Inoue, K-H. Ruan, E. Ishikawa, T. Ueno, "More useful maleimide compounds for the conjugation of Fab' to horseradish peroxidase through thiol groups in the hinge", *J. Appl. Biochem.*, **1984**, *6*, 56.
- 21) E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, T. Ueno, "Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining", *J. Immunoassay*, **1983**, *4*, 209.
- 22) H-J. Friesen, P. Hermentin P. Gronski, "Novel maleimidobiotins for the selective biotinylation of sulfhydryl", *Protides Biol. Fluids*, **1987**, *34*, 43.
- 23) E. Ishikawa, S. Hashida, T. Kohno, T. Kotani, S. Ohtani, "Modification of monoclonal antibodies with enzymes, biotin and fluorochromes and their applications", *Immunol. Ser.*, **1987**, *33*, 113.
- 24) R. B. del Rosalio, R. L. Wahl, "Disulfide bond-targeted radiolabeling : tumor specificity of a streptavidin-biotinylated monoclonal antibody complex", *Cancer Res. (Suppl.)*, **1990**, *50*, 804S.

Hydrazide Biotins

- 25) E. A. Bayer, H. Ben-Hur, M. Wilchek, "Biotin Hydrazide-A selective label for sialic acids, galactose and other sugars in glycoconjugates using avidin-biotin technology", *Anal. Biochem.*, **1988**, *170*, 271.
- 26) N. F. Zaidi, C. F. Lagenaur, R. J. Hilkert, H. Xiong, J. J. Abramson, G. Salama, "Disulfide linkage of biotin identifies a 106-kDa Ca²⁺ release channel in sarcoplasmic reticulum", *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 21737.
- 27) M. Wilchek, J. M. Rosenberg, A. Reisfeld, E. A. Edward, "Direct incorporation of biotin into DNA", *Methods Enzymol.*, **1990**, *184*, 608.
- 28) M. R. Deziel, M. M. Mau, "Biotin conjugated reagent as sitespecific probes of membrane protein structure : application to the study of the human erythrocyte hexose transporter", *Anal. Biochem.*, **1990**, *190*, 297.
- 29) D. J. O'Shannessy, "Antibodies biotinylated via sugar moieties", *Methods Enzymol.*, **1990**, *184*, 162.

HABA Assay

- 30) N. M. Green, "Spectrophotometric determination of avidin and biotin", *Methods Enzymol.*, **1970**, *18-A*, 418.

2. 二価性試薬

二価性試薬は、一分子内に、アミノ基と反応する活性エステル基や SH 基に反応するマレイミド基を持つ試薬で、タンパク質分子を結合させるのに使用される。

保持する官能基、リンカーの長さ、リンカー部位の種類、水溶性の有無により分類される。

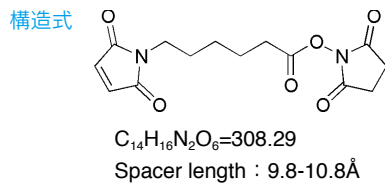
<Hetero-bifunctional Reagents>

EMCS

50 mg ; 344-05051 同仁品コード (E018)
100 mg ; 340-05053 同仁品コード (E018)

N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide
[CAS No. 55750-63-5]

- 規格**
- (1) 性状：白色～微黄白色粉末
 - (2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
 - (3) ジメチルホルムアミド溶状：試験適合
 - (4) 融点：63°C 以上
 - (5) IR スペクトル：試験適合
 - (6) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 200 mg/ml (ジメチルホルムアミド)
- 取扱注意** 保存方法：冷蔵

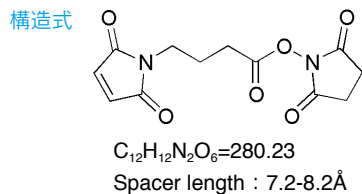


GMBS

50 mg ; 347-05041 同仁品コード (G005)
100 mg ; 343-05043 同仁品コード (G005)

N-(4-Maleimidobutyryloxy)succinimide
[CAS No. 80307-12-6]

- 規格**
- (1) 性状：白色粉末
 - (2) 純度 (HPLC) : 95.0% 以上
 - (3) クロロホルム溶状：試験適合
 - (4) ジメチルホルムアミド溶状：試験適合
 - (5) 融点：124 ~ 132°C
 - (6) IR スペクトル：試験適合
 - (6) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 50 mg/5 ml (クロロホルム)、
50 mg/5 ml (ジメチルホルムアミド)
- 取扱注意** 保存方法：冷蔵

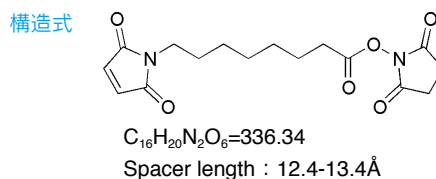


HMCS

50 mg ; 342-06191 同仁品コード (H257)

N-(8-Maleimidocaproyloxy)succinimide

- 規格**
- (1) 性状：白色粉末又は結晶性粉末
 - (2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
 - (3) IR スペクトル：試験適合
 - (4) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 20 mg/ml (アセトニトリル)
- 取扱注意** 保存方法：冷蔵

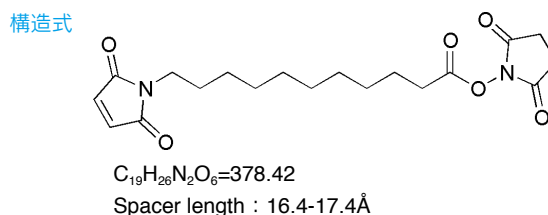


KMUS

50 mg ; 345-06201 同仁品コード (K214)

N-(11-Maleimidoundecanoyloxy)succinimide
[CAS No. 87981-04-2]

- 規格**
- (1) 性状：白色粉末又は結晶性粉末
 - (2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
 - (3) IR スペクトル：試験適合
 - (4) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 20 mg/ml (アセトニトリル)、
20 mg/3 ml (メチルアルコール)
- 取扱注意** 保存方法：冷蔵



Sulfo-EMCS

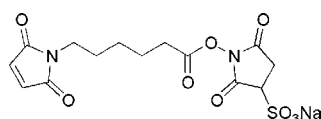
50 mg ; 340-06011 同仁品コード (S024)

N-(6-Maleimidocaproyloxy)sulfosuccinimide, sodium salt
[CAS No. 103848-61-9(free acid)]

- 規格 (1) 性状：白色～微黄桃色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
(4) IR スペクトル：試験適合
(5) NMR スペクトル：試験適合

溶解例 20 mg/ml (水)
取扱注意 保存方法：冷蔵

構造式



$C_{14}H_{15}N_2NaO_9S=410.33$
Spacer length : 9.8-10.8Å

Sulfo-GMBS

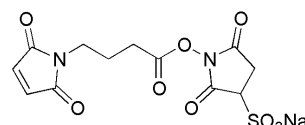
50 mg ; 347-06021 同仁品コード (S025)

N-(4-Maleimidobutyryloxy)sulfosuccinimide, sodium salt
[CAS No. 158018-81-6(free acid)]

- 規格 (1) 性状：白色～微黄桃色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
(4) IR スペクトル：試験適合
(5) NMR スペクトル：試験適合

溶解例 20 mg/ml (水)
取扱注意 保存方法：冷蔵

構造式



$C_{12}H_{11}N_2NaO_9S=382.28$
Spacer length : 7.2-8.2Å

Sulfo-HMCS

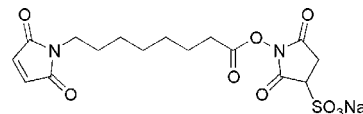
50 mg ; 341-06041 同仁品コード (S026)

N-(8-Maleimidocapryloxy)sulfosuccinimide, sodium salt
[CAS No. 211236-35-0]

- 規格 (1) 性状：白色～微黄桃色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
(4) IR スペクトル：試験適合

溶解例 20 mg/ml (水)
取扱注意 保存方法：冷蔵

構造式



$C_{16}H_{19}N_2NaO_9S=438.39$
Spacer length : 12.4-13.4Å

Sulfo-KMUS

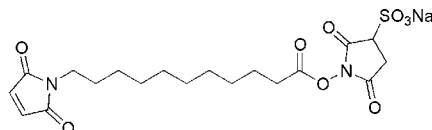
50 mg ; 342-06211 同仁品コード (S250)

N-(11-Maleimidoundecanoyloxy)sulfosuccinimide, sodium salt
[CAS No. 211236-68-9]

- 規格 (1) 性状：白色～微黄桃色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
(4) IR スペクトル：試験適合
(5) NMR スペクトル：試験適合

溶解例 1 mg/ml (水)
取扱注意 保存方法：冷蔵

構造式



$C_{19}H_{25}N_2NaO_9S=480.47$
Spacer length : 16.4-17.4Å

Sulfo-SMCC

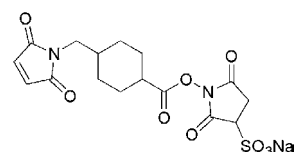
50 mg ; 349-09141 同仁品コード (S330)

N-[(4-Maleimidomethyl)cyclohexylcarbonyloxy]sulfosuccinimide, sodium salt
[CAS No. 92921-24-9]

- 規格 (1) 性状：白色～殆ど白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合

溶解例 10 mg/ml (水)
取扱注意 1. 保存方法：冷凍, 2. 吸湿注意

構造式



$C_{16}H_{17}N_2NaO_9S=436.37$
Spacer length : 8.6-9.6Å

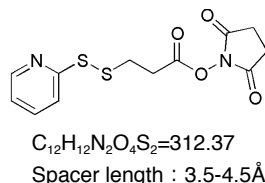
SPDP

100 mg ; 同仁品コード (S291)

N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate
[CAS No. 68181-17-9]

- 規格 (1) 性状：白色～微黄色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 98.0% 以上
(3) アセトニトリル溶状：試験適合
(4) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例 100 mg/50 ml (アセトニトリル)
- 取扱注意 保存方法：冷蔵

構造式



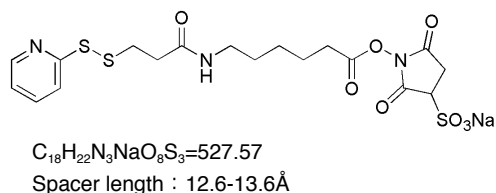
Sulfo-AC₅-SPDP

50 mg ; 346-09151 同仁品コード (S359)

N-(6-[3-(2-Pyridyldithio)propionamido]hexanoyloxy)sulfosuccinimide, sodium salt
[CAS No. 169751-10-4]

- 規格 (1) 性状：白色～殆ど白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
- 溶解例 95 mg/ml (水)
- 取扱注意 1. 保存方法：冷蔵, 2. 吸湿注意

構造式



性質 Sulfo-AC₅-SPDP は、分子内に *N*-ヒドロキスクシンイミド活性エステル基を持つため、抗体や酵素等のタンパク質のアミノ基にピリジルジスルフィド基を導入することができる。ピリジルジスルフィド基は還元剤により容易に還元され SH 基とすることができる。また、タンパク質などの SH 基と交換反応するため、ジスルフィド結合を介してカラムの担体やタンパク質などと結合させることができる。本試薬は、SPDP と異なりスルホン酸基を有する活性エステル基が導入されているため、試薬を溶解するための DMF や DMSO など有機溶媒を用いることなく標識反応を行うことが可能である。

<Homo-bifunctional Reagents>

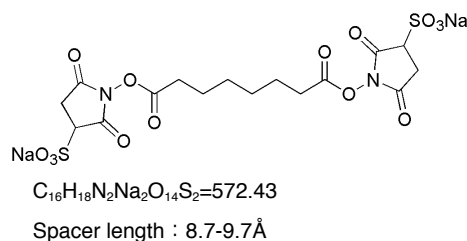
BS3

50 mg ; 348-09111 同仁品コード (B574)

Bis(sulfosuccinimidyl)suberate, disodium salt
[CAS No. 82436-77-9]

- 規格 (1) 性状：白色～殆ど白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 93.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
- 溶解例 10 mg/ml (水)
- 取扱注意 1. 保存方法：冷蔵, 2. 吸湿注意

構造式



性質 アミノ基同士の架橋反応が可能な試薬である。*N*-ヒドロキスクシンイミド活性エステルを分子の両端に有しており、アミノ基に対して選択的に反応するため、酵素標識体の調製や単純ハプテンを担体タンパク質に結合することが可能である。BS3 はリンカー部分にアルキル鎖を有する化学構造をとる。一方、DSP および DTSSP は、リンカー部位にジスルフィド基が導入されていることで還元剤により容易に還元されリンカー部位の切断が可能である。また、BS3 および DTSSP は、スルホン酸基を有する活性エステル基が導入されているため、試薬を溶解する際に DMF や DMSO など有機溶媒を用いることなく標識反応を行うことが可能である。

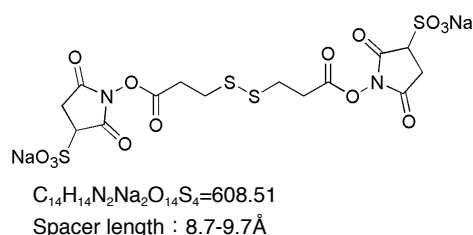
DTSSP

50 mg ; 342-09131 同仁品コード (D630)

Dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate), disodium salt
[CAS No. 81069-02-5]

- 規格 (1) 性状：白色～殆ど白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 80.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
- 溶解例 10 mg/ml (水)
- 取扱注意 1. 保存方法：冷蔵, 2. 吸湿注意

構造式



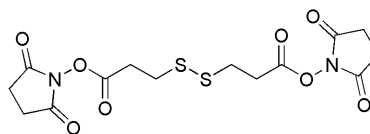
DSP

1 g ; 345-09121 同仁品コード (D629)

Dithiobis(succinimidyl propionate)
[CAS No. 57757-57-0]

- 規格** (1) 性状 : 白色～殆ど白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 95.0% 以上
(3) ジメチルホルムアミド溶状 : 試験適合
- 溶解例** 10 mg/ml (ジメチルホルムアミド)
- 取扱注意** 1. 保存方法 : 冷蔵, 2. 吸湿注意

構造式



$C_{14}H_{16}N_2O_8S_2=404.42$
Spacer length : 8.7-9.7Å

Dithiobis(succinimidyl undecanoate)

10 mg ; 同仁品コード (D537)

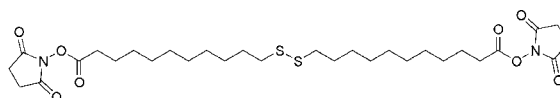
50 mg ; 同仁品コード (D537)

Dithiobis(succinimidyl undecanoate)

略名 (DSU)

- 規格** (1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) NMR スペクトル : 試験適合
- 溶解例** 10 mmol/l 以上 (ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 1. 保存方法 : 冷蔵, 2. 吸湿注意, 窒素置換

構造式



$C_{30}H_{48}N_2O_8S_2=628.84$
Spacer length : 29.7-30.7Å

Dithiobis(succinimidyl octanoate)

10 mg ; 同仁品コード (D538)

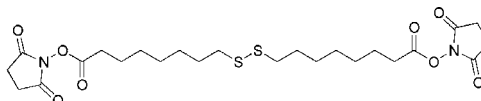
50 mg ; 同仁品コード (D538)

Dithiobis(succinimidyl octanoate)

略名 (DSO)

- 規格** (1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) NMR スペクトル : 試験適合
- 溶解例** 10 mmol/l 以上 (ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 1. 保存方法 : 冷蔵, 2. 吸湿注意, 窒素置換

構造式



$C_{24}H_{36}N_2O_8S_2=544.68$
Spacer length : 21.8-22.8Å

Dithiobis(succinimidyl hexanoate)

10 mg ; 同仁品コード (D539)

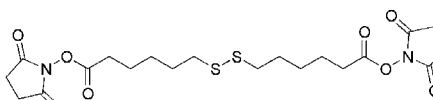
50 mg ; 同仁品コード (D539)

Dithiobis(succinimidyl hexanoate)

略名 (DSH)

- 規格** (1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) NMR スペクトル : 試験適合
- 溶解例** 10 mmol/l 以上 (ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 1. 保存方法 : 冷蔵, 2. 吸湿注意, 窒素置換

構造式



$C_{20}H_{28}N_2O_8S_2=488.58$
Spacer length : 16.6-17.6Å

プロトコル

I Fab' の調製法⁶⁾

1. F(ab')₂ の調製

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ IgG
- ・ プタ胃ペプシン
- ・ 緩衝液 **A**、緩衝液 **B**
- ・ Sephacryl S-200HR(GE ヘルスケア社製)

(2) 操作

- 1) IgG 5 mg/0.5 ml を緩衝液 **A** で透析する。
- 2) 透析液にプタ胃ペプシン 0.1 ~ 0.2 mg を溶解し、37°C で 15 ~ 20 時間インキュベートする。
- 3) pH7 に調整して、Sephacryl S-200HR で、緩衝液 **B** を用いて 0.35 ml/min でゲル濾過する。
- 4) F(ab')₂ 分画をとり、濃縮する。280 nm での吸光度を測定し、100 mg/ml のナトリウムアジドを 1% 添加して保存する。
- 5) MW=92,000、 $E_{280\text{nm}}=1.48\text{ g}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ を用いて濃度を決定する。

$$\text{蛋白濃度 (mg/ml)} = A_{280\text{nm}} / (1.48 \times \text{MW}) \times \text{MW} = A_{280\text{nm}} / 1.48$$

$$\text{または、モル濃度 (mol/l)} = A_{280\text{nm}} / (1.48 \times \text{MW}) \text{ で求める。}$$

※IgG のペプシンによる消化時間は、動物種により異なる。例えば、ウサギ IgG では 6 時間だが、ヤギでは 1 ~ 2 日、ラット・マウスの IgG 2b では、F(ab')₂ とはならない。

2. Fab' の調製^{6,8)}

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ F(ab')₂
- ・ 緩衝液 **C**、緩衝液 **D**

・ 0.1 mol/l 2-メルカプトエチルアミン溶液

(11.36 mg の 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩を緩衝液 **D** 1 ml に溶解する。)

(2) 操作

- 1) 0.1 ~ 3 mg の F(ab')₂ を含む緩衝液 **C** 0.45 ml に、2-メルカプトエチルアミン溶液 50 μl を添加する。
- 2) 37°C で 90 分間インキュベートする。
- 3) Ultrogel AcA44 カラムで、緩衝液 **D** を用いて 0.35 ml/min でゲル濾過する。
- 4) Fab' 分画をとり 280 nm の吸光度を測定し、MW=46,000、 $E_{280\text{nm}}=1.48\text{ g}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ を用いて濃度を決定する。さらに、後述の方法で、SH 基を定量する。

3. SH 基の定量法^{6,8)}

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ 5 mmol/l 4-PDS 溶液
- (4-PDS(Code: P017)1.1 mg/ 緩衝液 **B** 1 ml)

(2) 操作

- 1) Fab'(3 ~ 14 μmol/l、 $A_{280\text{nm}}=0.1 \sim 1.0$) の緩衝液 **D** 溶液 0.5 ml に 4-PDS 溶液 20 μl を添加する。
 - 2) 30°C で 10 分間インキュベートする。
 - 3) 324 nm の吸光度を測定し、4-PDS より遊離した 4-チオピリドン、そのモル吸光係数 $\epsilon_{324\text{nm}}=19,800$ を用いて定量する。
- ※Fab' の SH 基は、EDTA 存在下では、還元型 IgG の SH 基よりも格段に安定で取り扱い易い⁸⁾。

II 仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ Fab' への標識¹⁾

1. 仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼへのマレイミドの導入

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ 仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ
- ・ 緩衝液 **E**、緩衝液 **F**
- ・ EMCS(Code: E018)
- ・ Sephadex G-25(GE ヘルスケア社製)

(2) 操作

- 1) アルカリホスファターゼ (2 mg) / 緩衝液 **E** 0.5 ml を同じ緩衝液 **E** を用いて透析する。
- 2) 透析液に EMCS(0.17 mg)/DMF 10 μl を添加して、30°C で 30 分間インキュベーションする。
- 3) Sephadex G-25 カラム (1 × 45 cm) で、緩衝液 **F** によりゲル濾過し、濃縮する。
- 4) マレイミド量 (II-3) とアルカリホスファターゼ活性 (II-4) を測定する。

2. マレイミド導入アルカリホスファターゼの Fab' への標識

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ マレイミド導入アルカリホスファターゼ Fab'
- ・ 緩衝液 **D**、緩衝液 **G**、緩衝液 **F**
- ・ 10 mmol/l 2-メルカプトエチルアミン (緩衝液 **D** 溶液)
- ・ ナトリウムアジド

(2) 操作

- 1) マレイミド導入アルカリホスファターゼ 1 mg (10 nmol) を緩衝液 **F** 0.25 ml に溶解し、Fab' 2.3 mg (50 nmol) / 緩衝液 **D** 溶液 0.25 ml を混合する。

2) 4°C で 20 時間インキュベートする。

3) 10 mmol/l 2-メルカプトエチルアミン溶液 10 μl を添加し、Ultrogel AcA44 カラムでゲルろ過する。溶離液には緩衝液 **G** を用い、0.35 ml/min で流す。

4) アルカリホスファターゼ活性 (II-4) を測定し、100 mg/ml BSA と 100 mg/ml のナトリウムアジドをそれぞれ 1% 添加し保存する。

3. マレイミドの定量法⁶⁾

EMCS や GMBS によりアルカリホスファターゼに導入されたマレイミドの導入数は、以下の方法で算出する。

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ マレイミド導入アルカリホスファターゼ
- ・ 緩衝液 **C**
- ・ 0.5 mmol/l 2-メルカプトエチルアミン溶液
- (I-2 で調製した 0.1 mol/l の 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩溶液 10 μl と 50 mmol/l EDTA (pH6.0) 2 ml を混合し調製する。50 mmol/l EDTA 溶液 100 ml 調製時には小社 2NA(Code: N001) 1.86 g を溶解し 1 mol/l NaOH で pH6.0 に調製する。)
- ・ 5 mmol/l 4-PDS 溶液
- (4-PDS(Code: P017)1.1 mg/ 緩衝液 **B** 1 ml)

(2) 操作

- 1) マレイミドを導入したアルカリホスファターゼ (約 10 μmol/l) / 緩衝液 **C** 0.45 ml に、0.5 mmol/l 2-メルカプトエチルアミン溶液 50 μl を添加する。
- 2) 30°C で 20 分間インキュベートする。
- 3) 5 mmol/l の 4-PDS 溶液 20 μl を加える。

- 4) 30°Cで10分インキュベートする。
- 5) 324 nmの吸光度より、 $\epsilon = 19,800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて計算する。

4. アルカリホスファターゼ活性の測定

比色法および蛍光法があるが、ここでは最も一般的な比色法として、PNPP(4-ニトロフェニルリン酸)による方法を紹介する⁸⁾。

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ 緩衝液 **H**
- ・ 5.5 mmol/l PNPP/ 緩衝液 **H**
- ・ 1 mol/l NaOH

(2) 操作

1) 酵素溶液を、緩衝液 **H** で希釈する。

2) 酵素希釈溶液 0.5 ml を 30 ~ 37°C で 5 分間インキュベーションする。

3) 5.5 mmol/l PNPP/ 緩衝液 **H** 0.5 ml を添加する。

4) 30 ~ 37°C で 10 ~ 100 分間インキュベーションする。

5) 1 mol/l NaOH 0.5 ml を加えて、反応を停止させ、405 nm の吸光度を測定する。

予め既知濃度のアルカリホスファターゼを用い同一法で活性を測定し、作製しておいた酵素濃度 - 吸光度の検量線から定量する。また、酵素量は、280 nm の吸光度より、 $\epsilon = 0.99 \text{ cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$ と $\text{MW} = 100,000$ より計算する。

タンパク濃度 (mg/ml) = $A_{280 \text{ nm}} / (0.99 \times \text{MW}) \times \text{MW} = A_{280 \text{ nm}} / 0.99$ またはモル濃度 (mol/l) = $A_{280 \text{ nm}} / (0.99 \times \text{MW})$ で求める。

III GMBS を用いた β - ガラクトシダーゼの IgM モノクローナル抗体への標識⁹⁾

(1) 試薬 (緩衝液については本稿末尾を参照)

- ・ 緩衝液 **I**、緩衝液 **L**、緩衝液 **J**、緩衝液 **M**、緩衝液 **K**、緩衝液 **N**
- ・ β -ガラクトシダーゼ
- ・ GMBS(Code: G005)
- ・ Sephadex G-25(GE ヘルスケア社製)
- ・ DEAE-TOYOPEARL(東ソー社製)

(2) 操作

1) IgM(1 mg、1.1 nmol)/ 緩衝液 **I** 1.0 ml に、GMBS(33 μg 、117 nmol)/dioxane 50 μl を添加する。

2) 20°C で 40 分間インキュベーションする。

3) Sephadex G-25 カラム (1.4 × 16 cm) を使い、4°C、緩衝液 **J** でゲルろ過する。280 nm の吸光度が 0.41(0.87 nmol のタンパク質に相当) を含むフラクション 2.5 ml を得る。

4) これに、 β -ガラクトシダーゼ (2.62 nmol)/ 緩衝液 **K** 1.0 ml を添加する。

5) 30°C で 30 分間インキュベートする。

6) 緩衝液 **L** 0.1 ml を添加する。

7) この溶液 500 μl を、緩衝液 **M** で平衡に達した DEAE-TOYOPEARL カラム (1.2 × 15 cm) にアプライする。緩衝液 **N** を使い、NaCl を 0.1 mol/l から 0.5 mol/l にグラディエントをかけながら溶出する。

8) 280 nm の吸光度を測定し、緩衝液 **L** 0.1 ml の入ったチューブにとって酵素活性を測定する。

緩衝液一覧

本稿で用いた緩衝液の組成の一覧を下記に示す。

緩衝液 **A** : 0.1 mol/l 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5、0.1 mol/l NaCl を含む)

緩衝液 **B** : 0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)

緩衝液 **C** : 0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0)

緩衝液 **D** : 0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0、5 mmol/l EDTA を含む)(EDTA-2Na 塩を緩衝液作製途中で終濃度が 5 mmol/l となるように加え、希釈してリン酸濃度が 0.1 mol/l にする。すなわち 100 ml 調製時は小社 2NA(Code: N001) を 186 mg 用いる)

緩衝液 **E** : 50 mmol/l ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH7.6、1 mmol/l MgCl_2 、0.1 mmol/l ZnCl_2 を含む)

緩衝液 **F** : 0.1 mol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0、1 mmol/l MgCl_2 、0.1 mmol/l ZnCl_2 を含む)

緩衝液 **G** : 10 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH6.8、0.1 mol/l NaCl、1 mmol/l MgCl_2 、0.1 mmol/l ZnCl_2 を含む)

緩衝液 **H** : 0.1 mol/l グリシン-NaOH 緩衝液 (pH10.3、1 mmol/l MgCl_2 、0.25 g/l 卵白アルブミンを含む)

緩衝液 **I** : 0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0、50 mmol/l NaCl を含む)

緩衝液 **J** : 10 mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.3、10 mmol/l MgCl_2 、50 mmol/l NaCl を含む)

緩衝液 **K** : 0.1 mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0、10 mmol/l MgCl_2 、5 mmol/l EDTA を含む)

緩衝液 **L** : 60 mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4、10 mmol/l EDTA、1 mmol/l MgCl_2 、0.1% BSA、0.1% ナトリウムアジドを含む)

緩衝液 **M** : 20 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5、0.1 mol/l NaCl を含む)

緩衝液 **N** : 20 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5)

参考文献

- 1) P. Cuatrecasas, I. Parikh, *Biochemistry*, **1972**, 11(12), 2291.
- 2) S. Yoshitake, Y. Yamada, E. Ishikawa, R. Masseyeff, *Eur. J. Biochem.*, **1979**, 101, 395.
- 3) M. J. O'Sullivan, E. Gnemmi, D. Morris, G. Chierigatti, A. D. Simmonds, M. Simmons, J. W. Bridges, V. Marks, *Anal. Biochem.*, **1979**, 100, 100.
- 4) S. Yoshitake, M. Imagawa, E. Ishikawa, *Anal. Lett.*, **1982**, 15(132), 147.
- 5) J. V. Staros, *Biochemistry*, **1982**, 21, 3950.
- 6) E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, T. Ueno, *J. Immunoassay*, **1983**, 4, 209.
- 7) S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, E. Ishikawa, *Scand. J. Immunol.*, **1979**, 10, 81.
- 8) 石川榮治、河合忠、宮井潔、酵素免疫測定法第三版 (1987 医学書院)。
- 9) K. Fujiwara, N. Matsumoto, S. Yagisawa, H. Tanimori, T. Kitagawa, M. Horita, K. Hiratani, K. Fukushima, A. Tomonaga, K. Hara, K. Yamamoto, *J. Immunol. Methods*, **1988**, 112, 77.

3. タンパク質標識試薬

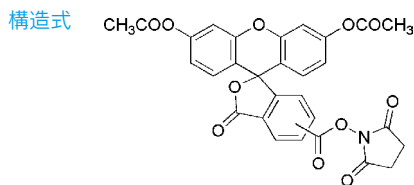
対象反応基、蛍光波長は4ページ(表. ラベル化剤の特性一覧表)を参照下さい。

CFSE

10 mg ; 341-06443 同仁品コード (C309)

5- or 6-(*N*-Succinimidylloxycarbonyl)-fluorescein 3',6'-diacetate
[CAS No. 150347-59-4]

- 規格**
- (1) 性状：白色～微黄色粉末
 - (2) 純度 (HPLC): 95.0% 以上
 - (3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
 - (4) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 10 mg/ml (ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 保存方法：冷凍



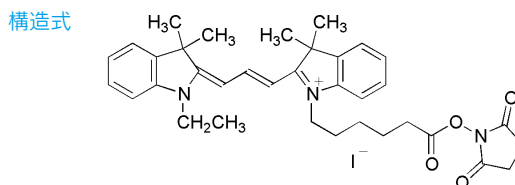
$C_{29}H_{19}NO_{11}=557.46$

IC3-OSu special packaging

20 µg × 3 ; 同仁品コード (I271)

N-Ethyl-*N'*-[5-(*N'*-succinimidylloxycarbonyl)pentyl]indocarbocyanine iodide

- 規格**
- (1) 性状：濃赤色固体
 - (2) 純度 (HPLC): 80.0% 以上
 - (3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
 - (4) モル吸光係数：80,000 以上 (545 nm 付近)
- 溶解例** 20 µg/40 µl (ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷凍, 2. 吸湿注意



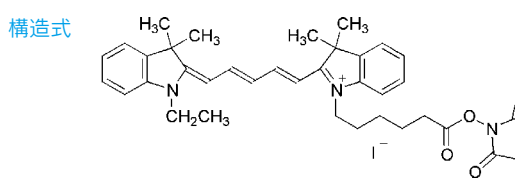
$C_{35}H_{42}IN_3O_4=695.63$

IC5-OSu special packaging

20 µg × 3 ; 同仁品コード (I272)

N-Ethyl-*N'*-[5-(*N'*-succinimidylloxycarbonyl)pentyl]-3,3,3',3'-tetramethyl-2,2'-indodicarbocyanine iodide

- 規格**
- (1) 性状：濃青色固体
 - (2) 純度 (HPLC): 80.0% 以上
 - (3) ジメチルスルホキシド溶状：試験適合
 - (4) モル吸光係数：110,000 以上 (640 nm 付近)
 - (5) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 20 µg/40 µl (ジメチルスルホキシド)
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷凍, 2. 吸湿注意



$C_{37}H_{44}IN_3O_4=721.67$

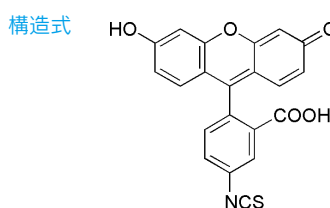
FITC-I

100 mg ; 349-03661 同仁品コード (F007)

500 mg ; 343-03664 同仁品コード (F007)

Fluorescein-4-isothiocyanate
[CAS No. 3326-32-7]

- 規格**
- (1) 性状：黄橙色粉末
 - (2) 純度 (HPLC): 95.0% 以上
 - (3) アセトン溶状：試験適合
 - (4) モル吸光係数：80,000 以上 (492 nm 付近)
 - (5) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 100 mg/10 ml (アセトン)
- 取扱注意** 保存方法：冷蔵



$C_{21}H_{11}NO_5S=389.38$

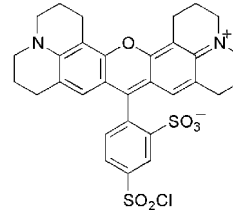
Sulforhodamine 101 acid chloride

10 mg ; 345-05221 同仁品コード (S016)

1*H*,5*H*,11*H*,15*H*-Xantheno[2,3,4-ij:5,6,7-ij']diquinolizin-18-ium,
9-(2-sulfo-4-chlorosulphophenyl)-2,3,6,7,12,13,16,17-octahydro-,inner salt
[CAS No. 82354-19-6]

規格 (1) 性状：紫色結晶性粉末
(2) 純度 (TLC): 85.0% 以上
溶解例 1 mg/ml(クロロホルム)
取扱注意 保存方法：冷凍，遮光

構造式



$C_{31}H_{29}ClN_2O_6S_2=625.16$

※本製品は、二種類のスルホニルクロライド化合物を含む混合物です。

試作品

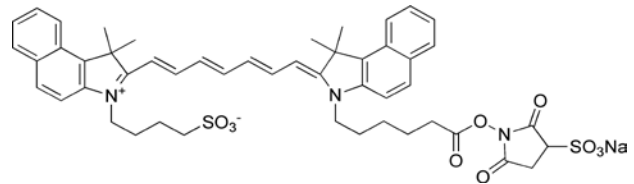
ICG-Sulfo-OSu

1 mg ; 同仁品コード (I254)

2-[7-[1,3-Dihydro-1,1-dimethyl-3-(4-sulfobutyl)-2*H*-benzo[*e*]indol-2-ylidene]-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-[5-(3-sulfosuccinimidyl)oxycarbonylpentyl]-1*H*-benzo[*e*]indolium, inner salt, sodium salt

取扱注意 1. 保存方法：冷凍，2. 吸湿注意

構造式



$C_{49}H_{52}N_3NaO_{10}S_2=930.07$

プロトコル

タンパク質を蛍光標識したい

I IC-Dye を使用したタンパク質標識例

1. 試薬

- ・ 50 mmol/l リン酸緩衝液 (pH8.0)
- ・ 1 mmol/l グアニジン液
- ・ (Lu)DMSO (Code. LU08)
- ・ 10 mmol/l リジン溶液

2. 方法

- 1) タンパク質をリン酸緩衝液に溶解する (2 mg/ml)。
- 2) 1) の溶液 25 μ l (タンパク質 50 μ g) をチューブに入れる。
- 3) 1 mmol/l グアニジン塩酸塩 25 μ l を 2) のチューブに入れる。
- 4) 98°C で 3 分間加熱する。
- 5) IC3 (もしくは IC5) OSu special packaging 20 μ g を DMSO 80 μ l に溶解する。→ (試薬溶液)
- 6) 4) のチューブに 5) の試薬溶液 1 μ l を添加し、混合する。
- 7) 氷上で 1 時間反応させる。
- 8) 10 mmol/l リジン溶液を 2 μ l 添加し、氷上で 15 分静置する。
- 9) 反応液をゲルろ過もしくは TCA 沈殿を行い、未反応の色素を除去する。

II BSA への IC3(IC5) の標識例

1. 試薬

- ・ 100 mmol 炭酸緩衝液 (pH8.5)
- ・ Dulbecco's PBS(-)
- ・ (Lu)DMSO (Code. LU08)

2. 操作手順

- 1) BSA を炭酸緩衝液に溶解する。(1.2 mg/ml)。→ (BSA 溶液)
- 2) IC3 (もしくは IC5) OSu special packaging 20 μ g を DMSO 6 μ l に溶解する。→ (試薬溶液)
- 3) BSA 溶液 125 μ l に試薬溶液 3 μ l を加える。(試薬量は BSA に対して約 7.2 倍量となる。)
- 4) 30°C で 1 時間インキュベートする。
- 5) 反応液をゲルろ過もしくは TCA 沈殿を行い精製し、未反応の色素を除去する。

III FITC-I を使用した抗体標識例

* 「免疫の生化学」, 蛋白質核酸酵素編集部編, 共立出版発行より引用

1) 抗体蛋白液の蛋白量を屈折計で計り (A mg/ml) ついで液量を測定 (B ml) し、総蛋白量を計算する ($A \times B = C$ mg)。

2) 総蛋白量の 1/100 ~ 1/150 量の FITC を秤量し (蛋白液量により加減する)、2% の蛋白液 (C/20=D ml) の 1/10 量 (D/10=E ml) に相当する 0.5 mol/l 炭酸緩衝液 (pH9.5) で溶解する。

* 緩衝溶液中で FITC は徐々に分解していきます。速やかにご使用ください。また、DMSO やアセトンなどに FITC-I を溶解後、反応時に緩衝液に添加する方法もあります。

3) ついで蛋白溶液 B ml にあらかじめ生理食塩水 F ml ($D - (B+E) = F$ ml) を加え、これに FITC 溶液を加える。(ここで蛋白液は、はじめて 2% になる)

4) この場合、両液とも 1 ~ 2°C に保っておく。pH9.5 であることを確かめてから、7 ~ 9°C の温度で泡立てないように 4 時間攪拌する。

* 室温で 1 ~ 2 時間程度の反応でも結構です。抗体の性質にあわせてください。

5) 反応液を Sephadex カラムろ過し、未反応の色素を除去する。(PBS pH7 使用)

6) 必要があれば、更に、DEAE カラムで分離精製する。

4. HPLC 用誘導体化試薬

対象反応基、蛍光波長は 4 ページ (表、ラベル化剤の特性一覧表) を参照下さい。

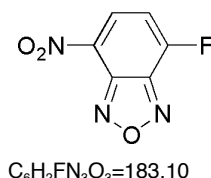
NBD-F

50 mg ; 342-04751 同仁品コード (N020)
100 mg ; 348-04753 同仁品コード (N020)

4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan
[CAS No. 29270-56-2]

- 規格**
- (1) 性状：淡黄色粉末
 - (2) 純度 (HPLC): 99.0% 以上
 - (3) エチルアルコール溶状：試験適合
 - (4) 融点：52 ~ 57°C
 - (5) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 10 mg/ml(エチルアルコール)、
10 mg/ml(アセトニトリル)
- 取扱注意** 保存方法：冷凍、遮光

構造式



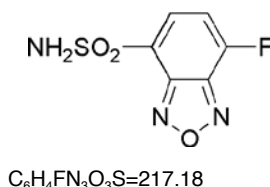
ABD-F

50 mg ; 341-05441 同仁品コード (A016)
100 mg ; 347-05443 同仁品コード (A016)

4-Fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan
[CAS No. 91366-65-3]

- 規格**
- (1) 性状：白色～微黄色結晶性粉末
 - (2) 純度 (HPLC): 99.0% 以上
 - (3) アセトニトリル溶状：試験適合
 - (4) 融点：140 ~ 149°C
 - (5) モル吸光係数：4,500 以上 (315 nm 付近)
 - (6) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 10 mg/ml(アセトニトリル)
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷凍、遮光、2. 吸湿注意

構造式



NAM

10 mg ; 343-04764 同仁品コード (N018)

N-(9-Acridinyl)maleimide
[CAS No. 49759-20-8]

- 規格**
- (1) 性状：黄色結晶性粉末
 - (2) 純度 (HPLC): 96.0% 以上
 - (3) ジオキサン溶状：試験適合
 - (4) 融点：240 ~ 275°C (分解)
 - (5) モル吸光係数：12,600 以上 (362 nm 付近)
 - (6) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 12.5 mg/50 ml(ジオキサン)
- 取扱注意** 保存方法：冷蔵

構造式



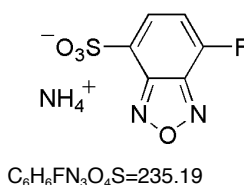
SBD-F

50 mg ; 342-05111 同仁品コード (S013)
100 mg ; 348-05113 同仁品コード (S013)

4-Fluoro-7-sulfobenzofurazan, ammonium salt
[CAS No. 84806-27-9]

- 規格**
- (1) 性状：白色～淡黄色結晶性粉末
 - (2) 純度 (HPLC): 98.0% 以上
 - (3) 水溶状：試験適合
 - (4) モル吸光係数：4,000 以上 (317 nm 付近)
 - (5) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 25.5 mg/100 ml(水)、
10 mg/2 ml(ホウ酸 buffer, pH9.5)
- 取扱注意** 保存方法：冷凍、遮光

構造式



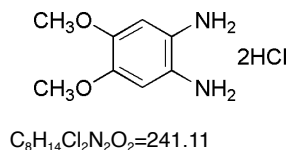
DDB

1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzene, dihydrochloride
[CAS No. 131076-14-7]

50 mg ; 344-05551 同仁品コード (D034)

- 規格**
- (1) 性状：白色～微桃灰白色結晶性粉末
 - (2) 純度 (滴定) : 98.0% 以上
 - (3) 水溶状：試験適合
 - (4) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 100 mg/10 ml(水)
- 取扱注意** 保存方法：冷凍，遮光

構造式



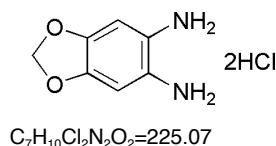
MDB

1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene, dihydrochloride
[CAS No. 38608-07-0]

50 mg ; 347-05541 同仁品コード (M021)
100 mg ; 343-05543 同仁品コード (M021)

- 規格**
- (1) 性状：白色～微桃白色結晶性粉末
 - (2) 純度 (滴定) : 98.0% 以上
 - (3) 水溶状：試験適合 0.020 以下 (400 nm)
 - (4) メチルアルコール溶状：試験適合 0.040 以下 (400 nm)
 - (5) 融点：243 ~ 261°C (分解)
 - (6) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 100 mg/10 ml(水)、
100 mg/10 ml(メチルアルコール)
- 取扱注意** 保存方法：冷凍，遮光

構造式



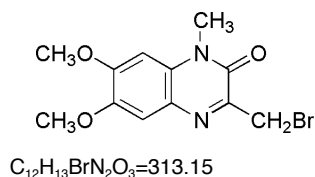
Br-DMEQ

3-Bromomethyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-1,2-dihydroquinoxaline-2-one
[CAS No. 100595-07-1]

10 mg ; 346-05511 同仁品コード (B036)

- 規格**
- (1) 性状：黄色針状結晶
 - (2) 純度 (HPLC): 96.0% 以上 (ラベル化後)
 - (3) アセトニトリル溶状：試験適合
 - (4) 融点：174 ~ 183°C (分解)
 - (5) ラベル化試験：試験適合
 - (6) IR スペクトル：試験適合
 - (7) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 6.0 mg/5 ml(アセトニトリル)
- 取扱注意** 保存方法：冷凍

構造式



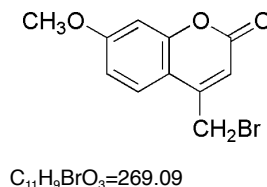
Br-Mmc

4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin
[CAS No. 35231-44-8]

100 mg ; 349-04021 同仁品コード (B023)

- 規格**
- (1) 性状：淡黄色～淡黄灰白色結晶性粉末
 - (2) アセトン溶状：試験適合
 - (3) 融点：206 ~ 216°C
 - (4) モル吸光係数：11,000 以上 (332 nm 付近)
 - (5) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 100 mg/10 ml(熱アセトン)、
16 mg/100 ml(エチルアルコール)

構造式



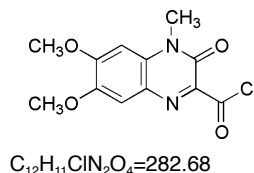
DMEQ-COCI

3-Chlorocarbonyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone
[CAS No. 104077-15-8]

10 mg ; 347-06141 同仁品コード (D049)

- 規格**
- (1) 性状：橙色～赤橙色粉末
 - (2) 純度 (HPLC): 95.0% 以上 (ラベル化後)
 - (3) トルエン溶状：試験適合
 - (4) IR スペクトル：試験適合
 - (5) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例** 8.5 mg/10 ml(トルエン)
- 取扱注意** 1. 保存方法：冷凍，遮光，2. 吸湿注意

構造式



5. 関連試薬

DTPA anhydride

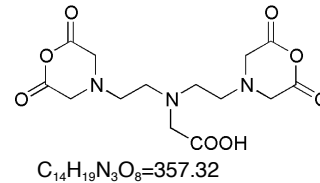
1 g ; 344-05171 同仁品コード (D033)
5 g ; 340-05173 同仁品コード (D033)Diethylenetriamine-*N,N,N',N',N''*-pentaacetic acid, dianhydride
[CAS No. 23911-26-4]

- 規格 (1) 性状：微黄色～微黄褐色粉末
(2) 純度 (滴定)：99.0% 以上 (DTPA として)
(3) アルカリ溶状：試験適合
(4) 融点：175 ~ 188°C (分解)
(5) IR スペクトル：試験適合
(6) NMR スペクトル：試験適合

溶解例 1 g/[3 ml(水) + 2 ml(3 mol/l-NaOH)],
1 mg/ml (ジメチルスルホキシド)

取扱注意 吸湿注意

構造式



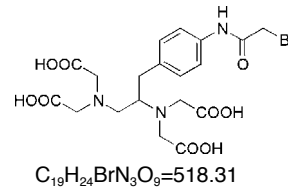
BABE

Request; 同仁品コード (B437)

1-(*p*-Bromoacetamidobenzyl)ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid
[CAS No. 84256-91-7]

取扱注意 1. 保存方法：冷凍, 2. 吸湿注意

構造式



FeBABE

1 mg; 同仁品コード (F279)

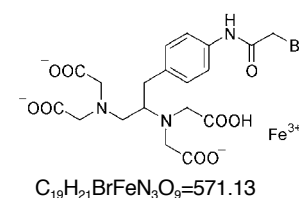
1-(*p*-Bromoacetamidobenzyl)ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, iron(III)

- 規格 (1) 性状：黄褐色粉末
(2) 純度 (HPLC)：95.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合

溶解例 緩衝溶液、DMSO に可溶

取扱注意 1. 安衛法, 2. 保存方法：冷凍, 3. 吸湿注意

構造式



AB-NTA free acid

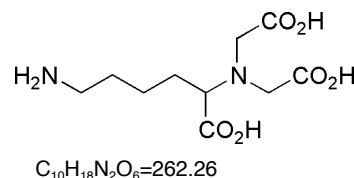
100 mg ; 340-08071 同仁品コード (A459)

N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid
[CAS No. 129179-17-5]

- 規格 (1) 性状：白色～淡黄白色粉末
(2) 純度 (HPLC)：97.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
(4) IR スペクトル：試験適合
(5) NMR スペクトル：試験適合

溶解例 10 mg/ml(水)

構造式



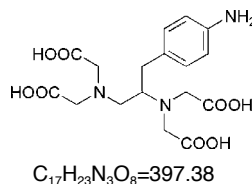
Aminobenzyl-EDTA

25 mg ; 346-05991 同仁品コード (M029)

1-(4-Aminobenzyl)ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid
[CAS No. 84256-90-6]

- 規格 (1) 性状：微黄白色～淡橙白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例 2 mg/ml (アセトニトリル : 10 mmol/l リン酸 =1 : 1)
- 取扱注意 保存方法：冷凍

構造式



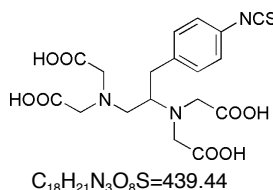
Isothiocyanobenzyl-EDTA

10 mg ; 343-06001 同仁品コード (M030)

1-(4-Isothiocyanatobenzyl)ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid
[CAS No. 105394-74-9]

- 規格 (1) 性状：微黄褐色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) IR スペクトル：試験適合
- 溶解例 2 mg/ml (アセトニトリル : 10 mmol/l リン酸 =1 : 1)
- 取扱注意 1. 保存方法：冷凍, 2. 吸湿注意

構造式



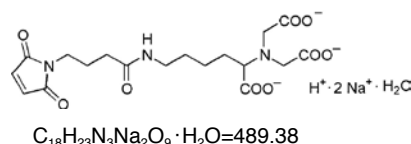
Maleimido- C_3 -NTA

10 mg ; 同仁品コード (M035)

N-[5-(3'-Maleimidopropylamido)-1-carboxypentyl]iminodiacetic acid, disodium salt, monohydrate

- 規格 (1) 性状：白色～淡黄白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 97.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
(4) IR スペクトル：試験適合
(5) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例 10 mg/ml (水)
- 取扱注意 1. 保存方法：冷蔵, 2. 吸湿注意

構造式



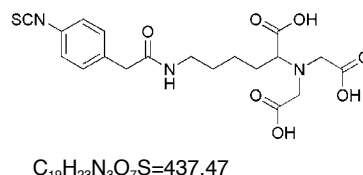
Isothiocyanobenzyl-NTA

10 mg ; 同仁品コード (I279)

N-[5-(4-Isothiocyanatobenzyl)amido-1-carboxypentyl]iminodiacetic acid

- 規格 (1) 性状：白色～微黄色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 90.0% 以上
(3) IR スペクトル：試験適合
(4) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例 DMSO に可溶
- 取扱注意 1. 保存方法：冷凍, 2. 窒素置換

構造式



Dithiobis(C_2 -NTA)

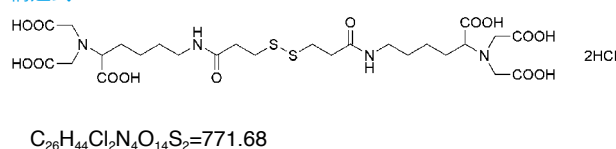
10 mg ; 同仁品コード (D550)

50 mg ; 同仁品コード (D550)

3,3'-Dithiobis[*N*-(5-amino-5-carboxypentyl)propionamide-*N',N'*-diacetic acid]-dihydrochloride

- 規格 (1) 性状：白色～微黄色粉末又は結晶
(2) 純度 (滴定, 無水物換算) : 95.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合
(4) 水分 : 10.0% 以下
(5) NMR スペクトル：試験適合
- 溶解例 10 mg/ml (水)
- 取扱注意 吸湿注意, 窒素置換

構造式



URL: <http://www.dojindo.co.jp>
E-mail: info@dojindo.co.jp

Free dial:0120-489548
Free fax :0120-021557

*ご注意

○掲載内容 (製品・包装など) はパンフレット編集時におけるものであり、予告無く変更することがあります。
○試験・研究用です。医薬品としては使用できません。

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 熊本テクノ・リサーチパーク 〒 861-2202
Tel.096-286-1515 (代表) Fax.096-286-1525

ドージン・イースト (東京)

東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012
Tel.03-3578-9651 (代表) Fax.03-3578-9650

24.08.40