

はじめに

R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH₂ は、アミノ基を有する高分子 (抗体など) に R-フィコエリスリンを標識するためのキットです。NH₂-Reactive R-Phycoerythrin は、その構造内に活性エステル基を有しているため、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。標識反応を阻害するような低分子化合物 (トリスやグリシンなど) は付属の 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 R-フィコエリスリン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

- NH₂-Reactive R-Phycoerythrin 3 tubes
- Reaction Buffer 200 µl x 1
- WS 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

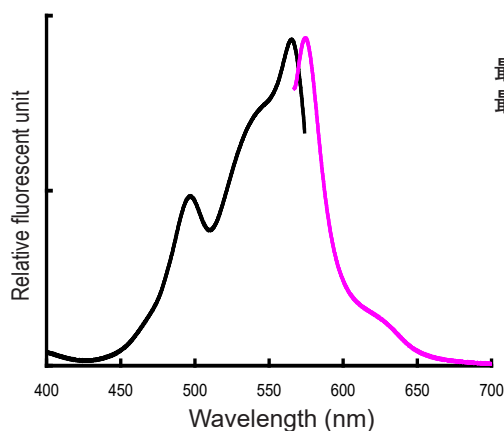
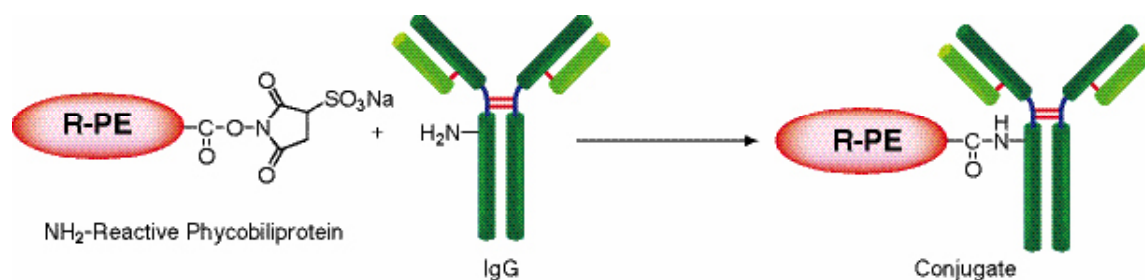
NH₂-Reactive R-Phycoerythrin は、アルミラミジップに 3 本入っています。アルミラミジップを一旦開封した後は、未使用の NH₂-Reactive R-Phycoerythrin は、アルミラミジップに入れたまま、チャックをしっかりと閉め、-20°C で保存してください。NH₂-Reactive R-Phycoerythrin 以外は、0 ~ 5°C で保存してください。

必要なもの (キット以外)

- 10 µl, 200 µl 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)

使用上のご注意

- 分子量が 50,000 以上で、反応性のアミノ基を有するサンプルへ標識することができます。
- 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。
- 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。

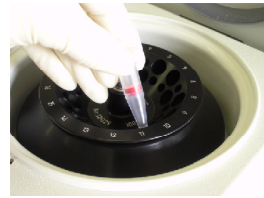


最大励起波長 : 564 nm
最大蛍光波長 : 575 nm

R-Phycoerythrin 標識タンパク質の励起・蛍光スペクトル



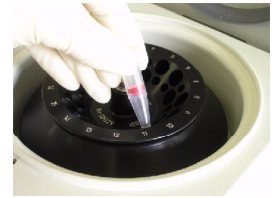
操作 1.
IgG 50 ~ 200 µg を含む試料溶液 a) と WS Buffer 100 µl を Filtration Tube に加える。



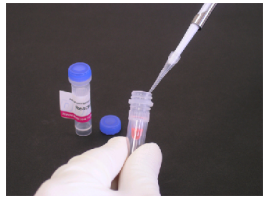
操作 2.
ピペティングにより軽く混合した後、8,000 × g で 10 分間遠心する b) 。



操作 3.
WS Buffer 100 µl を Filtration Tube に加える。



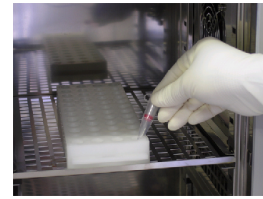
操作 4.
8,000 × g で 10 分間遠心する b) 。



操作 5.
Reaction Buffer 10 µl を NH₂-NH₂-Reactive R-Phycoerythrin に加え、ピペティングにより溶解する c) 。



操作 6.
NH₂-NH₂-Reactive R-Phycoerythrin を含む溶液を IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上加える。



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.
WS Buffer 190 µl を加えて、10 回程度ピペティングし、標識体を回収する d) 。マイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する e) 。

- a) 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。
- b) 溶液がメンブレン上に残っている場合は、さらに 8,000×g で 5 分間遠心してください。
- c) NH₂-Reactive R-Phycoerythrin は水分により加水分解しやすいので、Reaction Buffer に溶解後は直ちに操作 6 へ進んでください。
- d) 1 ~ 2 分子の R-フィコエリスリンが IgG1 分子に標識されます。また、回収した標識体には未反応の R-フィコエリスリンが残るので、免疫アッセイにおいてバックグラウンドへの影響が考えられます。バックグラウンドを低減する必要がある場合は、ゲルろ過カラムやアフィニティーカラムなどにより精製を行ってください。
- e) 標識体を回収する際は、WS 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ご相談ください。

◆使用できるタンパク質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は 50 ~ 200 µg の場合と比較して、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。

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

NH₂-Reactive R-Phycoerythrin のアミノ基は全て保護されていますので、オリゴマーは形成されません。

◆R-フィコエリスリン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。長期保存する場合には標識体溶液に等量のグリセロールを加え、-20°C で保存してください。

◆保存していた標識体が沈殿を生じましたが、使用できますか？

沈殿が生じた場合は、標識体を遠心分離 (10,000 × g, 10 分間) し、上清をご使用ください。

◆蛍光標識したタンパク質を生細胞へ添加したいのですが、注意点はありますか？

細胞状態をより安定に保つため、生細胞懸濁液を調製する際は、2-10% FBS を含む PBS を用いることをお勧めします。

◆標識体を回収する WS Buffer は、生細胞へ影響しませんか？

WS Buffer 中には、細胞毒性を殆ど示さない量の安定化剤 (界面活性剤) を含んでいます。もし細胞への影響が気になる場合は、別途任意のバッファーを用いて標識体を回収してください。

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

<開発元>

Dojindo Molecular Technologies, Inc.
30W Gude Dr, Suite 260, Rockville, Maryland, 20850 U.S.A.
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