

はじめに

Allophycocyanin Labeling Kit - SHは、SH基を有する高分子（抗体など）にアロフィコシアニン（APC）を標識するためのキットです。SH-Reactive Allophycocyaninは、その構造内にマレイミド基を有しているため、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。標的分子がSH基を有しておらず、分子内にS-S結合を有している場合には、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。本キットには、標識に必要なすべての試薬と作製したアロフィコシアニ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

- | | | | |
|-------------------------------------|----------|-------------------------|------------|
| - SH-Reactive Allophycocyanin | 3 tubes | - Reducing Agent..... | 3 tubes |
| - RA Solution | 1 ml x 1 | - 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

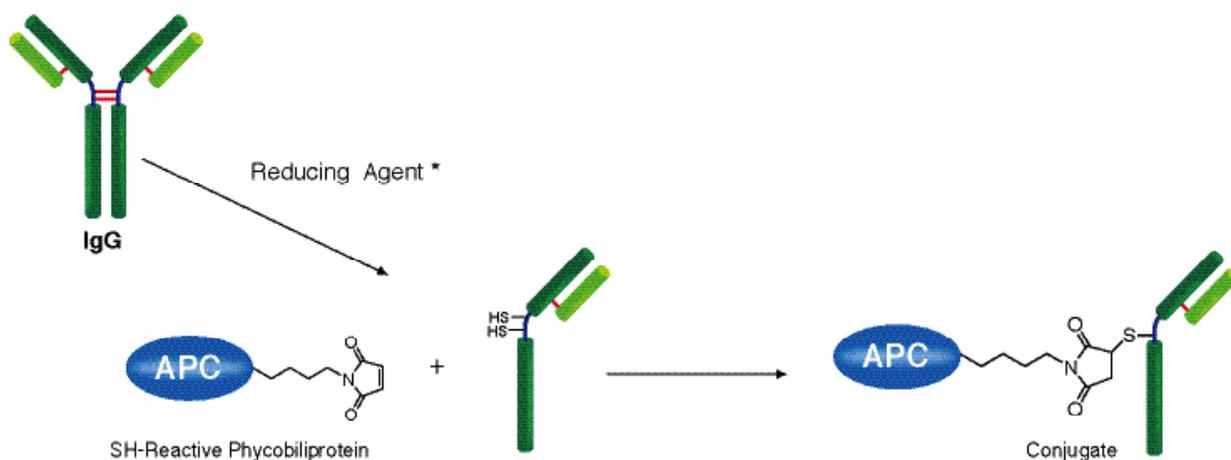
SH-Reactive Allophycocyaninは、アルミラミジップに3本入っています。アルミラミジップを一旦開封した後は、未使用のSH-Reactive Allophycocyaninは、アルミラミジップに入れたまま、チャックをしっかりと閉め、-20°Cで保存してください。SH-Reactive Allophycocyanin以外は、0 ~ 5°Cで保存してください。

必要なもの (キット以外)

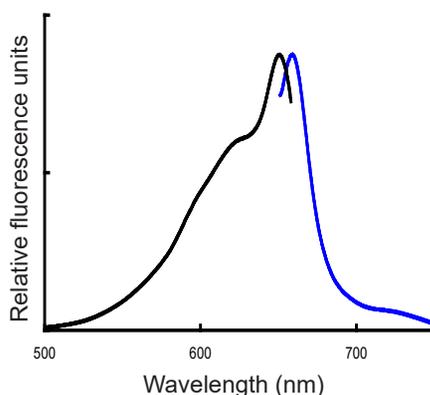
- | | |
|--------------------|---------------------|
| - 200 µl マイクロピペッター | - インキュベーター (37°C) |
| - 遠心機 (マイクロチューブ用) | - マイクロチューブ (標識体保存用) |

使用上の注意

- 分子量が50,000以上で、S-S結合またはSH基を有するサンプルへ標識することができます。SH基を有する場合、還元操作（操作3～6）を省略できます。
- 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。
- 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に水適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。



* ヒンジ部以外のSS結合が還元する場合があります。



最大励起波長 : 650 nm
最大蛍光波長 : 660 nm

Allophycocyanin 標識タンパク質の励起・蛍光スペクトル



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



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)}。



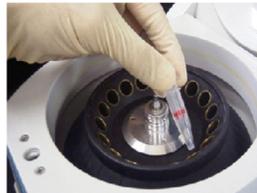
操作 3.
WS Buffer 150 µl を Reducing Agent に加え、ピペティングして溶解する。



操作 4.
操作 3 の溶液 100 µl 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 5.
ピペティングによりメンブレン上の IgG と混合した後、37°C で 30 分間反応する。



操作 6.
RA Solution 100 µl を加え、8,000 × g で 10 分間遠心する^{b)}。ろ液を捨てた後、RA Solution 200 µl を加え、さらに遠心する^{b)}。



操作 7.
Reaction Buffer 50 µl を SH-Reactive Allophycocyanin に加え、ピペティングにより溶解する^{c)}。



操作 8.
操作 7 の溶液を還元 IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上に加える。



操作 9.
ピペティングによりメンブレン上の還元 IgG と混合した後、37°C で 1 時間反応する。



操作 10.
WS Buffer 150 µl を加え、10 回程度ピペティングし、標識体を回収する^{d)}。溶液を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) SH-Reactive Allophycocyanin は Reaction Buffer 中で不安定になります。溶解後は直ちに操作 8 へ進んでください。
 d) 1 ~ 2 分子のアロフィコシアニンが還元 IgG 1 分子に標識されます。また、回収した標識体には未反応のアロフィコシアニンが残るので、イムノ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ク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 を使うことを推奨しますが、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ク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。

◆ 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？

影響しません。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