

### 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。

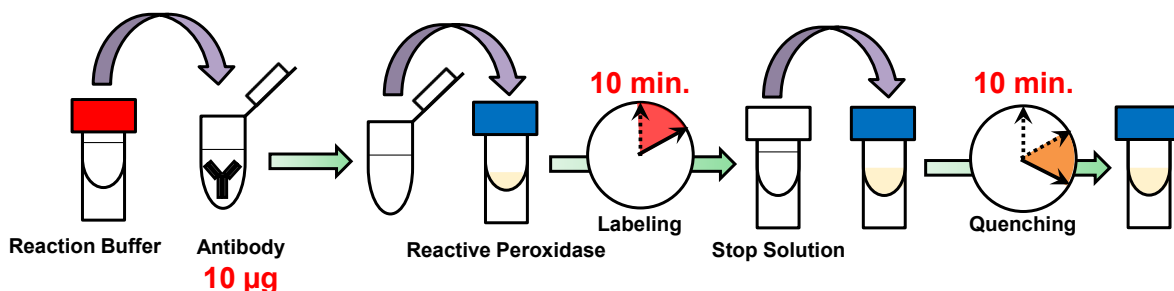


図 1 標識手順

### キット内容

- Reactive Peroxidase x 1
- 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したり、実験における非特異的吸着の原因となる可能性があります。標識反応の妨害または非特異吸着が著しい場合には、標識操作の前に添加剤を除去することを推奨します。** 表 1 には標識に影響を及ぼさない添加剤の例を、表 2 には小社で検討した標識に影響を及ぼす可能性のある添加剤の例を示しました。

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

### 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、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。

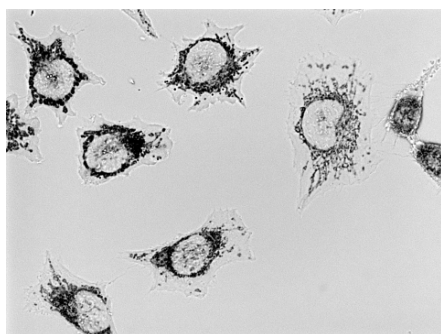


図 2 HeLa 細胞のミトコンドリアの免疫染色画像

<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