

はじめに

Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kitは、10 µgの抗体にR-Phycoerythrinを30分以内に標識するためのキットです。Reactive R-Phycoerythrinは、活性エステル基を導入したR-Phycoerythrin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。

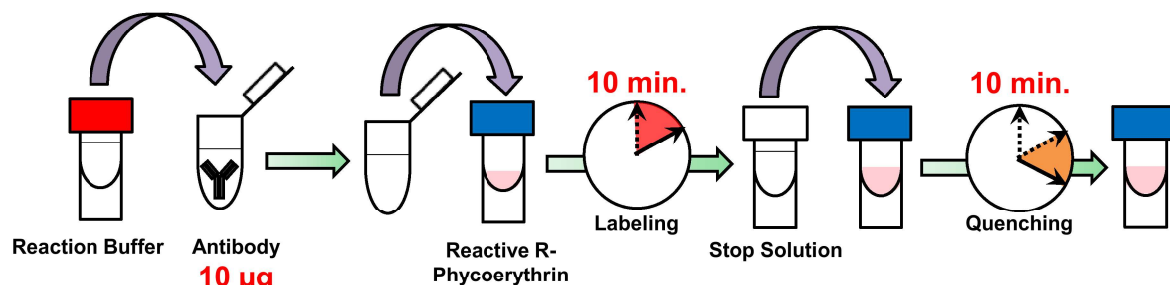


図 1 標識手順

注意

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 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。Reactive R-Phycoerythrin 以外は、0 ~ 5°Cで保存してください。

キット内容

- Reactive R-Phycoerythrin x 3
- 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することがあります。表1に標識に影響を及ぼさない添加剤の最大濃度を示しました。

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。

プロトコール

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 R-Phycoerythrin に加え、ピペッティングにより混合する。
4. 37℃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℃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℃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

実験例

HL60 細胞の蛍光染色

1. HL60 細胞の細胞懸濁液を 5.0×10^5 cells/tube となるようにマイクロチューブに分注した。
2. $1,000 \times g$ で 2 分間、遠心分離を行い、上清を取り除いた。
3. Suspension buffer [1% FBS (ウシ胎児血清), Hanks' HEPES balanced buffer] を 50 µl 添加した。
4. 本キットで標識した R-Phycoerythrin 標識抗体を 1 µg (抗体量として) 添加し、ボルテックスにより再懸濁した。
※抗 CD13 抗体 (商品コード: 555393) は Becton Dickinson, マウス抗体 (Isotype, 商品コード: 015-000-003) は Jackson Immuno Research Laboratories より購入した。
5. 氷上で 30 分間静置した。
6. $1,000 \times g$ で 2 分間、遠心分離を行い、上清を取り除いた。
7. Suspension Buffer を 1 ml 添加した。
8. ボルテックスにより再懸濁し、フローサイトメーターにより蛍光強度を測定した。

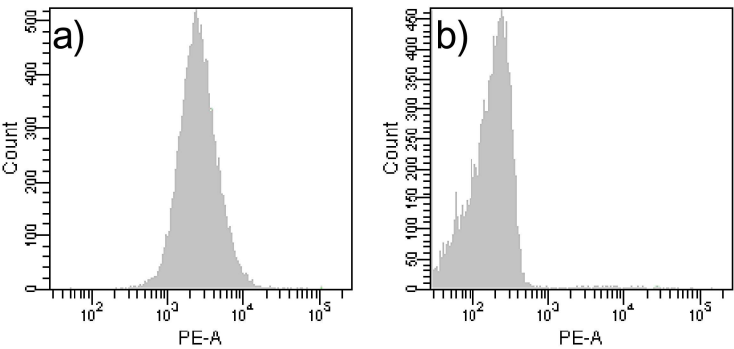


図 2 R-Phycoerythrin 標識抗体を用いた HL60 細胞の蛍光染色
a) 抗 CD13 抗体、b) Isotype

<開発元>
Dojindo Molecular Technologies, Inc.
30 W Gude Dr, Suite 260, Rockville, MD 20850
Tel: +1-301-987-2607, 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: 090-280-1515 Fax: 090-280-1525 URL: www.dojindo.co.jp
ドージン・イースト (東京) Tel: 03-3578-9651 Fax: 03-3578-9650