

はじめに

HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH₂ は、アミノ基を有するタンパク質、特に抗体へ HiLyte Fluor™ 647 色素を標識するためのキットです。HiLyte Fluor™ 647 色素は米国 AnaSpec 社が開発した蛍光色素です。キット付属の NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 647 は、その分子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。タンパク質に HiLyte Fluor™ 647 を標識する場合、標識反応を阻害するような低分子化合物（トリスなど）や未反応の NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 647 は付属の Filtration Tube を用いて容易に除去することができます。HiLyte Fluor™ 647 標識 IgG の場合、蛍光波長は $\lambda_{\text{ex/em}} = 655/670 \text{ nm}$ です。本キットには、標識に必要な試薬と作製した HiLyte Fluor™ 647 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 HiLyte Fluor™ 647..... 3 tubes
 - Reaction Buffer..... 500 $\mu\text{l} \times 1$
 - WS Buffer..... 4 ml $\times 1$
 - 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 HiLyte Fluor™ 647 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 HiLyte Fluor™ 647 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 HiLyte Fluor™ 647 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)
 - DMSO

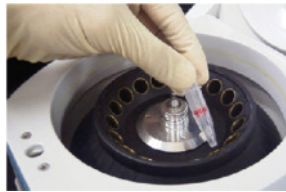
使用上の注意

- 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。

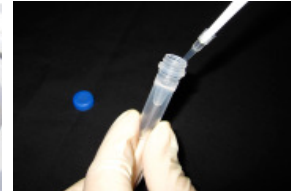
プロトコール



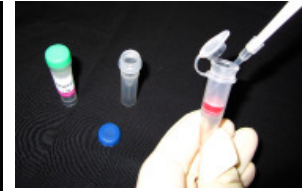
操作 1.
タンパク質 50~200 μg を含むサンプル溶液と WS Buffer 100 μl を Filtration Tube に入れ、ピペッティングにより軽く混合する^{a)}。



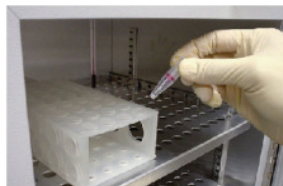
操作 2.
8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。



操作 3.
NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 647 に 10 μl の DMSO を加え、ピペッティングにより溶解する^{c)}。



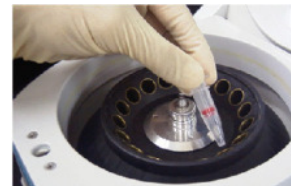
操作 4.
Filtration Tube のメンブレン上に Reaction Buffer 100 μl を加えた後、NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 647 を含む DMSO 溶液 8 μl ^{d)} を加える。



操作 5.
ピペッティングによりメンブレン上のタンパク質と混合した後、37°C で 10 分間反応させる。



操作 6.
WS Buffer 100 μl を Filtration Tube に入れ、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。遠心後、ろ液を捨てる。



操作 7.
WS Buffer 200 μl を Filtration Tube に入れ、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。この操作をもう一度繰り返す。



操作 8.
WS Buffer 200 μl を Filtration Tube に入れ、10 回程度ピペッティングし、標識体を回収する^{e)}。マイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する。

- a) 100 μl 以下の液量を使用してください。タンパク質濃度が 0.5 mg/ml 未満である場合は、操作 1 と 2 を繰り返して、タンパク質量が 50 ~ 200 μg となるようにしてください。
- b) 溶液がメンブレン上に残っている場合は、さらに 5 分間遠心してください。
- c) NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 647 はチューブの底に入っています。DMSO を加える際はチューブの底に入れ、軽くピペッティングして溶解させてください。また、NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 647 は DMSO 中の水分により加水分解しやすいので、DMSO に溶解後は直ちに操作 4 へ進んでください。
- d) タンパク質 200 μg に標識する場合、NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 647 溶液は 10 μl 全量を加えてください。
- 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。また Filtration Tube のメンブレンが未反応の色素によって着色されることがありますが、WS Buffer で十分にピペッティングすれば、標識体は 90% 以上回収されています。

タンパク質 1 分子あたりに標識された HiLyte Fluor™ 647 の数 (標識率) を算出したい場合は HiLyte Fluor™ 647 標識タンパク質溶液を中性の緩衝液で希釈して 280 nm, 655 nm の吸光度を測定してください。標識率は次式で計算できます。IgG の場合は ϵ として 216,000 を使用してください。HiLyte Fluor™ 647 の WS Buffer 中でのモル吸光係数は 250,000 です。

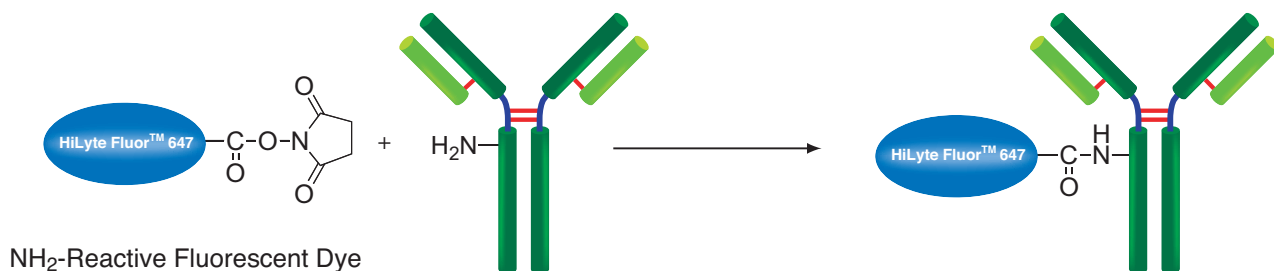
$$\text{標識率 (HiLyte Fluor™ 647/ タンパク質比)} = \frac{A_{655} / 250,000}{(A_{280} - A_{655} \times 0.05) / (\epsilon \text{ of protein})}$$

A_{655} : 655 nm の吸光度

A_{280} : 280 nm の吸光度

ϵ : タンパク質の 280 nm でのモル吸光係数

標識反応



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カラムなどにより精製してご使用ください。精製方法につきまして御不明な点がございましたらお問い合わせください。
- ◆ タンパク質 1 分子あたりに HiLyte Fluor™ 647 はいくつ導入できますか？
導入数はタンパク質中の反応性のアミノ基の数に依存します。rabbit IgG の場合、1 分子あたり 3 個から 7 個導入されます。
- ◆ HiLyte Fluor™ 647 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が、本キットを用いて rabbit IgG に標識した場合、4 °C で 2 ヶ月は安定であることを確認しています。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。
- ◆ 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、その後のアッセイで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。
- ◆ このキットを使ってタンパク質以外のオリゴヌクレオチドやペプチドに HiLyte Fluor™ 647 をラベル化することはできますか？
オリゴヌクレオチドやペプチドは、Filtration Tube のメンブレンフィルター孔より分子量が小さく、メンブレンフィルター上に保持することができないため、ラベル化することはできません。
- ◆ 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。

<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