

はじめに

Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kitは、10 µgの抗体にHiLyte Fluor™ 647を30分以内に標識するためのキットです。HiLyte Fluor™ 色素は、米国 AnaSpec 社が開発した蛍光色素です。キット付属の Reactive HiLyte Fluor 647は、活性エステル基を導入しているため、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。

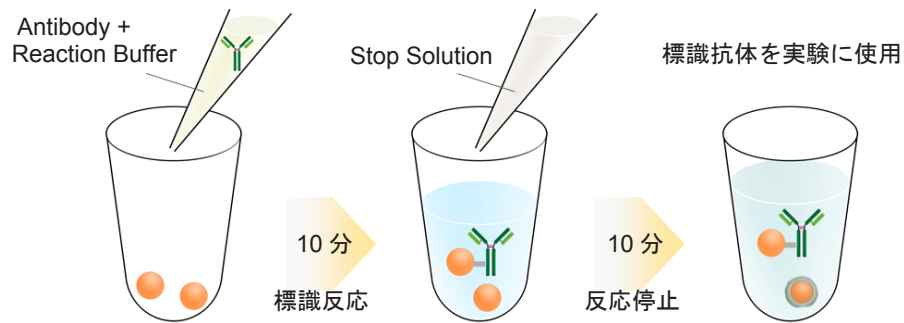


図 1 標識手順

注意

Reactive 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 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。Reactive HiLyte Fluor 647 以外は 0 ~ 5°Cで保存してください。

キット内容

- Reactive HiLyte Fluor 647 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、未開封の状態ですら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)

使用上のご注意

- **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例

| Additives | |
|-------------------------------|---|
| Buffering agents (PBS, HEPES) | ○ |
| Sodium chloride | ○ |
| Chelating agents (EDTA) | ○ |
| Sodium azide | ○ |
| Primary amines and thiols | × |

表 2. 標識に影響を及ぼす可能性のある添加剤の例 (数値は影響を及ぼさない最大濃度)

| | Glucose | Glycerol | BSA | Gelatin | Tris |
|----------------------------|---------|----------|---------|---------|------------|
| Anti-Mitochondria antibody | < 10% | < 10% | < 2% | < 0.1% | < 50mmol/L |
| Anti-Actin antibody | < 5% | < 25% | × | < 0.1% | < 25mmol/L |
| Anti-HNF4α antibody | < 2% | < 10% | < 0.05% | < 0.1% | < 50mmol/L |

※抗体の種類、生物種、メーカーにより添加剤の影響は異なります。

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 3)
3. 操作 2 の溶液を Reactive HiLyte Fluor 647 に加え、ピペ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 3)
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。

表 3. 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

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 15 分間静置した。
4. 上清を取り除き、PBS で 3 回洗浄後、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. 室温で 1 時間静置した。
8. HiLyte Fluor 647 標識 - 抗ミトコンドリア抗体をブロッキング溶液で 200 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、操作 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、PBS-T で 3 回洗浄した後、PBS-T を添加した。
12. 染色細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

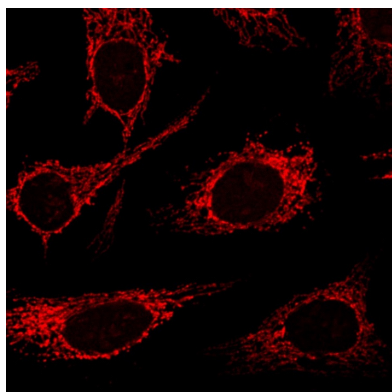


図 2 HiLyte Fluor 647 標識抗ミトコンドリア抗体を用いた HeLa 細胞ミトコンドリアの免疫染色

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