



販売中止のお知らせ

お客様各位

いつも小社製品をご愛顧頂きありがとうございます。
2020年2月1日より下記製品は販売中止となりますため、
本冊子に記載の製品に関してご注意頂きますようお願い申し上げます。

販売中止品目

製品コード	製品名	容量
B036	Br-DMEQ	10 mg
B301	Biotin-(AC5)2-hydrazide	10 mg
B302	Biotin-AC5-hydrazide	10 mg
B303	Biotin-hydrazide	10 mg
D034	DDB	50 mg
D049	DMEQ-COCl	10 mg
LK16	HiLyte Fluor 750 Labeling Kit-NH2	3 samples
LK31	ICG Labeling Kit - NH2	1 sample
LK32	Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit	1 sample
LK33	Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit	1 sample
LK34	Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kit	1 sample
LK35	Ab-10 Rapid HiLyte Fluor TM 555 Labeling Kit	1 sample
LK36	Ab-10 Rapid HiLyte Fluor TM 647 Labeling Kit	1 sample
LK37	Ab-10 Rapid Biotin Labeling Kit	1 sample
M029	Aminobenzyl-EDTA	25 mg
N018	NAM	10 mg

ご不明点等がございましたら、小社カスタマーサポートまでお問い合わせ下さい。
フリーダイヤル 0120-489548



タンパク質標識用キット
Labeling Kits

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.
<http://www.dojindo.co.jp>

目次

1. キットの選択	1	4. データ集	
2. 概要	2	免疫染色	9
3. タンパク質標識キット		ウエスタンブロット	11
蛍光 Labeling Kits	3	フローサイトメトリー	12
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂		5. Q&A	14
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH ₂		6. タンパク質精製用	
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH ₂		IgG 精製キット	16
HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit - NH ₂		IgG Purification Kit - A	
ICG Labeling Kit - NH ₂		IgG Purification Kit - G	
蛍光タンパク Labeling Kits	5	7. 関連技術紹介	
Allophycocyanin Labeling Kit -NH ₂		標識前の抗体精製法	17
R-Phycoerythrin Labeling Kit -NH ₂		8. その他ラベル化剤	18
Allophycocyanin Labeling Kit - SH			
R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH			
Biotin Labeling Kits	6		
Biotin Labeling Kit - NH ₂			
Biotin Labeling Kit - SH			
Peroxidase Labeling Kits	7		
Peroxidase Labeling Kit - NH ₂			
Peroxidase Labeling Kit - SH			
Alkaline Phosphatase Labeling Kits	8		
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH ₂			
Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH			

1. キットの選択

抗原抗体（免疫反応）による測定をお考えの方へ

- ・数種類の抗体を用いて多重染色を行いたい。
- ・直接法により検出までの操作ステップを減らしたい、簡略化したい。

しかし、「必要なものが標識された抗体が販売されていない」ということはありませんか？

**Dojindo Labeling Kits は、
お手持ちの抗体やタンパク質に好みの色素や酵素を簡単に標識できます！**

Step 1 : あなたの測定方法に応じたキットを選択しましょう。

● **ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent assay)** の場合 実験例 P6 ~ P8

⇒ 酵素標識 POD(HRP), ALP, Biotin

● **組織・細胞の免疫染色やウエスタンブロットの場合** 実験例 P9 ~ P11

⇒ 酵素標識 POD(HRP), ALP, Biotin^{*1}
蛍光標識 Fluorescein, HiLyte Fluor™, (PE, APC)^{*2}, Biotin^{*1}, ICG

● **フローサイトメトリーの場合** 実験例 P12 ~ P13

⇒ 蛍光標識 Fluorescein, HiLyte Fluor™, PE, APC^{*3}, Biotin^{*1}, ICG

● **in vivo イメージングの場合**

⇒ ICG

- 略名 -

POD : Peroxidase

ALP : Alkaline Phosphatase

APC : Allophycocyanin

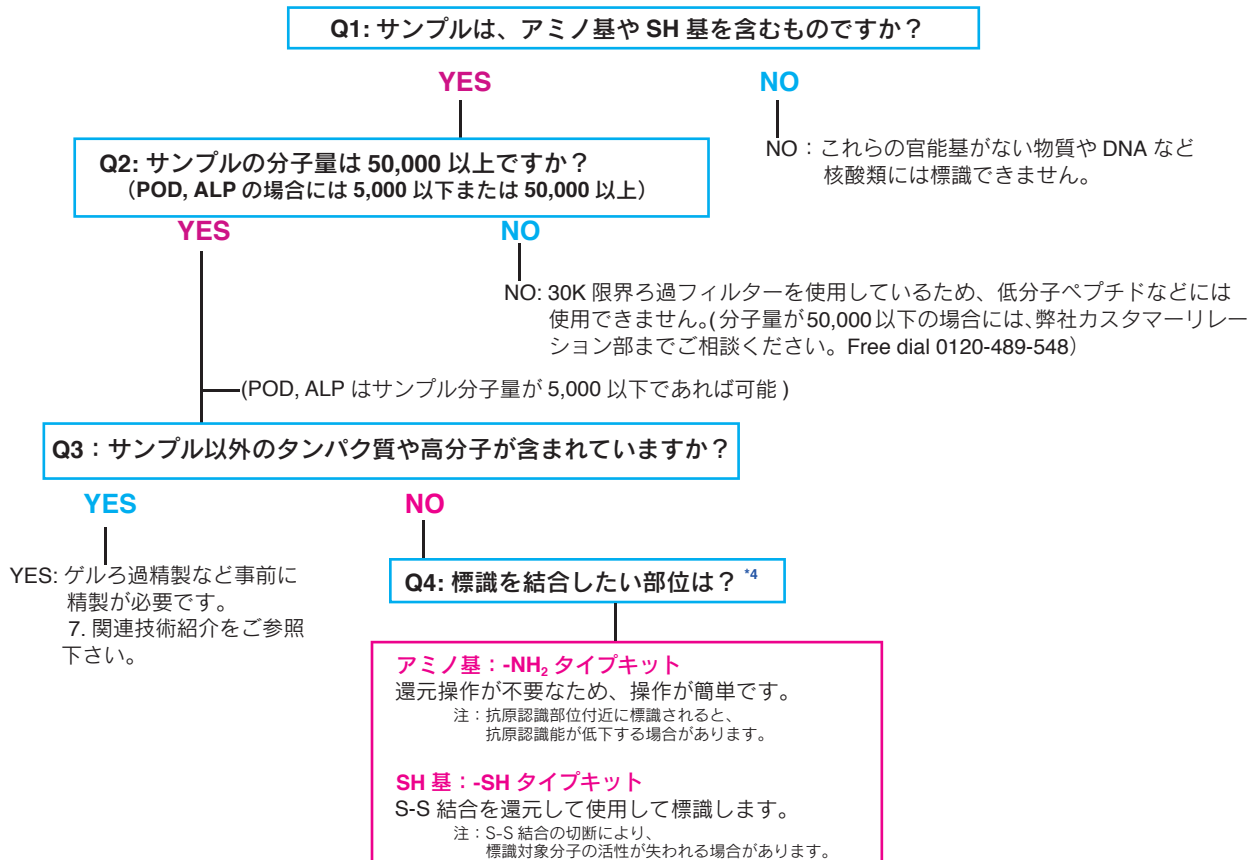
PE : R-Phycoerythrin

^{*1} 酵素標識または蛍光標識アビジンまたは、ストレプトアビジンが必要です。

^{*2} PE, APC の蛍光タンパク質類は、測定対象波長域のフィルターへの蛍光の漏れこみが起こりやすくなるため、多重染色を行う場合には低分子蛍光色素の使用をお勧めします。

^{*3} PE, APC などの蛍光タンパク質類は、低分子蛍光色素に比べ蛍光強度が強く、蛍光波長が幅広いことから、多く使用されています。フローサイトメトリーで多重染色を行う場合、装置の蛍光漏れ込み補正（コンペンセーション）を実施することで、蛍光タンパク質の蛍光漏れ込みを改善できます。

Step 2 : 次にあなたのサンプルにあったキットを選択しましょう。



^{*4} Fluorescein, HiLyte Fluor™, ICG は、-NH₂ タイプのみです。

2. 概要

<簡単・迅速なラベル化キット>

Dojindo Labeling Kits は活性化試薬とフィルトレーションチューブにより、抗体等を簡単に標識するためのキットです。前処理－反応－精製まで全て一つのフィルトレーションチューブ上で行うことができ、3 時間以内に標識体が得られます。1 回の標識操作で 50 ～ 200 µg のサンプルを処理することができます。フィルトレーションチューブを用いた精製はゲルろ過や透析などに比べ標識体の回収率が高く、貴重なサンプルの標識に適しています。キットには保存溶液が付属しており、標識体を安定に保存することができます。

<高分子から低分子まで>

キットでは、分子量 50,000 以上の高分子のラベル化を行うことができます。活性化酵素を標識する Peroxidase Labeling Kits と Alkaline Phosphatase Labeling Kits に関しては、さらに分子量 5,000 以下の低分子の標識も可能です。

<2 タイプの標識方法>

標識方法としては、アミノ基標識用の NH₂ タイプと SH 基標識用の SH タイプの 2 種類のキットがあります。NH₂ タイプは、N-Hydroxysuccinimide (NHS) で活性化した試薬を用いており、タンパク質等の NH₂ 基を標識することができます。SH タイプは Maleimide 基で活性化しており、還元抗体など SH 基を有するサンプルの標識に利用することができます。使用されるサンプルの特性に合わせ、お選び下さい。

<注意事項 1：共通>

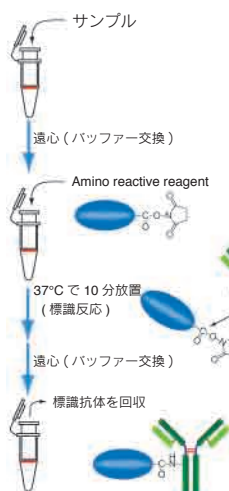
- ・ Reactive 体は、アルミラミジップに入っています。アルミラミジップをいったん開封した後の未使用の Reactive 体は、アルミラミジップに入れたままチャックをしっかりと閉め、-20°C で保存してください。Reactive 体以外は、0 ～ 5°C で保存してください。
- ・ 冷蔵保存中もしくは室温に戻した際に、フィルトレーションチューブに水滴様の液粒が見られることがありますが、これは、メンブレンの乾燥防止剤が液粒化したもので、製品の性能に問題はございません。

<注意事項 2：サンプルが溶液の場合>

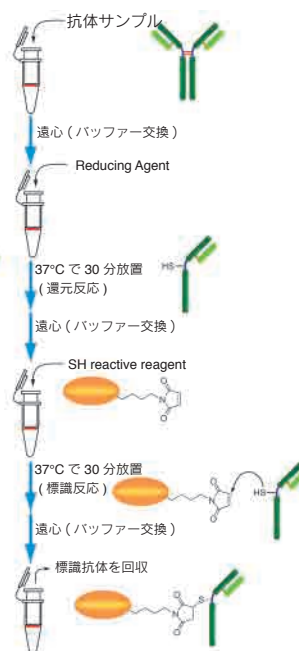
- 濃度 -
 - ・ サンプルの濃度が 0.5 mg/ml 以下 (50 µg/100 µl 以下) である場合には、キット付属のフィルトレーションチューブを用いて濃縮を行ってください。
 - ・ メンブレン上のサンプル量が 50 ～ 200 µg となるよう濃縮してください。
- 共存物 -
 - ・ 安定化剤を除去したり、濃縮することで、不溶性 (凝集) となるサンプルは反応に用いることができません。
 - ・ 不溶性の低分子が含まれる場合は、予め遠心して上清のみを使用してください。(サンプルに反応を阻害する低分子化合物を含む場合には、キット付属を用いて短時間で除去することができます。)
 - ・ 分子量 10,000 以上の物質が含まれる場合には、別途精製を行ってからご使用下さい。(市販の抗体の中には安定化剤としてゼラチンやアルブミンを含む場合があります。)
 - ・ 市販の抗体などでゼラチンやアルブミンなどを安定化剤として含む場合、それらの成分を除いてからご使用ください。

NH₂ 標識、SH 標識の操作手順

a) NH₂ 標識



b) SH 標識*



* ヒンジ部以外の SS 結合が還元される場合があります。

フィルトレーションチューブを利用した反応・精製



キットで使用しているフィルトレーションチューブには 30K の分子分画を持つフィルターがセットされています。分子量 10,000 以下の低分子は、遠心を行うことにより、確実にフィルターを通過し、分子量 50,000 以上の化合物は、フィルターを通過しません。簡単・迅速に反応および精製を行うことが可能です。

本キット以外に必要なもの

- ・ 10 µl, 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)

3. タンパク質標識キット

— 蛍光 Labeling Kits —

Fluorescein Labeling Kit - NH₂
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH₂
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH₂
HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit - NH₂

3 samples ; 同仁品コード (LK01)

3 samples ; 同仁品コード (LK14)

3 samples ; 同仁品コード (LK15)

3 samples ; 同仁品コード (LK16)

キット内容

・ NH ₂ -Reactive Fluorescein	3 tubes	・ WS Buffer	4 ml × 1
または		・ Reaction Buffer	500 μl × 1
・ NH ₂ -Reactive HiLyte™ 555 or 647 or 750	3 tubes	・ Filtration Tube	3 tubes

取扱注意 保存方法 : 冷蔵, 吸湿注意

性質

本キットは、アミノを有する分子に蛍光色素を標識するためのキットである。

活性エステル基を導入した蛍光色素により、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する。様々な波長の色素を揃えており、目的に応じた蛍光特性の色素を選ぶことが可能である。

IgGのような高分子タンパク質をサンプルに使用する場合、付属のフィルトレーションチューブを用いて簡単にサンプルの前処理を行うことが出来る。標識反応を阻害するような低分子化合物（トリスやグリシンなど）は、フィルトレーションチューブを用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がない。また、未反応の蛍光色素はフィルトレーションチューブを用いた精製操作により除去することが出来る。

本キットには、標識に必要な試薬と作製した標識体を保存するための溶液が含まれている。

HiLyte Fluor™ 色素はアメリカの AnaSpec 社が開発した蛍光色素であり、HiLyte Fluor™555 は Cy3 と、HiLyte Fluor™647 は Cy5 と、HiLyte Fluor™750 は Cy7 とそれぞれ類似した蛍光特性を持っている。

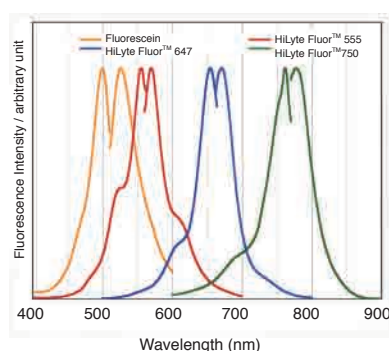
特長

- 1) 約 2 時間で Fluorescein または HiLyte Fluor™ 標識体が調製できる。
- 2) 分子量 50,000 以上のタンパク質に標識できる。
- 3) 50 ~ 200 μg のタンパク質に標識可能である。
- 4) Reactive 体と混合するだけで簡単に標識体を調製できる。
- 5) フィルトレーションチューブを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 6) 付属の保存溶液で Fluorescein または HiLyte Fluor™ 標識体の保存ができる。

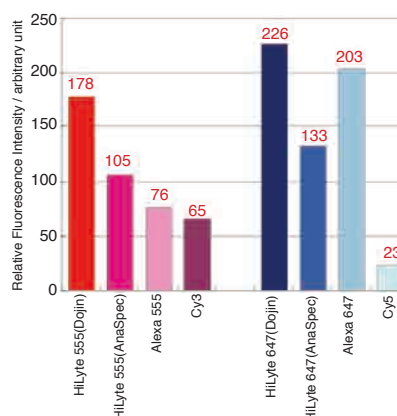
標識体の波長比較

品 名	標識体の励起・蛍光波長	各色素の蛍光
Fluorescein Labeling Kit - NH ₂	λ _{ex/em} = 500/525 nm	緑色蛍光
HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH ₂	λ _{ex/em} = 555/570 nm	橙赤色蛍光
HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH ₂	λ _{ex/em} = 655/670 nm	深赤色蛍光
HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit - NH ₂	λ _{ex/em} = 760/780 nm	(近赤外)

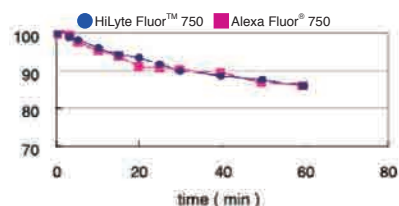
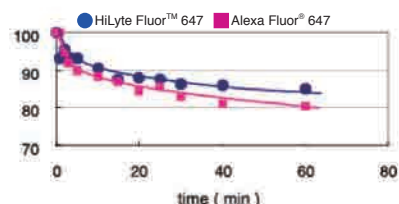
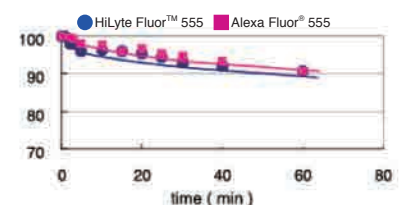
Fluorescein 及び HiLyte Fluor™ 色素標識体の励起・蛍光スペクトル



各キットを用いて標識した標識体蛍光強度 (1 μg IgG / 3 ml PBS 中)



HiLyte Fluor™ と Alexa Fluor® を蛍光顕微鏡で G 励起光を照射した場合の蛍光強度の変化



— ICG をタンパク質に標識 —

ICG Labeling Kit - NH₂

1 sample ; 同仁品コード (LK31)
3 samples ; 同仁品コード (LK31)

キット内容 (1 sample)

・ NH ₂ -Reactive ICG	1 tube
・ WS Buffer	1.5 ml × 1
・ Reaction Buffer	250 μl × 1
・ Filtration Tube	1 tube

キット内容 (3 samples)

・ NH ₂ -Reactive ICG	3 tubes
・ WS Buffer	4 ml × 1
・ Reaction Buffer	500 μl × 1
・ Filtration Tube	3 tubes

取扱注意 保存方法：冷蔵，吸湿注意

性 質

ICG(Indocyanin green) は、肝機能、肝予備能検査のための色素負荷試験にも用いられているシアニン色素で、近赤外線領域に蛍光を持つ。励起波長は 774 nm 付近、蛍光波長は 805 nm 付近で、生体内で用いた場合でもヘモグロビンなどによる妨害を受けにくいという蛍光特性がある。そのため、近赤外蛍光を利用した *in vivo* 蛍光イメージングへの応用が期待されている。

本キットは、アミノ基を有するタンパク質、特に抗体に ICG を標識するためのキットである。既に発売している Fluorescein Labeling Kit - NH₂ や HiLyte Fluor™555 や 647 と同様に、キット付属の NH₂-Reactive ICG は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する。

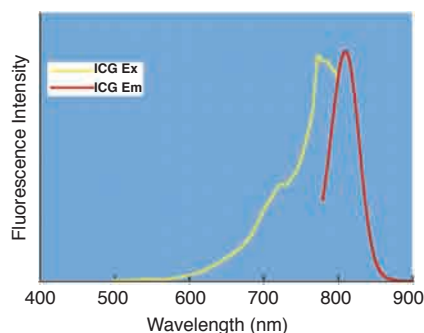
タンパク質に ICG を標識する場合、標識反応を阻害するような低分子化合物（トリスなど）や、未反応の NH₂-Reactive ICG は、付属の Filtration Tube を用いて容易に除去することができる。ICG 標識 IgG の場合、励起および蛍光波長は 774/805 nm である。

本キットには標識に必要な試薬と作製した ICG 標識体を保存するための溶液が含まれている。

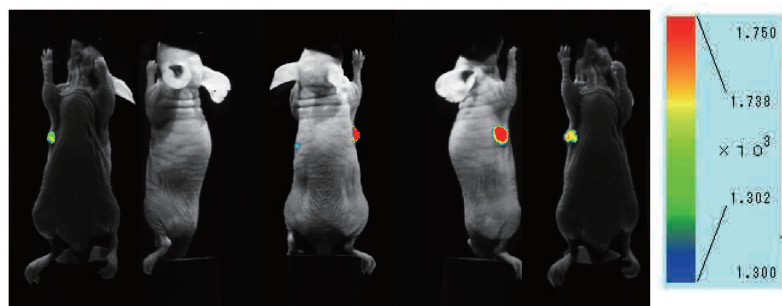
特 長

- 1) *in vivo* イメージングに適している。
- 2) 約 2 時間で ICG 標識体が調製できる。
- 3) 分子量 50,000 以上のタンパク質が標識できる。
- 4) 50 ~ 200 μg のタンパク質を標識可能である。
- 5) フィルトレーションチューブを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 6) 付属の保存溶液で ICG 標識体の保存ができる。

励起、蛍光スペクトル



ICG ラベル抗体を用いたマウス皮下腫瘍の蛍光観察



●装置：Clairvivo OPT(島津製作所)

尾静注により ICG ラベル抗体 50 μg 投与（投与 48 時間後に測定）

マウス：BALB/c nu/nu(雌 11 週齢), 腫瘍細胞：HeLa(右腋皮下移植, 移植後 4 週)

抗体：抗インテグリン α 2 抗体

測定条件

励起波長：785 nm, 蛍光波長：845/55 nm(中心波長/帯域波長), 露光時間：10 秒

—蛍光タンパク Labeling Kits—

Allophycocyanin Labeling Kit - NH₂ R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH₂

3 samples ; 同仁品コード (LK21)

3 samples ; 同仁品コード (LK23)

Allophycocyanin Labeling Kit - SH R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH

3 samples ; 同仁品コード (LK24)

3 samples ; 同仁品コード (LK26)

キット内容 <-NH₂>

・ NH ₂ -Reactive Allophycocyanin	3 tubes
または	
・ NH ₂ -Reactive R-Phycoerythrin	3 tubes
・ WS Buffer	4 ml × 1
・ Reaction Buffer	200 μl × 1
・ Filtration Tube	3 tubes

キット内容 <-SH>

・ SH-Reactive Allophycocyanin	3 tubes
または	
・ SH-Reactive R-Phycoerythrin	3 tubes
・ Reducing Agent	3 tubes
・ WS Buffer	4 ml × 1
・ RA Solution	1 ml × 1
・ Reaction Buffer	200 μl × 1
・ Filtration Tube	3 tubes

取扱注意 保存方法 : 冷蔵, 吸湿注意

性 質

本キットは、アミノ基あるいは SH 基を有する分子に蛍光タンパク質 [Allophycocyanin(APC) または R-Phycoerythrin(R-PE)] を標識するためのキットである。

NH₂ タイプは、活性エステル基を導入した蛍光タンパク質である。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する。

SH タイプは、マレイミド基を導入した蛍光タンパク質である。標的タンパク質が SH 基を持っていない場合には、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ある (ただし、S-S 結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合がある)。IgG ヒンジ領域の SH 基を標識に利用すれば、抗体活性を失わずに蛍光タンパク質を標識することができる。

IgG のような高分子タンパク質をサンプルに使用する場合、付属のフィルトレーションチューブを用いて簡単にサンプルの前処理を行うことができる。

標識反応を阻害するような低分子化合物 (トリスやグリシンなど) は、フィルトレーションチューブを用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がない。

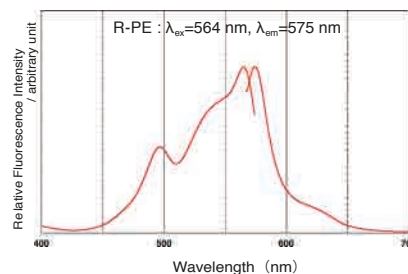
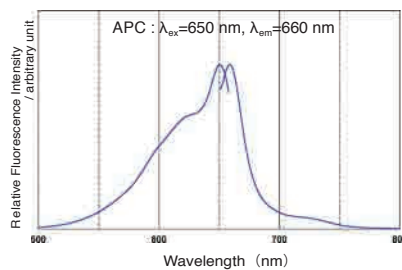
本キットには、標識に必要な試薬と作製した蛍光タンパク質標識体を保存するための溶液が含まれている。

特 長

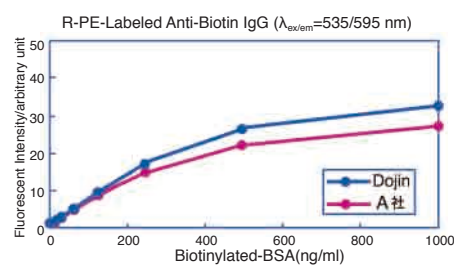
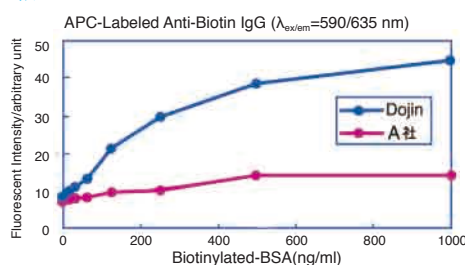
- 1) 約 2.5 時間でビオチン標識体が調製できる。
- 2) 分子量 50,000 以上のタンパク質に標識できる。
- 3) 50 ~ 200 μg のタンパク質に標識可能である。
- 4) Reactive 体と混合するだけで簡単に標識体を調製できる。
- 5) SH タイプは、付属のフィルトレーションチューブを用いることで遊離 SH 基を持たないタンパク質への標識も可能である^{*1}。
- 6) フィルトレーションチューブを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 7) 付属の保存溶液で蛍光タンパク質標識体の保存ができる。

*1 Reducing Agent は、還元型の IgG 調製に最適化されている。IgG 以外の S-S 結合を有するサンプルを使用する場合には、S-S 結合の切断によって標的対象分子の活性が失われる場合があるので検討が必要である。

励起、蛍光スペクトル



他社品との感度比較



APC または R-PE Labeling Kit - SH および他社品キットを用いて蛍光タンパクを標識した Anti-Biotin IgG による FIA(Fluorescence Immunoassay)

— Biotin Labeling Kits —

Biotin Labeling Kit - NH₂

Biotin Labeling Kit - SH

3 samples ; 同仁品コード (LK03)

3 samples ; 同仁品コード (LK10)

キット内容 <-NH₂>

・ NH ₂ -Reactive Biotin	3 tubes
・ WS Buffer	4 ml × 1
・ Reaction Buffer	500 μl × 1
・ Filtration Tube	3 tubes

キット内容 <-SH>

・ SH-Reactive Biotin	3 tubes
・ Reducing Agent	3 tubes
・ WS Buffer	4 ml × 1
・ Reaction Buffer	1 ml × 1
・ Filtration Tube	3 tubes

取扱注意 保存方法：冷蔵，吸湿注意

性 質

本キットは、アミノ基あるいは SH 基を有する分子にビオチンを標識するためのキットである。

NH₂-Reactive Biotin は、活性エステル基を導入したビオチンである。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する。

SH-Reactive Biotin は、マレイミド基を導入したビオチンである。標的タンパク質が SH 基を持っていない場合には、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ある（ただし、S-S 結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合がある）。IgG ヒンジ領域の SH 基を標識に利用すれば、抗体活性を失わずにビオチンを標識することができる。）

IgG のような高分子タンパク質をサンプルに使用する場合、付属のフィルトレーションチューブを用いて簡単にサンプルの前処理を行うことが出来る。標識反応を阻害するような低分子化合物（トリスやグリシンなど）は、フィルトレーションチューブを用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がない。また、未反応の Reactive Biotin はフィルトレーションチューブを用いた精製操作により除去することが出来る。

本キットには、標識に必要な試薬と作製したビオチン標識体を保存するための溶液が含まれている。

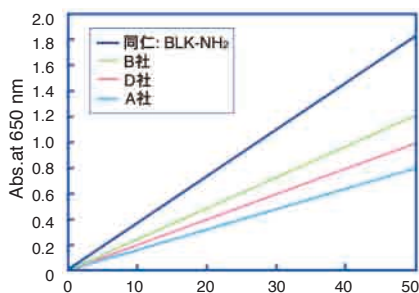
特 長

- 1) 約 2 時間でビオチン標識体が調製できる。
- 2) 分子量 50,000 以上のタンパク質に標識できる。
- 3) 50 ~ 200 μg のタンパク質に標識可能である。
- 4) NH₂-Reactive Biotin もしくは SH-Reactive Biotin と混合するだけで簡単に標識体を調製できる。
- 5) SH タイプは、付属のフィルトレーションチューブを用いることで遊離 SH 基を持たないタンパク質への標識も可能である^{*1}。
- 6) フィルトレーションチューブを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 7) 付属の保存溶液でビオチン標識体の保存ができる。

^{*1} Reducing Agent は、還元型の IgG 調製に最適化されている。IgG 以外の S-S 結合を有するサンプルを使用する場合には、S-S 結合の切断によって標的対象分子の活性が失われる場合があるので検討が必要である。

<実験例 1> サンドイッチ ELISA (NH₂ タイプ使用)

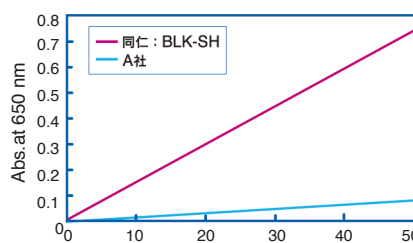
Anti-CAT IgG 100 μg を Biotin Labeling Kit - NH₂ (BLK-NH₂) を用いてビオチン標識し、サンドイッチ ELISA により Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) を検出した。本キットを用いて作製したビオチン標識抗体を用いた場合、他社ビオチン化キットに比べ、1.5 ~ 2 倍高感度であった。



BLK-NH₂ および他社品キットを用いて作製したビオチン標識 Anti-CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase) 抗体を用いた ELISA

<実験例 2> サンドイッチ ELISA (SH タイプ使用)

Anti-CAT IgG 100 μg を Biotin Labeling Kit - SH (BLK-SH) を用いてビオチン標識し、サンドイッチ ELISA により Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) を検出した。本キットを用いて作製したビオチン標識抗体を用いた場合、他社ビオチン化キットに比べ、10 ~ 12 倍高感度であった。



BLK-SH および他社品キットを用いて作製したビオチン標識 Anti-CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase) 抗体を用いた ELISA

— Peroxidase Labeling Kits —

Peroxidase Labeling Kit - NH₂ Peroxidase Labeling Kit - SH

3 samples ; 同仁品コード (LK11)

3 samples ; 同仁品コード (LK09)

キット内容 <-NH₂>

・ NH ₂ -Reactive Peroxidase	100 µg × 3
・ Washing Buffer	4 ml × 1
・ Reaction Buffer	200 µl × 1
・ Storage Buffer	4 ml × 1
・ Filtration Tube	3 tubes

キット内容 <-SH>

・ SH-Reactive Peroxidase	100 µg × 3
・ Reducing Agent	3 tubes
・ Solution A	4 ml × 1
・ Solution B	1 ml × 1
・ Reaction Buffer	200 µl × 1
・ Storage Buffer	4 ml × 1
・ Filtration Tube	3 tubes

取扱注意 保存方法 : 冷蔵, 吸湿注意

性 質

本キットは、アミノ基あるいはSH基を有する分子に Peroxidase(POD) を標識するためのキットである。

NH₂-Reactive POD は、活性エステル基を導入した POD である。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する。

SH-Reactive POD は、マレイミド基を導入した POD である。標的タンパク質がSH基を持っていない場合には、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ある（ただし、S-S結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合がある）。IgG ヒンジ領域のSH基を標識に利用すれば、抗体活性を失わずにPODを標識することができる。

IgGのような高分子タンパク質をサンプルに使用する場合、付属のフィルトレーションチューブを用いて簡単にサンプルの前処理を行うことが出来る。POD活性や標識反応を阻害するような低分子化合物（アジ化ナトリウムやトリス）は、フィルトレーションチューブを用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がない。また、本キットを用いて低分子化合物（MW < 5,000）を標識する場合、未反応の低分子化合物は付属のフィルトレーションチューブを用いた精製操作により除去することが出来る。

本キットには、標識に必要な試薬と作製したPOD標識体を保存するための溶液が含まれている。

特 長

- 1) 約3時間でPOD標識体が調製できる。
- 2) 高分子化合物（MW > 50,000）および低分子化合物（< 5,000）に標識できる。
- 3) 50 ~ 200 µg のタンパク質に標識可能である。
- 4) NH₂-Reactive POD もしくは SH-Reactive POD と混合するだけで簡単に標識体を調製できる。
- 5) SHタイプは、付属のフィルトレーションチューブを用いることで遊離SH基を持たないタンパク質への標識も可能である^{*1}。
- 6) フィルトレーションチューブを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 7) 付属の保存溶液でPOD標識体の保存ができる。

*1 Reducing Agent は、還元型のIgG調製に最適化されている。IgG以外のS-S結合を有するサンプルを使用する場合には、S-S結合の切断によって標的対象分子の活性が失われる場合があるので、検討が必要である。

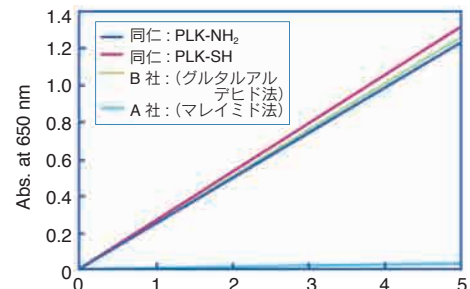
各種ペルオキシダーゼ標識法の特長

	NH ₂ 標識			SH 標識	
	PLK-NH ₂	過ヨウ素酸法	グルタル酸法	PLK-SH	他社マレイミド法
操作時間	3 時間	48 時間	48 時間	3 時間	48 時間
操作性	◎	×	×	◎	×
透析/カラム精製	なし	あり	あり	なし	あり
標識効率	○	△	×	○	○
標識体の回収率	○	△	△	○	△

PLK : Peroxidase Labeling Kit

<実験例> ELISA

ELISA プレートに固定化した Biotin 標識 BSA を、各種方法で HRP 標識した抗ビオチン抗体を用いて検出比較した。



PLK-NH₂、PLK-SH および他社品 Kit を用いて作製した HRP 標識抗ビオチン抗体を用いた ELISA

— Alkaline Phosphatase Labeling Kits —

Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH₂

3 samples ; 同仁品コード (LK12)

Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH

3 samples ; 同仁品コード (LK13)

キット内容 <-NH₂>

・ NH ₂ -Reactive Alkaline Phosphatase	100 µg × 3
・ Washing Buffer	4 ml × 1
・ Reaction Buffer	200 µl × 1
・ Storage Buffer	4 ml × 1
・ Filtration Tube	3 tubes

キット内容 <-SH>

・ SH-Reactive Alkaline Phosphatase	100 µg × 3
・ Reducing Agent	3 tubes
・ Solution A	4 ml × 1
・ Solution B	1 ml × 1
・ Reaction Buffer	200 µl × 1
・ Storage Buffer	4 ml × 1
・ Filtration Tube	3 tubes

取扱注意 保存方法：冷蔵，吸湿注意

性 質

本キットは、アミノ基あるいはSH基を有する分子に Alkaline Phosphatase(ALP) を標識するためのキットである。

NH₂-Reactive ALP は、活性エステル基を導入した ALP である。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する。

SH-Reactive ALP は、マレイミド基を導入した ALP である。標的タンパク質がSH基を持っていない場合には、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ある（ただし、S-S結合の切断によってタンパク質の活性が失われる場合がある）。IgG ヒンジ領域のSH基を標識に利用すれば、抗体活性を失わずにALPを標識することができる。

IgGのような高分子タンパク質をサンプルに使用する場合、付属のフィルトレーションチューブを用いて簡単にサンプルの前処理を行うことができる。ALP活性や標識反応を阻害するような低分子化合物（リン酸やトリス）は、フィルトレーションチューブを用いた前処理によって除去されるため、透析やゲルろ過などの処理を行う必要がない。また、本キットを用いて低分子化合物（分子量5,000以下）を標識する場合、未反応の低分子化合物は付属のフィルトレーションチューブを用いた精製操作により除去することができる。

本キットには、標識に必要な試薬と作製したALP標識体を保存するための溶液が含まれている。

特 長

- 1) 約3時間でALP標識体が調製できる。
- 2) 高分子化合物（MW > 50,000）および低分子化合物（< 5,000）に標識できる。
- 3) 50 ~ 200 µgのタンパク質に標識可能である。
- 4) NH₂-Reactive ALPもしくはSH-Reactive ALPと混合するだけで簡単に標識体を調製できる。
- 5) SHタイプは、付属のフィルトレーションチューブを用いることで遊離SH基を持たないタンパク質への標識も可能である^{*1}。
- 6) フィルトレーションチューブを用いた分離操作により高い回収率で標識体が得られる。
- 7) 付属の保存溶液でALP標識体の保存ができる。

^{*1} Reducing Agentは、還元型のIgG調製に最適化されている。IgG以外のS-S結合を有するサンプルを使用する場合には、S-S結合の切断によって標的対象分子の活性が失われる場合があるので、検討が必要である。

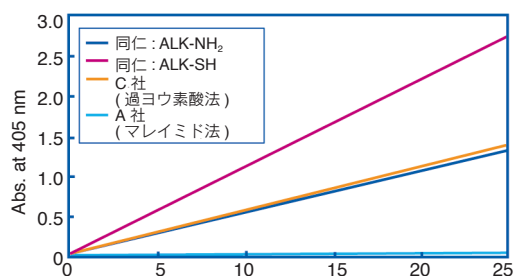
各種アルカリフォスファターゼ標識法の特長

	NH ₂ 標識			SH 標識	
	ALK-NH ₂	過ヨウ素酸法	グルタル酸法	ALK-SH	他社マレイミド法
操作時間	3 時間	48 時間	48 時間	3 時間	48 時間
操作性	◎	×	×	◎	×
透析／カラム精製	なし	あり	あり	なし	あり
標識効率	○	△	×	○	○
標識体の回収率	○	△	△	○	△

ALK : Alkaline Phosphatase Labeling Kit

<実験例> ELISA

ELISA プレートに固定化した Biotin 標識 BSA を、各種方法で ALP 標識した抗ビオチン抗体を用いて検出比較した。



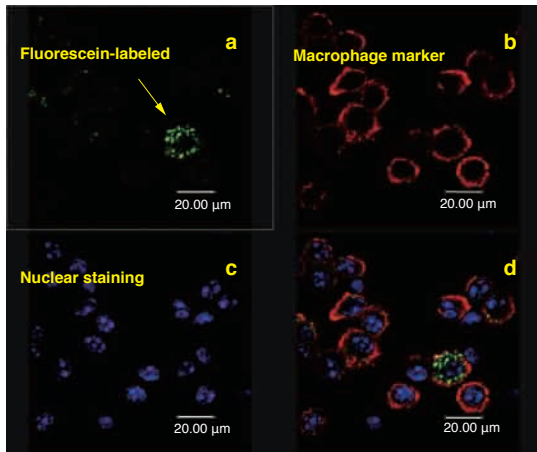
ALK-NH₂、ALK-SH および他社品 Kit を用いて作製した ALP 標識抗ビオチン抗体を用いた ELISA

4. データ集

- 免疫染色 -

<実験例 1>

Fluorescein Labeling Kit - NH₂ を用いてマクロファージに発現するレセプターに対する抗体を標識し、マウス肺を染色した。レセプター発現部位が特異的に Fluorescein によって染色された。

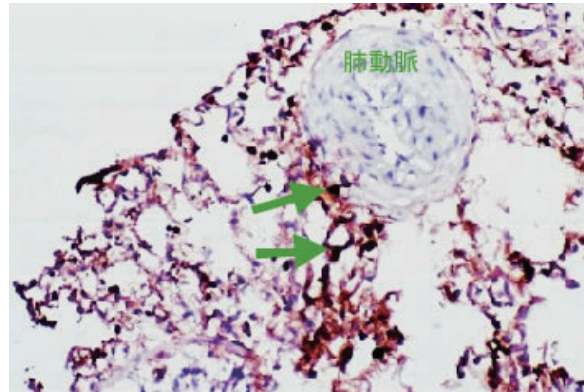


マウス肺の蛍光染色像

a) マクロファージに発現するレセプターの抗体に対する Fluorescein Labeling Kit - NH₂ で標識した標識抗体で染色
b) マクロファージのマーカーで染色 c) 核染色 d) 多重染色画像
(画像提供：熊本大学医学部細胞病理学講座 寺崎泰弘先生)

<実験例 2>

Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody(Clone#NO₂G52) 50 μg を Biotin Labeling Kit - NH₂ を用いてビオチン標識し、肺高血圧剤 (モノクロタリン) を投与したラットの肺動脈凍結切片を染色した。肺動脈近傍で 8- ニトログアノシンが検出されており、モノクロタリン投与により肺動脈周辺でひき起こされた炎症による NO 産生が示唆された。

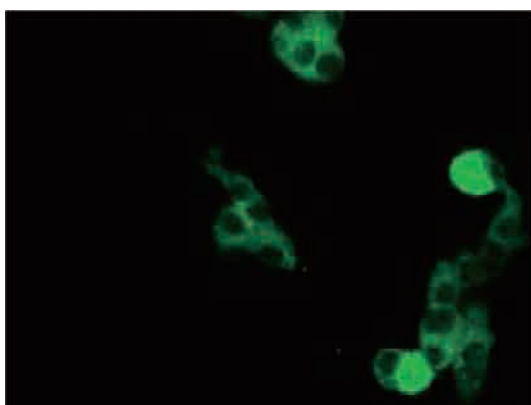


ビオチン標識 Anti-Nitroguanosine monoclonal 抗体を用いて染色した肺高血圧剤 (モノクロタリン) 投与ラット肺動脈凍結切片の組織免疫染色像 (x200, HRP 標識ストレプトアビジン /DAB 染色)。
(画像提供：北里大学医療衛生学部微生物学教室 北里英郎先生)

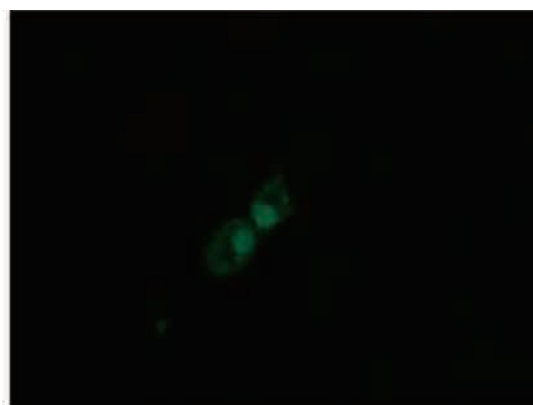
<実験例 3>

ラット褐色細胞腫 PC-12 を、Fluorescein 標識した抗 NDRG1 抗体を用いて染色した。NGF による刺激により、核に NDRG1 が移動したことが確認された。

使用抗体：抗 NDRG1 抗体 100 μg(市販品、ゼラチン含有) を IgG Purification Kit- G を用いて精製
使用キット：Fluorescein Labeling Kit - NH₂



NGF による刺激前

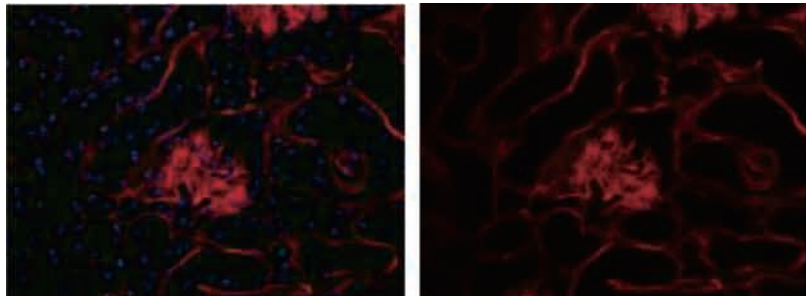


NGF による刺激後

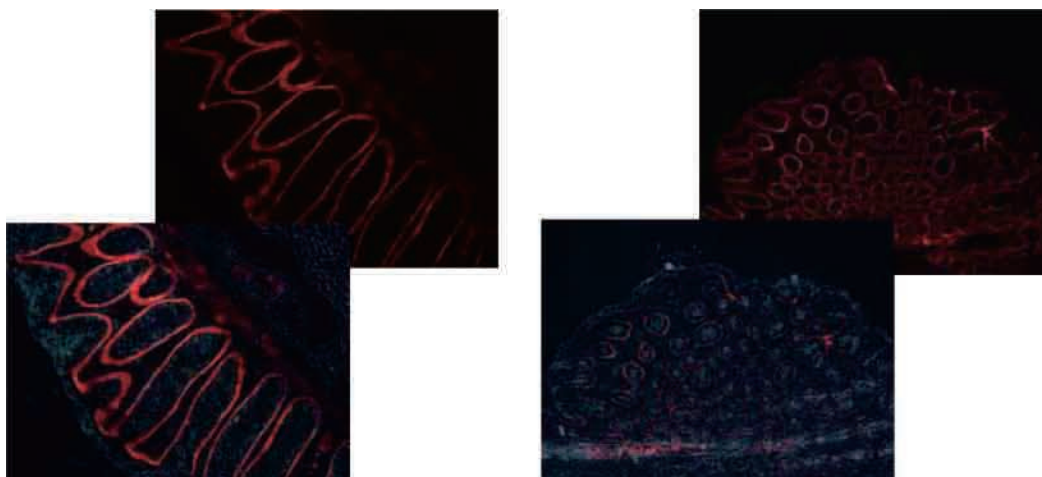
Fluorescein 標識抗 NDRG1 抗体を用いて染色したラット褐色細胞腫 PC-12 の免疫細胞染色像
(画像提供：昭和大学共同施設 遺伝子組換え実験室 武富芳隆先生)

<実験例 4>

HiLyte Fluor™ 標識抗 IV 型コラーゲン $\alpha 5$ (IV) 鎖抗体を用いて、各組織の基底膜を染色した。
各組織の $\alpha 5$ (IV) 鎖を持つ基底膜のみ明瞭に染まっていることが確認できる。
使用抗体：IV 型コラーゲン $\alpha 5$ (IV) 鎖特異的ラット単クローン抗体



マウス腎の免疫組織画像 (右) および核をヘキストによる核染色との二重染色 (左) (撮影倍率 x64)
A5(IV) 鎖がある糸球体基底膜、Bowman 嚢基底膜、尿管基底膜は染まっているが、毛細血管基底膜やメザンギウム基底膜は染まっていない。
使用キット：HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit-NH₂



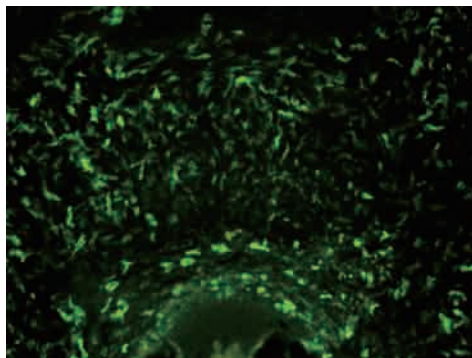
ヒト横結腸の免疫染色画像 (上) およびその位相差像との合成 (下)
使用キット：HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH₂ (撮影倍率 x20)

ヒト盲腸粘膜上の免疫染色画像 (上) およびその位相差像との合成 (下)
使用キット：HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH₂ (撮影倍率 x10)

HiLyte Fluor™ 標識 b14 抗体を用いて染色した各組織の免疫染色像
(画像提供：岡山大学大学院 歯学総合研究科 人体構成学分野 内藤一郎先生、重井医学研究所 佐渡義一先生)

<実験例 5>

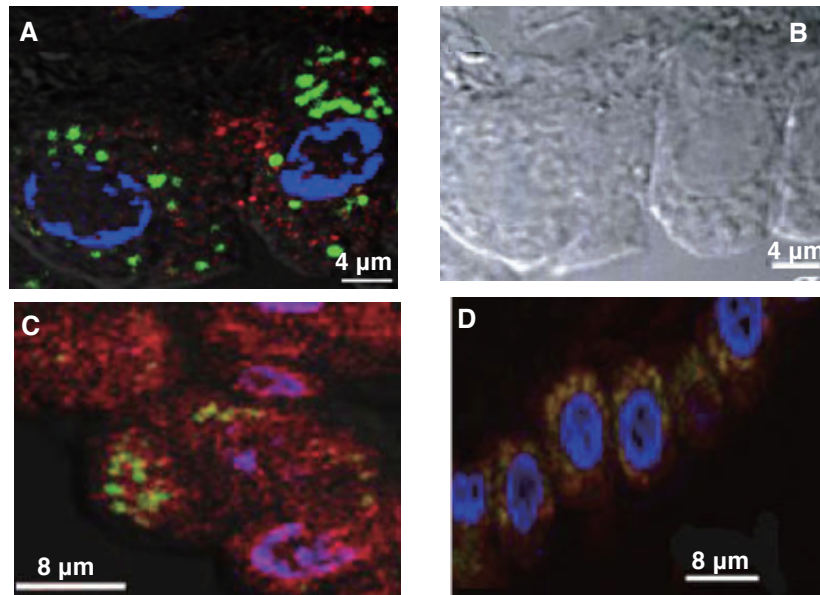
モノクローナル抗ラット I-A 抗原抗体 (Serotec clone#MRC OX-6) 100 μ g を Fluorescein Labeling Kit - NH₂ を用いて Fluorescein を標識し、ラット下顎骨を染色した。



Fluorescein 標識抗ラット I-A 抗原抗体を用いて染色した
ラット下顎骨凍結切片の免疫組織染色像
(画像提供：東京医科歯科大学 大学院 歯学総合研究科 歯髓生物学分野
楊光艶先生、川島伸之先生)

<実験例 6>

特発性肺線維症 (IPF) 症例における気道上皮細胞の二重免疫蛍光染色

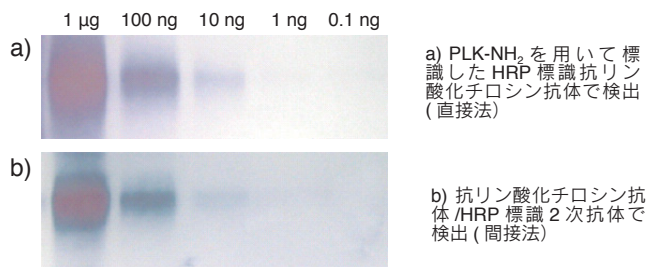


Biotin Labeling Kit-SH を用いて Anti-Nitroguanosine monoclonal 抗体 (Code. AB02) のビオチン標識抗体を作成し、8- ニトログアノ신의生成を検出した (Fluorescein 標識ストレプトアビジン蛍光染色)。
A; 8- ニトログアノ신 (緑) と iNOS (赤)、 B; 細胞の実験野像、 C; 8- ニトログアノ신 (緑) と 8- オキシグアノ신 (赤)
D; 8- ニトログアノ신 (緑) とミトコンドリア (赤) の merge 画像。
8- ニトログアノ신は、ミトコンドリアに特に強い局在を示す。
(画像提供：熊本大学 医学部 教授 赤池孝章先生)

- ウェスタンブロット -

<実験例 7>

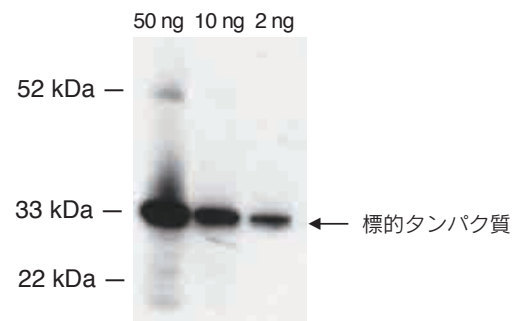
リン酸化チロシン BSA を SDS-PAGE で泳動した後、ニトロセルロース膜に転写し、PLK-NH₂ で作製した HRP 標識抗リン酸化チロシン抗体を用いて検出した。2 次抗体を用いた間接法に比べ、より高感度な検出が可能であった。



リン酸化チロシン BSA のウェスタンブロット
(それぞれ TMB 発色)

<実験例 8>

抗原タンパク質を SDS-PAGE で泳動した後、ニトロセルロース膜に転写し、ALK-NH₂ で作製した ALP 標識抗体を用いて検出した。

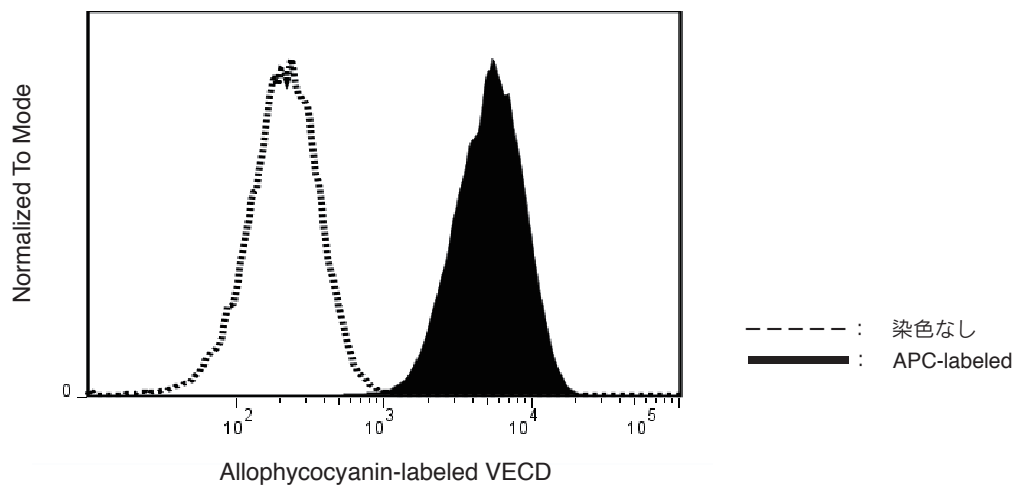


ALP 標識一抗抗体を用いたウェスタンブロット
ALP 標識一次抗体の 25,000 倍希釈で染色し、ALP 蛍光基質 (Bold APB chemiluminescent substratem, Molecular Probes) を反応させ、20 秒間露光した。

- フローサイトメトリー -

<実験例 9>

VE-Cadherin monoclonal Antibody(200 µg) を Allophycocyanin Labeling Kit - SH にて標識した。



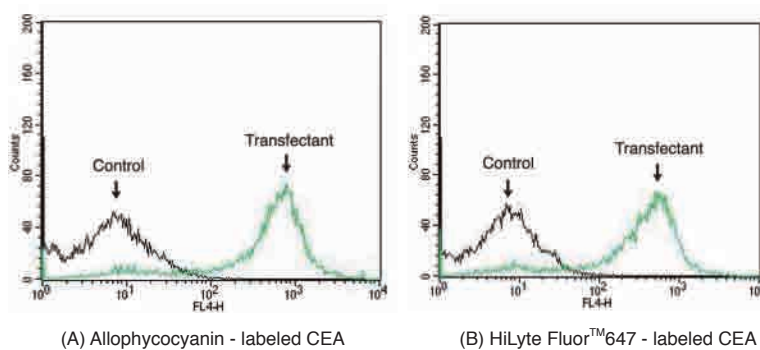
細胞：bEND3(1x10⁶)
前処理：CD16/CD32 0.3 µl (non-specific binding 阻害のため)、氷中 10 min
Biolegend 社：Purified anti-mouse CD16/32 Antibody (cat# 101302)
抗体：上記 VE-Cadherin/APC 0.3 µl/10⁶

(データ提供：熊本大学 発生医学研究所 組織幹細胞分野 坂本 比呂志先生)

<実験例 10>

ヒト抹消血 T 細胞への CEO に対する特異的抗体の単鎖抗体遺伝子を電気穿孔法 (electroporation) で導入し、細胞表面上における単鎖抗体の発現を比較した。

Transfectant では効率よく遺伝子が発現していることが APC 標識、HiLyte Fluor™ 647 標識の双方で観察された。



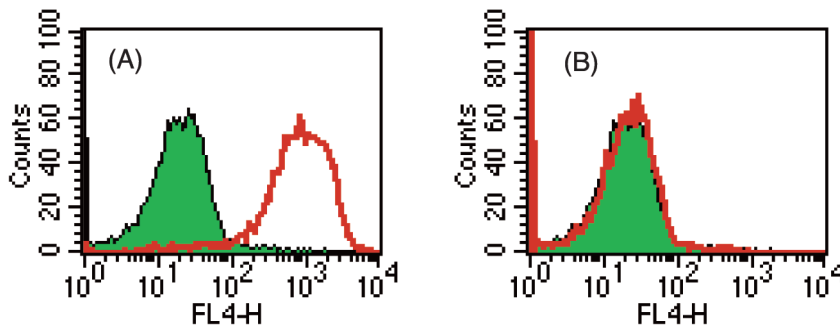
使用抗体：癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic Antigen, CEA)
使用キット：A)Allophycocyanin Labeling Kit - NH₂ , B)HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH₂

(データ提供：福岡大学 医学部 生化学教室 芝口浩智先生)

<実験例 11 >

competitive-inhibition

抗 X 抗体を Biotin Labeling Kit-NH₂ によりビオチン標識後、streptavidin-APC を用いてフローサイトメトリーで解析した。



(A) 未標識抗 X 抗体を反応後、ビオチン化抗 X 抗体を反応 (B) ビオチン化抗 X 抗体のみ反応

抗原を未標識抗 X 抗体でブロックした (A) では、抗体の競合阻害によりビオチン化抗 X 抗体の反応は見られず、ビオチン化抗 X 抗体のみを反応させた (B) において陽性分画が見られた。

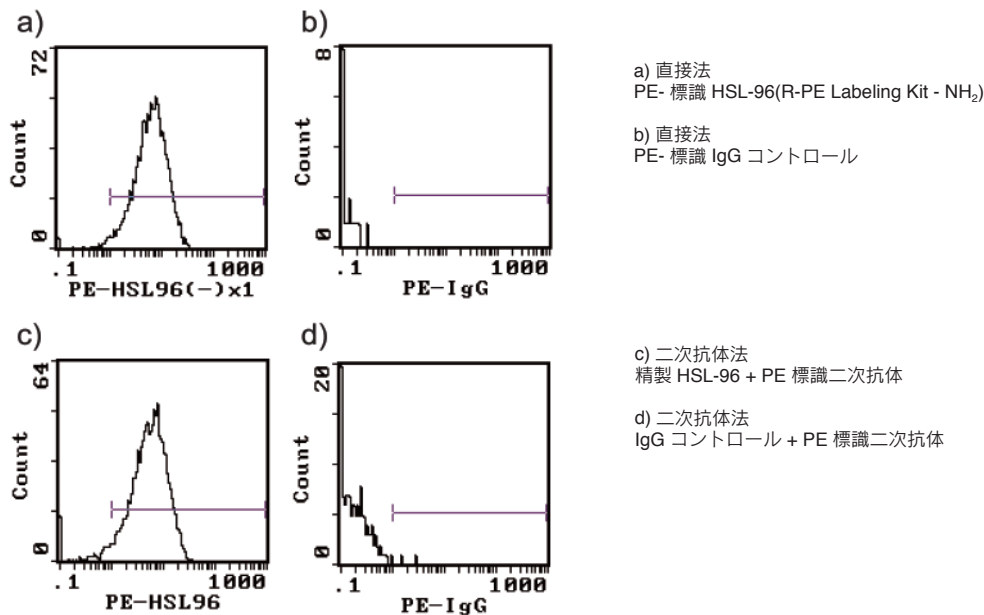
自製の標識抗体においても非特異的反応の少ない十分な検出反応を行うことが可能である。

(データ提供：北海道大学 遺伝子病制御研究所 黒滝大翼先生、今重之先生)

<実験例 12 >

anti-CD179a モノクローナル抗体 HSL-96 を R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH₂ を用いて蛍光標識した後、B-precursor ALL 細胞株 HPB-NUL 1 を染色し、フローサイトメトリーにより二次抗体を用いた間接法と比較した。

直接法では間接法に比べ、陰性画分のバックグラウンドが低く、ほぼ同等の蛍光強度を示し、自製の標識抗体においても十分な検出反応を行うことが可能である。



(データ提供：国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部 清河信敬先生)

(HSL96 抗体提供：東京医科歯科大学 大学院 歯学総合研究科
免疫アレルギー学分野 鳥山一先生)

5. Q & A

各キット共通

Q.このキットの特長は何ですか？

A. 50 ~ 200 µg の小スケールで標識できます。

Q.使用できる IgG の量が少量しかありませんが、標識できますか？

A. 本キットでは、標識に必要な IgG の量は 50 ~ 200 µg としています。この範囲であれば性能に大きな違いはありません。10 µg でも標識は可能ですが、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。

Q.対象分子量が 5 万以上である理由は何ですか？

A. 反応および精製に使用しているフィルトレーションチューブの分子分画が 30K ですので、確実にろ取が可能な 5 万以上と設定しています。

Q.IgG 以外のタンパク質にも標識できますか？

A. 分子量 50,000 以上で、NH₂ 基もしくは SH 基を有するタンパク質であれば標識できます。
酵素標識 (POD, ALP) タイプは分子量 5,000 以下のタンパク質にも標識可能です。

Q.標識に使用する NH₂-Reactive 体や SH-Reactive 体は溶解後、保存できますか？

A. 溶解後は保存せず、すぐに使用してください。
溶液にすると反応部位が徐々に分解するため、反応率が低下します。

Q.一度開封した Reactive 体は、どのように保存すれば良いのでしょうか？

A. Reactive 体は、アルミラミジップに入っています。アルミラミジップをいったん開封した後の未使用の Reactive 体は、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 体以外は、0 ~ 5°C で保存してください。

Q.フィルトレーションチューブに水滴の様なものが見られますが、使用しても問題ないのでしょうか？

A. メンブレ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。

Q.サンプル溶液中の共存物は、反応に影響しますか？

A. 共存物の種類により影響することがあります。溶液中にどのような物質が含まれるかを確認の上、状況に応じてラベル化に用いるタンパク質の精製を行い、標識反応にご使用下さい。

● IgG などの高分子化合物の標識の場合

・高分子 (1 万以上) の共存物

アミノ基をもつような化合物 (例; BSA、ゼラチンなど) を含む場合、反応に影響します。また、Labeling Kits の操作で除去することもできません。ご使用前に別途、除去作業を行って下さい。

*反応に影響しない場合でも、フィルターの目詰まりを招く場合があります。可能であれば、事前に除去して下さい。

● 低分子化合物の標識 (Peroxidase, Alkaline Phosphatase のみ)

・高分子 (1 万以上) の共存物

アミノ基をもつような化合物 (例; BSA、ゼラチンなど) を含む場合、反応に影響します。フィルトレーション操作により分離できますが、反応用とは別に、チューブを用意して下さい。
*反応に影響しない場合でも、フィルターの目詰まりを招く場合があります。可能であれば、事前に除去して下さい。

Q.WS buffer が完全には除けません。そのまま Reaction buffer を入れても反応に影響ないでしょうか？

A. ほぼ除けているのであれば、Reaction Buffer を添加いただいて結構です。反応には特に問題はありません。

Q.遠心で液をどれくらい切らなければなりませんか？

A. 見た目で液がないと感じるまで遠心して下さい。最終ステップで未反応の低分子化合物を除く場合は、特に、確実に遠心を行って下さい。

Q.標識したサンプルは、WS Buffer または Storage Buffer で長期保存できますか？

A. 標識体の安定性はサンプルに依存していますが、保存する場合には Buffer と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。WS Buffer 及び Storage Buffer に防腐剤は含まれておりません。また、系や抗体に適した保存液を別途ご用意いただき、使用されても結構です。

Q.防腐剤としてアジ化ナトリウムを使用できますか？

A. 使用できます。(ただし、Peroxidase, Alkaline Phosphatase は除く。酵素活性に影響を与えるおそれがあります。) 0.1% 程度のアジ化ナトリウムの添加は蛍光強度、抗体力価には影響しません。

Q.最終的なタンパク質の回収率はどれくらいですか？

A. 90% 以上の回収が可能です。

各キット共通 (-SH の場合)

Q.IgG 標識の際に、Reducing Agent により、L 鎖まで還元されることはありませんか？

A. Labeling Kit では、還元型 IgG の調整に最適となるように条件設定を行っております。ごく僅かながら H-L 鎖の結合が切断される部分はございますが、H-H 結合が切断され、還元型 IgG となるものが大部分です。

Q.IgG 抗体還元後の SH の状態で保存することは可能ですか？

A. 還元体は不安定ですので、徐々に酸化されて、S-S になります。続けて標識されることをお勧めします。また、再還元はヒンジ部分の S-S も還元される危険性が増加します。

Fluorescein

Q.モル吸光係数から標識率を算出する時に [0.22] がかけてありますが、この数値は何でしょうか？

A. Fluorescein は 280 nm と 500 nm に吸収があり、280 nm/500 nm の吸光度の比が [0.22] です。Fluorescein タンパク質の標識率は以下の式で算出できます。

$$\text{Fluorescein/タンパク質の標識率} = \frac{A_{500} / 60,000}{(A_{280} - A_{500} \times 0.22) / \epsilon}$$

A₅₀₀: 500 nm の吸光度 A₂₈₀: 280 nm の吸光度
ε: タンパクの 280 nm のモル吸光係数

280nm の吸光度は「タンパク質の吸光度 + Fluorescein の吸光度」となっていますので、500 nm の吸光度に 0.22 を掛けたもの引くことにより、タンパク質のみの吸光度が求められます。

HiLyte Fluor™

Q. HiLyte Fluor™ のモル吸光係数、量子収率について教えてください。

A. 下記に示した通りです。

- 555 : モル吸光係数 : $\epsilon = 150,000$
 量子収率 : 0.246 (Ex 555 nm), 0.288 (Ex 535 nm)
 647 : モル吸光係数 : $\epsilon = 250,000$
 量子収率 : 0.403 (Ex 650 nm), 0.438 (Ex 625 nm)
 750 : モル吸光係数 : $\epsilon = 270,000$
 量子収率 : 0.097 (Ex 750 nm), 0.097 (Ex 735 nm)

* 蛍光強度は、DMSO 溶解後、PBS(-) (pH 7.4) で希釈して測定 (50 nmol/l) しています。

Q. 光による退色は起こりにくいのでしょうか？

A. 当社での確認試験では、他社品と同等の耐光性を示しています。

Q. IgG 1 分子に色素が幾つ標識されますか？

A. IgG 1 分子あたり、3 ~ 7 個の色素が標識されます。プロトコルや製品添付の説明書に標識率を計算する式を掲載しております。

Q. 未反応の色素は除去できますか？

A. Technical Manual にある反応後の 2 回の洗浄で、未反応色素の 95% は除去されます。必要であれば、WS buffer 等での洗浄をさらに 2 ~ 3 回繰り返すことで未反応色素はほぼ除去されます。
 (注) ろ液に着色が無いことを確認下さい。

Allophycocyanin , R-Phycoerythrin

Q. IgG 1 分子に対して、どのくらいの蛍光タンパク質が標識されますか？

A. IgG 1 分子に対して、NH₂ タイプで 1 ~ 3 分子の蛍光タンパク質が、SH タイプで 1 ~ 2 分子の蛍光タンパク質が標識されます。

Q. R-Phycoerythrin の由来は何でしょうか？

A. ラン藻類などの藻類に存在する水溶性の蛍光色素となります。

Q. 未反応の Allophycocyanin または Phycoerythrin およびその分解物を除去するにはどうしたらよいでしょうか？

A. 反応・精製に使用しているフィルトレーションチューブの分子分画は 3 万なのですが、Allophycocyanin や Phycoerythrin の分子量はそれより大きいので、精製時に除去することはできません。別途、ゲルろ過精製を行って下さい。

Q. 低分子の蛍光色素と比較して、蛍光タンパク色素を標識するメリットは何でしょうか？

A. 以下のような点が挙げられます。

- ・ 1 分子あたりの蛍光強度が大きいので、IgG に 1 分子の蛍光タンパクが標識された場合、蛍光色素に比べ数倍の蛍光強度が得られる。
- ・ 励起スペクトルの吸収域が広いので、極大を外れた波長でも励起できる。

Biotin - NH₂

Q. IgG 1 分子に対して、どれくらいの Biotin が標識されますか？

A. Biotin 導入数はタンパク質中の反応性のアミノ基に依存します。Rabbit IgG の場合、1 分子あたり 7 ~ 10 個導入されます。

Q. 抗体にビオチンを標識する場合に共存する BSA は取り除くべきですか？

A. BSA のアミノ基と反応するため、除去する必要があります。また、BSA の分子量が約 66,400 なので、遠心分離する時に目詰まりを起こす恐れがあることから、アフィニティーカラムなどで BSA を取り除く必要があります。

Peroxidase- NH₂

Q. IgG 1 分子に対して、どれくらいの Peroxidase が標識されますか？

A. IgG 1 分子に対して平均 1 ~ 3 分子の Peroxidase が標識されます。

Peroxidase - SH

Q. IgG 1 分子に対して、どれくらいの Peroxidase が標識されますか？

A. IgG 1 分子に対して平均 2 ~ 4 分子の Peroxidase が標識されます。

Alkaline Phosphatase

Q. IgG 1 分子に対して、どのくらいの Alkaline Phosphatase が標識されますか？

A. IgG 1 分子に対して、NH₂ タイプで平均 1 ~ 2 分子の Alkaline Phosphatase が、SH タイプで 2 ~ 4 分子の Alkaline Phosphatase が標識されます。

Q. Alkaline Phosphatase-NH₂ , -SH で使用している Alkaline Phosphatase の由来を教えてください。

A. 子牛小腸由来 (bovine intestinal mucosa) となります。

6. タンパク質精製用

— IgG 精製キット —

IgG Purification Kit - A

1 set ; 同仁品コード (AP01)

IgG Purification Kit - G

1 set ; 同仁品コード (AP02)

キット内容

・ Protein A Cartridge tube	1 tube
または	
・ Protein G Cartridge tube	1 tube
・ Washing Buffer	13 ml × 1
・ Elution Buffer	1.8 ml × 1
・ Catching Buffer	1 ml × 1
・ 1.5 ml Microtube	5 tubes × 2

キット以外に必要なもの

- ・ 10 µl, 200 µl マイクロピペット
- ・ インキュベーター
- ・ 遠心機

取扱注意

保存方法：冷蔵

性 質

IgG Purification Kit - A および IgG Purification Kit - G はウサギなど各種動物のイムノグロブリン G (IgG) を単離、精製するためのキットである。キットにはプロテイン A もしくは G (以下、A/G) 固定化担体、及び各種緩衝液が含まれており、わずか 30 分程度で IgG を含む血清や腹水などから IgG を高純度・高回収率で単離、精製することができる。プロテイン A/G 固定化の担体としてはシリカゲルを採用している。遠心後のプロテイン A/G 固定化担体上の残液量はごくわずかであり、プロテイン A/G 未結合の IgG 以外のタンパク質やその他の物質を二度のゲル洗浄操作により完全に除去できる。プロテイン A/G への IgG 結合後は素早い溶出操作を行うことで、IgG の活性低下は最小限に抑えられる。

本キットは 1 回の精製につき 50 µl の血清、腹水、または 200 µg の IgG の精製が可能である。また、プロテイン A/G 固定化担体は約 10 回の精製を繰り返し行うことができる。

特 長

- 1) 約 30 分で血清や腹水の精製ができる。
- 2) シリカゲルベース担体の採用により、高純度・高収率の精製が可能。
- 3) 1 回の精製で 50 µl の血清や腹水、または 200 µg の抗体精製が可能。
- 4) プロテイン A/G 固定化担体は約 10 回の繰り返し使用が可能。

Q & A

Q. 試料は抗体量で 200 µg となっていますが、それ以上使用することは可能ですか？

A. ゲルへの吸着効率が悪くなるため、最大 200 µg までとなります。

Q. 抗体溶液中の BSA やゼラチンの除去は可能でしょうか？

A. IgG Purification Kit - A あるいは IgG Purification Kit - G を使用することで、除去精製は可能です。

Q. 抗体濃度が低い場合にはどうすればよいですか？

A. 吸着の工程を繰り返し行っていただき、ある程度吸着できたところでまとめて Elution Buffer で溶出させて下さい。

表. 血清 50 µl からの IgG 平均回収量

	Protein A	Protein G
calf	200 ~ 300 µg	250 ~ 350 µg
goat	50 ~ 100 µg	150 ~ 250 µg
horse	150 ~ 250 µg	200 ~ 300 µg
human	150 ~ 250 µg	200 ~ 300 µg
mouse	150 ~ 250 µg	150 ~ 250 µg
rabbit	200 ~ 300 µg	150 ~ 250 µg
rat	50 ~ 100 µg	100 ~ 200 µg
sheep	50 ~ 100 µg	150 ~ 250 µg

Protein A と Protein G との比較

7. 関連技術紹介

- 標識前の抗体精製法 -

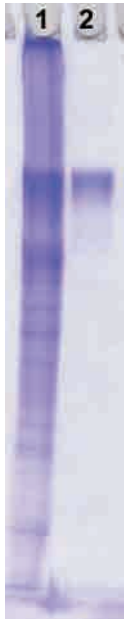
・ゼラチンを含有する溶液からの抗体精製

市販されている抗体には、安定化剤としてゼラチンを含むものがあります。

ゼラチンを含む抗体に小社 Labeling Kits を用いて酵素や蛍光物質を標識する際、ゼラチンは抗体と各 Reactive 体との反応を妨害します。また、ゼラチン自体がゲル化しやすいという特徴を持つため、Labeling Kit シリーズで用いるフィルトレーションチューブの目詰まりを引き起こします。そのため、ゼラチン含有の抗体を用いて標識操作を行う前には、ゼラチンを除去して抗体を単離することが必要となります。

ここでは、IgG Purification Kit - G を活用したゼラチン除去例を、下記に二種類ご紹介致します。

(1) Collagenase(コラゲナーゼ) によるゼラチン分解



0.2 % ゼラチンを含む 0.2 mg/ml IgG 溶液 1 ml に、酵素処理用バッファー（100 mmol/l HEPES, pH 7.4, 0.36 mmol/l CaCl_2 含有）420 μl と酵素処理用バッファーで調製した 3.5 CDU/ml Collagenase（Sigma, # C7926）希釈溶液 80 μl を加えて混合した。37°C, 3 時間 インキュベートした後、IgG Purification Kit - G (AP02, P.16) を用いて IgG を単離した。

注) IgG Purification Kit-G では、抗体を Protein G 固定化担体に保持させる際の抗体溶液量を一回当たり 200 μl としている。しかし、上記の操作でコラゲナーゼ処理した抗体溶液量は、1.5 ml となるため、IgG を担体に保持させる操作を 8 回（200 μl $\times$ 7 回, 100 μl $\times$ 1 回）に分けて行った。

※ 上記の方法で得られる抗体の回収率：45 ~ 50 %

図 ゼラチン除去精製前後の SDS-PAGE

1: ゼラチン含有 IgG 溶液
2: 精製後の IgG 溶液

(2) 300K 限外濾過チューブを用いたゼラチン除去



0.1% ゼラチンを含む 0.2 mg/ml IgG 溶液 1 ml を 300K フィルトレーションチューブ 2 本に分けて限外濾過を行った（1 本につき 200 μl $\times$ 2 回, 100 μl $\times$ 1 回；13,500 x g centrifuge）。

その後、回収溶液 500 μl を IgG Purification Kit - G (AP02, P.16) を用いて IgG を単離した。

注) 回収溶液 500 μl に対し、IgG Purification Kit - G の Washing Buffer 50 μl を添加し、精製を行った。ゲルへの吸着操作を繰り返し行った。

※ 上記の方法で得られる抗体の回収率：35 ~ 45 %

図 ゼラチン除去精製前後の SDS-PAGE

1: IgG
2: ゼラチン含有 IgG 溶液
3: 300K 限外濾過のみの IgG 溶液
4: 300K 限外濾過 + IgG Purification Kit - G で精製後の IgG 溶液

8. その他ラベル化剤

表. ラベル化剤の特性一覧表

	対象官能基	品 名	検 出	λ_{ex}	λ_{em}	備 考
タンパク質標識キット	アミノ基 or SH 基	Alkaline Phosphatase Labeling Kit	(基 質)	—	—	アルカリホスファターゼを抗体等に導入するキット
		Peroxidase Labeling Kit	〃	—	—	ペルオキシダーゼを抗体等に導入するキット
		Biotin Labeling Kit	(アビジン)	—	—	ビオチンを抗体等に導入するキット
		Fluorescein Labeling Kit	蛍 光	500	525	蛍光色素を抗体等に導入するキット (アミノタイプのみ)
		HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit	〃	555	570	〃
		HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit	〃	655	670	〃
		HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit	〃	760	780	〃
		ICG Labeling Kit - NH ₂	〃	774	805	抗体に ICG を標識するためのキット
		Allophycocyanin Labeling Kit	蛍 光	650	660	蛍光タンパク質を抗体等に導入するキット
R-Phycoerythrin Labeling Kit	〃	564	575	〃		
タンパク質標識試薬	アミノ基	CFSE	蛍 光	496	516	細胞質標識剤
		FITC-I	〃	495	520	タンパク等のアミノ基ラベル化剤
		IC3-OSu special packaging	〃	550	570	アミノ酸やペプチド中のアミノ基用のラベル化剤
		IC5-OSu special packaging	〃	640	660	〃
		Sulforhodamine 101 acid chloride	〃	568	590 ～ 630	タンパク等のアミノ基ラベル化剤
HPLC 用誘導体化試薬	アミノ基	NBD-F	蛍 光	470	530	HPLC のプレカラムラベル化剤
		ABD-F	蛍 光	389	513	HPLC のプレカラムラベル化剤
	S H 基	NAM	〃	365	435 ～ 440	HPLC のプレカラムラベル化剤
		SBD-F	〃	385	515	〃
	アルデヒド基	DDB	蛍 光	338	402	芳香族アルデヒドの検出
		MDB	〃	367	445	α - ケト酸の HPLC プレカラムラベル化剤
	カルボン酸	Br-DMEQ	蛍 光	370	450	HPLC のプレカラムラベル化剤
		Br-Mmc	〃	360	410	〃
	水酸基	DMEQ-COCl	蛍 光	400	500	HPLC のプレカラムラベル化剤
ビオチンラベル化剤	アミノ基	Biotinylation Kit (Sulfo-OSu)	(アビジン)	—	—	多量の抗体等にビオチンを導入するためのキット
	〃	Biotin-OSu Biotin-AC ₅ -OSu Biotin-(AC ₅) ₂ -OSu	〃	—	—	アミノ基へのビオチン導入剤、AC 基の数でスペースを調整する。水に溶けにくい。
	〃	Biotin Sulfo-OSu Biotin-AC ₅ Sulfo-OSu Biotin-(AC ₅) ₂ Sulfo-OSu	〃	—	—	アミノ基へのビオチン導入剤、AC 基の数でスペースを調整する。水に溶け易いが分解しやすい。
	SH 基	Biotin-PE-maleimide Biotin-PEAC ₅ -maleimide	〃	—	—	SH 基へのビオチン導入剤、AC 基の数でスペースを調整する。
	アルデヒド基 カルボン酸	Biotin-hydrazide Biotin-AC ₅ -hydrazide Biotin-(AC ₅) ₂ -hydrazide	〃	—	—	アルデヒド基、カルボン酸へのビオチン導入剤、AC 基の数でスペースを調整する。
その他	アミノ基	DTPA anhydride SPDP	—	—	—	アミノ基へのキレート残基の導入剤 ピリジンジスルフィド導入試薬

参考文献

- 1) Y. Kubota, Y. Oike, S. Satoh, Y. Tabata, Y. Niikura, T. Morisada, M. Akao, T. Urano, Y. Ito, T. Miyamoto, N. Nagai, G. Y. Koh, S. Watanabe and T. Suda, "Cooperative interaction of Angiopoietin-like proteins 1 and 2 in zebrafish Vascular development", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2005**, 102(38), 13502.
- 2) H. Shinohara, T. Yasuda, Y. Aiba, H. Sanjo, M. Hamadate, H. Watarai, H. Sakurai and T. Kurosaki, "PKC β regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1", *J. EXP. Med.*, **2005**, 202(10), 1423.
- 3) D. Kamimura, Y. Sawa, M. Sato, E. Agung, T. Hirono and M. Murakami, "IL-2 In Vivo Activities and Antitumor Efficacy Enhanced by an Anti-IL-2 mAb", *J. Immunol.*, **2006**, 177, 306.
- 4) Y. Terasaki, T. Akuta, M. Terasaki, T. Sawa, T. Mori, T. Okamoto, M. Ozaki, M. Takeya and T. Akaike, "Guanine Nitration in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Its Implication for Carcinogenesis", *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, **2006**, 174, 665-673.

* ご注意

- 掲載内容（製品・包装など）はパンフレット編集時（2011/06）におけるものであり、予告無く変更することがあります。
- 試験・研究用です。医薬品としては使用できません。

URL: <http://www.dojindo.co.jp> Free dial: 0120-489548
E-mail: info@dojindo.co.jp Free fax: 0120-021557

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 熊本テクノ・リサーチパーク 〒861-2202
Tel.096-286-1515（代表）Fax.096-286-1525

ドージン・イースト（東京）

東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012
Tel.03-3578-9651（代表）Fax.03-3578-9650

20110601