

酵素 (POD,ALP) を標識したい

利用製品

< 少量抗体 (10μg) 標識用 >

Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit [LK33]

< 抗体・タンパク質 (50-200μg) 標識用 >

Peroxidase Labeling Kit-NH₂ [LK11]

Peroxidase Labeling Kit-SH [LK09]

Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH₂ [LK12]

Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH [LK13]

解析装置



I はじめに

Peroxidase (POD) および alkaline phosphatase (ALP) は、基質特異性が高くかつ分光法、蛍光法、発光法用の検出試薬も豊富に揃っていることから、酵素免疫測定 (EIA) で汎用されている。一般には、POD または ALP を標的分子 (抗原、抗体等) に標識し、その標識体を用いて抗原-抗体反応を行う。標識体は、標的分子のアミノ基または SH 基に、POD または ALP を反応させることで、安定な共有結合体として得られる。Peroxidase Labeling Kits および Alkaline Phosphatase Labeling kit は、POD または ALP を標的分子のアミノ基または SH 基に標識するためのキットである。POD および ALP は、あらかじめスクシニミジルエステル基やマレイミド基で活性化されているため、標的分子と混合するだけで標識体を得ることができる。

小社では、サンプルの種類や量に応じて試薬を混ぜるだけで 30 分以内に標識体を得ることのできる Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit 及び、前処理-反応までを一つのフィルトレーションチューブで行い、3 時間以内に目的の標識体を得ることのできる Peroxidase Labeling Kit - NH₂/SH、Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH₂/SH を製品化している。これらのキットを使用した酵素標識体の作製法について紹介する。

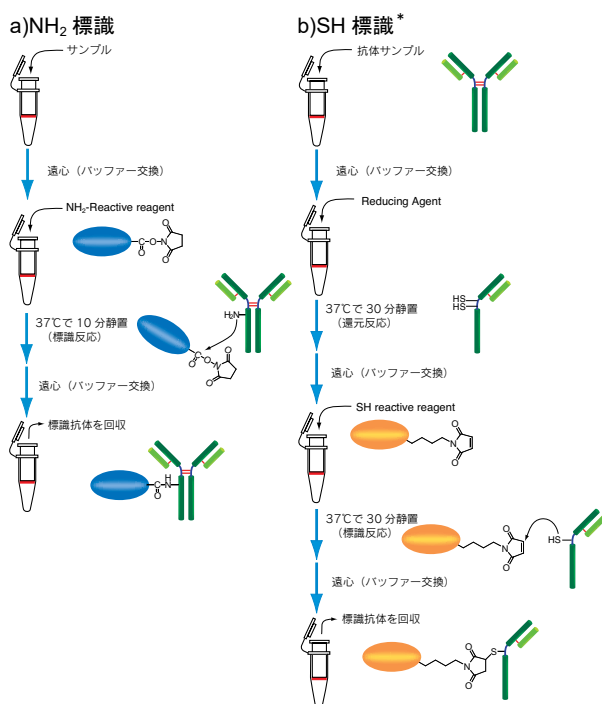


図 1 Labeling Kits による酵素標識 IgG の作製法
(* ヒンジ部分以外の SS が還元される場合もある)

II Ab-10 Rapid Peroxidase Labeling Kit によるアミノ基への Peroxidase 標識 (Code: LK33)

1. キット内容

- Reactive Peroxidase
- Reaction Buffer
- Stop Solution

2. キット以外に必要なもの

- 20 μl, 200 μl マイクロピペッター、マイクロチューブ (サンプル及び Working buffer 調製用) インキュベーター (37°C)

3. 操作

- 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。
 - 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。
 - 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。
- ※ 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。詳細は取扱説明書参照

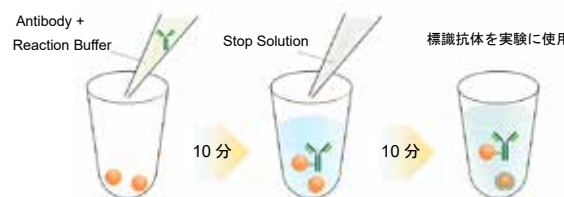


図 2 酵素標識の操作

4. Peroxidase 標識抗体での検出例

< 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%CO₂ 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。

- 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 (Code : D006)、0.003% H_2O_2 、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。

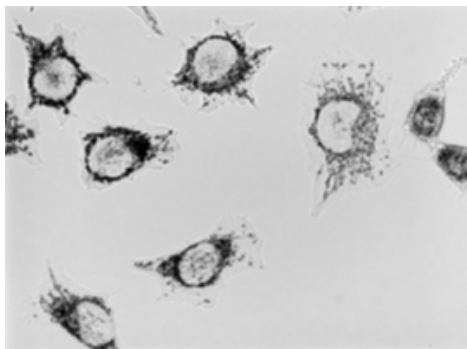


図 3 HeLa 細胞のミトコンドリアの免疫染色画像

FAQ

- Q: 抗体溶液に含まれる添加剤は標識反応に影響しますか？
 A: 抗体溶液中の添加剤によっては影響を受ける場合がございますので、ご使用前に必ず取り扱い説明書中の注意事項をご確認ください。
- Q: 使用可能な抗体のクラスには、どのようなものがありますか？
 A: 本製品は IgG 抗体へ標識するよう最適化しています。IgG 以外のクラス (IgM や IgA 等) では標識実績はございません。

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を小社 HP にて掲載。ご興味のある方は、小社 HP にて最新情報をご確認下さい。

Ab-10 同仁

検索

III Peroxidase Labeling Kit - NH_2 によるアミノ基への POD 標識 (Code: LK11)

1. キット内容

- ・ NH_2 -Reactive Peroxidase
- ・ Washing Buffer
- ・ Reaction Buffer
- ・ Storage Buffer
- ・ Filtration Tube

2. キット以外に必要なもの

- ・ 10 μ l、200 μ l 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 (標識体保存用)
- ・ 遠心機 (マイクロチューブ用)

3. 保存条件

0 ~ 5°C で保存すること。 NH_2 -Reactive Peroxidase は窒素封入されているので、外装袋を一旦開封後は、再度窒素封入し、-20°C で保存する。

4. 使用上の注意

本キットは分子量 50,000 以上および 5,000 以下のタンパク質を対象としています。

標識するタンパク質溶液に分子量 10,000 以上の物質が含まれる場合は、あらかじめ精製を行なって下さい。(抗体を精製したいを参照)。また、タンパク質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。

一回の標識操作に必要なタンパク質量は 50 ~ 200 μ g です。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。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ありません。

5. 操作

1) Immunoglobulin G (IgG) への標識

1 IgG 50 ~ 200 μ g を含むサンプル溶液^{a)}と、Washing Buffer 100 μ l を Filtration Tube に入れる。

2 8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。Washing Buffer 100 μ l を加え、もう一度遠心する。

3 Reaction Buffer 10 μ l を NH_2 -Reactive Peroxidase に加え溶解させる^{c)}。

4 NH_2 -Reactive Peroxidase を含む溶液を、IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上に添加する。

5 ピペッティングによりメンブレン上の IgG と混合させた後、37°C で 2 時間反応する。

6 Washing Buffer 100 μ l を Filtration Tube に加える。

7 8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。

8 Storage Buffer 200 μ l を加え^{d)}、ピペッティングにより標識体を溶解させる。溶液をマイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する^{e)}。

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

- 100 μ l 以下の液量で使用する。IgG 濃度が 0.5 mg/ml 以下である場合には、操作 1 と操作 2 を繰り返し、IgG 量が 50 ~ 200 μ g となるように調整する。溶液に他のタンパク質やアミノ基を有する化合物が混在する場合は、精製により除去していただきたい。
- 溶液がメンブレン上に残っている場合は、更に 8,000 x g で 5 分間遠心する。
- NH₂-Reactive Peroxidase は Reaction Buffer 中では不安定である。溶解後は直ちに操作 4 に進む。
- 1 ~ 3 分子の POD が IgG 1 分子に標識される。通常、未反応の POD は EIA に影響を及ぼさない。必要に応じて、ゲルろ過カラムあるいはアフィニティークラム等により精製すること。
- 長期保存する場合は、同量のグリセロールを添加し、-20°C で保存する。

2) アミノ基を有する低分子化合物 (分子量 < 5,000) への標識



Reaction Buffer で調製した 1 mmol/l サンプル溶液 50 μ l を^{a)}、NH₂-Reactive Peroxidase に加える。ピペティングにより NH₂-Reactive Peroxidase を溶解した後、37°C で 1 時間反応する。

Washing Buffer 100 μ l を反応溶液に加え、マイクロピペットで Filtration Tube に移す。

8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。ろ液を捨てた後、Washing Buffer 200 μ l を加え、遠心する^{b)}。この操作をもう一度繰り返す。

Storage Buffer 200 μ l を加え^{c)}、ピペティングにより標識体を溶解させる。溶液をマイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する。

- サンプルが Reaction Buffer に難溶の場合は、水と混合する溶媒 (DMSO、DMF、アルコール等) で 10 mmol/l サンプル溶液を調製し、この溶液 5 μ l と Reaction Buffer 45 μ l を混合し、1 mmol/l サンプル溶液とする。被標識化合物以外にアミノ基を有する物質が含まれる場合は、精製により除去していただきたい。
- 溶液がメンブレン上に残っている場合は、更に 8,000 x g で 5 分間遠心する。
- POD 1 分子に、1 ~ 2 分子の低分子化合物が標識される。

1 μ g 100 ng 10 ng 1 ng 0.1 ng

a)

b)

図 4 リン酸化チロシン BSA のウエスタンブロット

- PLK - NH₂ を用いて作製した HRP 標識抗リン酸化チロシン抗体で検出 (直接法)。
- 抗リン酸化チロシン抗体 / HRP 標識 2 次抗体で検出 (間接法)。それぞれ、TMB 発色。

IV Peroxidase Labeling Kit - SH による SH 基への POD 標識 (Code: LK09)

1. キット内容

- SH-Reactive Peroxidase
- Reducing Agent
- Solution A
- Solution B
- Reaction Buffer
- Storage Buffer
- Filtration Tube

2. キット以外に必要なもの

- 10 μ l、200 μ l マイクロピペット
- インキュベーター (37°C)
- マイクロチューブ (標識体保存用)
- 遠心機 (マイクロチューブ用)

3. 保存条件

0 ~ 5°C で保存する。SH-Reactive Peroxidase は外装袋を一旦開封後は、-20°C で保存する。

4. 使用上の注意

本キットは分子量 50,000 以上および 5,000 以下のタンパク質を対象としています。

標識するタンパク質溶液に分子量 10,000 以上の物質が含まれる場合は、あらかじめ精製を行なって下さい。(抗体を精製したいを参照)。また、タンパク質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下さい。

一回の標識操作に必要なタンパク質量は 50 ~ 200 μ g です。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。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ありません。

5. 操作

1) Immunoglobulin G (IgG) への標識



IgG 50 ~ 200 μ g を含むサンプル溶液^{a)}と Solution A 100 μ l を Filtration Tube に加える。

ピペティングにより混合した後、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。

Solution A 150 μ l を Reducing Agent に加え、ボルテックスミキサー等で混合し溶解させる^{c)}。

この溶液 100 μ l を IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上加える。



5 ピペッティングにより IgG と混合した後、37°C で 30 分間反応する。



6 Solution B 100 μ l を加え、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。ろ液を捨てた後、Solution B 200 μ l を加え、遠心する^{b)}。



7 Reaction Buffer 50 μ l を SH-Reactive Peroxidase に加え、ピペッティングにより溶解させる。



8 この溶液を Filtration Tube のメンブレン上にマイクロピペットで加える。



9 ピペッティングにより混合した後、37°C で 1 時間反応する。



10 Solution A 100 μ l を加え、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。



11 Storage Buffer 200 μ l を加え^{d)}、ピペッティングにより標識体を溶解させる。溶液をマイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する^{e)}。

- a) サンプル溶液量は 100 μ l 以下で使用する。IgG 濃度が 0.5 mg/ml 以下である場合には、操作 1 と操作 2 を繰り返し、IgG 量が 50 ~ 200 μ g となるように調整する。溶液に標識対象物以外の分子量 10,000 以上の物質が含まれる場合は、精製により除去していただきたい。
- b) 溶液がメンブレン上に残っている場合は、更に 8,000 x g で 5 分間遠心する。
- c) Reducing Agent がキャップの内側に付着している場合があるので、開封にはご注意ください。
- d) 2 ~ 4 分子の POD が IgG 1 分子に標識される。通常、未反応の POD は EIA に影響を及ぼさない。必要に応じて、ゲルろ過カラムあるいはアフィニティーカラム等により精製すること。
- e) 長期保存する場合は、同量のグリセロールを添加し、-20°C で保存する。

2) SH 基を有する低分子化合物 (分子量 < 5,000) への標識



1 Reaction Buffer で調製した 1 mmol/l サンプル溶液 50 μ l を^{a)}、SH-Reactive Peroxidase に加える。ピペッティングにより SH-Reactive Peroxidase を溶解した後、37°C で 1 時間静置する。



2 Solution A 100 μ l を反応溶液に加え、マイクロピペットで Filtration Tube に移す。



3 8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。ろ液を捨てた後、Solution A 200 μ l を加え、遠心する^{b)}。この操作をもう一度繰り返す。



4 Storage Buffer 200 μ l を加え^{c)}、ピペッティングにより標識体を溶解させる。溶液をマイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する。

- a) サンプルが Reaction Buffer に難溶の場合は、水と混合する溶媒 (DMSO、DMF、アルコール等) で 10 mmol/l サンプル溶液を調製し、この溶液 5 μ l と Reaction Buffer 45 μ l を混合し、1 mmol/l サンプル溶液とする。標識対象物以外に SH 基を有する物質が含まれる場合は、精製により除去していただきたい。
- b) 溶液がメンブレン上に残っている場合は、更に 8,000 x g で 5 分間遠心する。
- c) POD 1 分子に、1 ~ 2 分子の低分子化合物が標識される。

V Alkaline Phosphatase Labeling Kit - NH₂ によるアミノ基への ALP 標識 (Code:LK12)

1. キット内容

- NH₂-Reactive Alkaline Phosphatase
- Washing Buffer
- Reaction Buffer
- Storage Buffer
- Filtration Tube

2. キット以外に必要なもの

- 10 μ l、200 μ l 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 (標識体保存用)
- 遠心機 (マイクロチューブ用)

3. 保存条件

0 ~ 5°C で保存する。NH₂-Reactive Alkaline Phosphatase は、外装袋を一旦開封後は、-20°C で保存する。

4. 使用上の注意

本キットは分子量 50,000 以上および 5,000 以下のタンパク質を対象としています。

標識するタンパク質溶液に分子量 10,000 以上の物質が含まれる場合は、あらかじめ精製を行なって下さい。また、タンパク質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下さい。

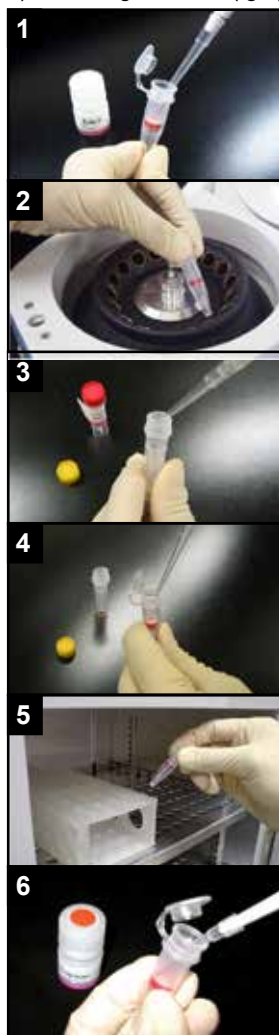
一回の標識操作に必要なタンパク質量は 50 ~ 200 μ g です。

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。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ありません。

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

5. 操作

1) Immunoglobulin G (IgG) への標識



IgG 50 ~ 200 μ g を含むサンプル溶液^{a)}と、Washing Buffer 100 μ l を Filtration Tube に入れる。

8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。Washing Buffer 100 μ l を加え、もう一度遠心する^{b)}。

Reaction Buffer 10 μ l を NH₂-Reactive Alkaline Phosphatase に加え溶解させる^{c)}。

NH₂-Reactive Alkaline Phosphatase を含む溶液を、IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上に添加する。

ピペッティングによりメンブレン上の IgG と混合させた後、37°C で 2 時間反応する。

Storage Buffer 190 μ l を加え^{d)}、ピペッティングにより標識体を溶解させる。溶液をマイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する^{e)}。

- サンプル溶液量は 100 μ l 以下で使用する。IgG 濃度が 0.5 mg/ml 以下である場合には、操作 1 と操作 2 を繰り返し、IgG 量が 50 ~ 200 μ g となるように調整する。溶液に他のタンパク質やアミノ基を有する化合物が混在する場合は、精製により除去していただきたい。
- 溶液がメンブレン上に残っている場合は、更に 8,000 x g で 5 分間遠心する。
- NH₂-Reactive Alkaline Phosphatase は Reaction Buffer 中では不安定である。溶解後は直ちに操作 4 へ進む。
- 1 ~ 3 分子の ALP が IgG 1 分子に標識される。通常、未反応の ALP は EIA に影響を及ぼさない。必要に応じて、ゲルろ過カラムあるいはアフィニティークラム等により精製すること。
- 長期保存する場合は、そのまま -20°C で保存すること。

(2) アミノ基を有する低分子化合物 (分子量 < 5,000) への標識

- Reaction Buffer で調製した 1 mmol/l サンプル溶液 50 μ l を^{a)}、NH₂-Reactive Alkaline Phosphatase に加える。ピペッティングにより NH₂-Reactive Alkaline Phosphatase を溶解した後、37°C で 1 時間放置する。
- Washing Buffer 100 μ l を反応溶液に加え、マイクロピペットで Filtration Tube に移す。
- 8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。ろ液を捨てた後、Washing Buffer 200 μ l を加え、遠心する^{b)}。この操作をもう一度繰り返す。

4) Storage Buffer 200 μ l を加え^{c)}、ピペッティングにより標識体を溶解させる。溶液をマイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する。

- サンプルが Reaction Buffer に難溶の場合は、水と混合する溶媒 (DMSO、DMF、アルコール等) で 10 mmol/l サンプル溶液を調製し、この溶液 5 μ l と Reaction Buffer 45 μ l を混合し、1 mmol/l サンプル溶液とする。被標識化合物以外にアミノ基を有する物質が含まれる場合は、精製により除去していただきたい。
- 溶液がメンブレン上に残っている場合は、更に 8,000 x g で 5 分間遠心する。
- ALP 1 分子に、1 ~ 2 分子の低分子化合物が標識される。

IV Alkaline Phosphatase Labeling Kit - SH による SH 基への ALP 標識 (Code : LK13)

1. キット内容

- SH-Reactive Alkaline Phosphatase
- Reducing Agent
- Solution A
- Solution B
- Reaction Buffer
- Storage Buffer
- Filtration Tube

2. キット以外に必要なもの

- 10 μ l、200 μ l 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 (標識体保存用)
- 遠心機 (マイクロチューブ用)

3. 保存条件

0 ~ 5°C で保存する。SH-Reactive Alkaline Phosphatase は外装袋を一旦開封後は -20°C で保存する。

4. 使用上の注意

本キットは分子量 50,000 以上および 5,000 以下のタンパク質を対象としています。

標識するタンパク質溶液に分子量 10,000 以上の物質が含まれる場合は、あらかじめ精製を行なって下さい。また、タンパク質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。

一回の標識操作に必要なタンパク質量は 50 ~ 200 μ g です。

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。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ありません。

5. 操作

1) Immunoglobulin G (IgG) への標識



IgG 50 ~ 200 μ g を含むサンプル溶液^{a)}と Solution A 100 μ l を Filtration Tube に加える。

ピペッティングにより軽く混合した後、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。



3 Solution A 150 µl を Reducing Agent に加え、ピペッティングにより溶解させる^{c)}。

4 この溶液 100 µl を IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上加える。

5 ピペッティングにより IgG と混合した後、37°C で 30 分間反応する。

6 Solution B 100 µl を加え、8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。ろ液を捨てた後、Solution B 200 µl を加え、遠心する^{b)}。

7 Reaction Buffer 50 µl を SH-Reactive Alkaline Phosphatase に加え、ピペッティングにより溶解させる^{d)}。

8 この溶液を還元 IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上加える。

9 ピペッティングにより混合した後、37°C で 1 時間反応する。

10 Storage Buffer 150 µl を加え、ピペッティングにより標識体を溶解させる^{e)}。溶液をマイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する^{f)}。

2) SH 基を有する低分子化合物 (分子量 < 5,000) への標識

(1) Reaction Buffer で調製した 1 mmol/l サンプル溶液 50 µl を^{a)}、SH-Reactive Alkaline Phosphatase に加える。ピペッティングにより SH-Reactive Alkaline Phosphatase を溶解した後、37°C で 1 時間反応する。

(2) Solution A 100 µl を反応溶液に加え、マイクロピペットで Filtration Tube に移す。

(3) 8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。ろ液を捨てた後、Solution A 200 µl を加え、遠心する^{b)}。この操作をもう一度繰り返す。

(4) Storage Buffer 200 µl を加え^{c)}、ピペッティングにより標識体を溶解させる。溶液をマイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する^{d)}。

a) サンプルが Reaction Buffer に難溶の場合は、水と混合する溶媒 (DMSO、DMF、アルコール等) で 10 mmol/l サンプル溶液を調製し、この溶液 5 µl と Reaction Buffer 45 µl を混合し、1 mmol/l サンプル溶液とする。被標識化合物以外に SH 基を有する物質が含まれる場合は、除去してすること。

b) 溶液がメンブレン上に残っている場合は、更に 8,000 x g で 5 分間遠心する。

c) ALP 1 分子に、1 ~ 2 分子の低分子化合物が標識される。

d) 長期保存する場合は、そのまま -20°C で保存する。

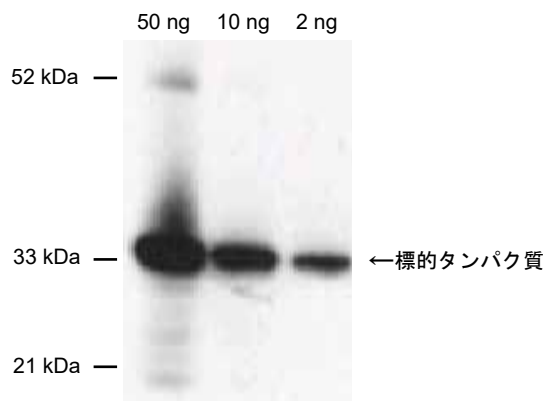


図 5 ALP 標識一次抗体を用いたウェスタンブロット

ALP 標識一次抗体の 25,000 倍希釈液で染色し、ALP 発光基質 (Bold APB chemiluminescent substrate, Molecular Probes) を反応させ、20 秒間露光した。

a) サンプル溶液量は 100 µl 以下で使用する。IgG 濃度が 0.5 mg/ml 以下である場合には、操作 1 と操作 2 を繰り返し、IgG 量が 50 ~ 200 µg となるように調整する。溶液に他のタンパク質や SH 基を有する化合物が混在する場合は、精製により除去していただきたい。

b) 溶液がメンブレン上に残っている場合は、更に 8,000 x g で 5 分間遠心する。

c) Reducing Agent がキャップの内側に付着している場合があるので、開封にはご注意ください。

d) SH-Reactive Alkaline Phosphatase は Reaction Buffer 中では不安定なので、溶解後は直ちに操作 8 を行う。

e) 2 ~ 4 分子の ALP が IgG 1 分子に標識される。通常、未反応の ALP は EIA に影響を及ぼさない。必要に応じて、ゲルろ過カラムあるいはアフィニティークラム等により精製する。

f) 長期保存する場合は、そのまま -20°C で保存する。