

蛍光色素を標識したい

利用製品

< 少量抗体 (10µg) 標識用 >

- アミノ基標識用 -

Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit [※] [LK32]

Ab-10 Rapid HiLyte FluorTM 555 Labeling Kit [※] [LK35]

Ab-10 Rapid HiLyte FluorTM 647 Labeling Kit [※] [LK36]

Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kit [※] [LK34]

< 抗体・タンパク質 (50-200µg) 標識用 >

- アミノ基標識用 -

Fluorescein Labeling Kit - NH₂ [LK01]

HiLyte FluorTM 555/647/750 Labeling Kit - NH₂ [LK14/15/16]

ICG Labeling Kit - NH₂ [LK31]

R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH₂ [LK23]

Allophycocyanin Labeling Kit - NH₂ [LK21]

- SH 基標識用 -

R-Phycoerythrin Labeling Kit - SH [LK26]

Allophycocyanin Labeling Kit - SH [LK24]

解析装置



※ 本製品の標識操作により、抗体中のアミノ基に標識体が結合します。そのため抗体によっては抗原認識能が失われる場合があります。

ご不明な点は小社カスタマーサポート (Tel:0120-489548) へお問合せ下さい

I はじめに

蛍光法は比色法に比べると、1) 検出感度が高い、2) 広いダイナミックレンジでの定量が可能、であることから、生化学の領域で普及している。中でも蛍光標識抗体を用い特異的に染色した部位の顕微鏡観察や、フローサイトメトリーによる細胞の情報解析等に汎用されるようになっている。標識に用いられる蛍光色素は、FITC、Sulforhodamine 101 acid chloride、Cy dye および Alexa Fluor のような化学合成物質と、phycoerythrin (PE) や allophycocyanin (APC) のような蛍光タンパクに大別される。前者は化学合成品でありかつ低分子化合物であることから、比較的安価に入手できかつ標識後の精製が簡単である。一方後者は、蛍光強度が化学合成物質より数十倍高いため、抗原量の少ない場合の定量が可能である。いずれの場合も、蛍光標識基が過剰に標的化合物に導入されると蛍光消光 (クエンチング) が起こるため、標識条件の最適化が必要である。

小社では、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 Fluorescein, HiLyte FluorTM 555/647, R-Phycoerythrin 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上で行い、3 時間以内に目的の標識体を得ることができる Fluorescein Labeling Kit - NH₂、HiLyte FluorTM 555 Labeling Kit - NH₂、HiLyte FluorTM 647 Labeling Kit - NH₂、HiLyte FluorTM 750 Labeling Kit - NH₂、ICG Labeling Kit-NH₂、Phycoerythrin Labeling Kits および Allophycocyanin Labeling Kits を製品化している。これらのキットを使用した蛍光色素標識体の作製法について紹介する。

蛍光色素

Fluorescein

10 µg 抗体	-NH ₂	Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit
----------	------------------	--------------------------------------

50-200 µg 抗体・タンパク質	-NH ₂	Fluorescein Labeling Kit -NH ₂
--------------------	------------------	---

HiLyte Fluor

10 µg 抗体	-NH ₂	Ab-10 Rapid HiLyte Fluor TM 555 / 647 Labeling Kit
----------	------------------	---

50-200 µg 抗体・タンパク質	-NH ₂	HiLyte Fluor TM 555 / 647 / 750 Labeling Kit -NH ₂
--------------------	------------------	--

ICG

50-200 µg 抗体・タンパク質	-NH ₂	ICG Labeling Kit -NH ₂
--------------------	------------------	-----------------------------------

蛍光タンパク質

R-Phycoerythrin

10 µg 抗体	-NH ₂	Ab-10 Rapid R-Phycoerythrin Labeling Kit
50-200 µg 抗体・タンパク質	-NH ₂	R-Phycoerythrin Labeling Kit -NH ₂
	-SH	R-Phycoerythrin Labeling Kit -SH

Allophycocyanin

50-200 µg 抗体・タンパク質	-NH ₂	Allophycocyanin Labeling Kit -NH ₂
	-SH	Allophycocyanin Labeling Kit -SH

II Ab-10 Rapid Fluorescein, HiLyte FluorTM 555/647, R-Phycoerythrin Labeling Kit によるアミノ基への蛍光色素および蛍光タンパク質標識 (Code: LK32/34/35/36)

1. キット内容

- Reactive reagent
- Reaction Buffer
- Stop Solution

2. キット以外に必要なもの

- 20 µl, 200 µl マイクロピペット、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 reagent 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。

※ 本製品の標識操作により、抗体中のアミノ基に標識体が結合します。そのため抗体によっては抗原認識能が失われる場合があります。ご不明な点は小社カスタマーサポート (Tel:0120-489548) へお問合せ下さい

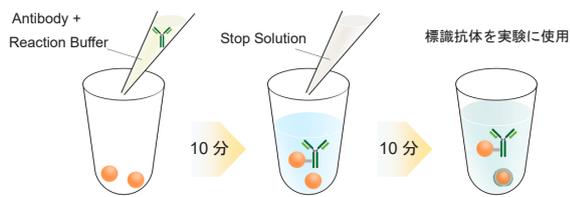


図1 蛍光色素、タンパク質標識の操作

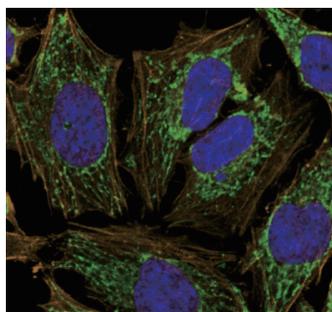
4. 蛍光色素標識抗体での検出例

<アクチン及びミトコンドリアの免疫染色 1>

Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling Kit

Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit

- 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、冷メタノール (脱水、100%) を添加し、直ちに冷凍した。
- 3) -30°C で 15 分間静置した。
- 4) 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。
- 5) 4°C で 1 時間静置した。
- 6) Fluorescein 標識 - 抗ミトコンドリア抗体をブロッキング溶液で 100 倍希釈及び HiLyte Fluor™ 555 標識 - 抗アクチン抗体をブロッキング溶液で 500 倍希釈し、1:1 で混合した。
- 7) 上清を取り除き 6 の溶液を添加した。
- 8) 4°C で一晩静置した。
- 9) 上清を取り除き、PBS-T で 3 回洗浄後、2 μg/ml となるように DAPI 溶液を添加し、室温で遮光下 1 時間静置した。
- 10) 上清を取り除き、PBS-T で 3 回洗浄後、PBS-T を添加した。
- 11) 染色細胞を顕微鏡で観察した。



細胞 : HeLa 細胞
ミトコンドリア (緑) :
Fluorescein 標識抗体
アクチン (黄) :
HiLyte Fluor™ 555 標識抗体
核 (青) : DAPI

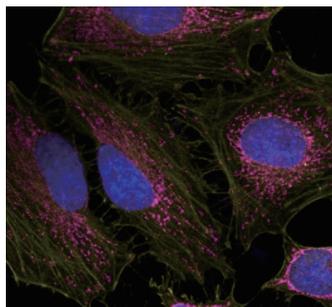
図2 HeLa 細胞のアクチン及びミトコンドリアの免疫染色画像 1

<アクチン及びミトコンドリアの免疫染色 2>

Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit

Ab-10 Rapid HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit

アクチン及びミトコンドリアの免疫染色 1 に従って操作する。



細胞 : HeLa 細胞
ミトコンドリア (赤) :
HiLyte Fluor™ 647 標識抗体
アクチン (黄) :
HiLyte Fluor™ 555 標識抗体
核 (青) : DAPI

図2 HeLa 細胞のアクチン及びミトコンドリアの免疫染色画像 2

<フローサイトメトリー測定例>

- 1) HL60 細胞の細胞懸濁液を 5.0 × 10⁵ cells/tube となるようにマイクロチューブに分注した。
- 2) 1,000 × 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 Fluorescein 標識抗 CD44 抗体 若しくは R-Phycoerythrin 標識抗 CD13 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。
- 5) 氷上で 30 分間静置した。
- 6) 1,000 × g で 2 分間、遠心分離を行い、上清を取り除いた。
- 7) Suspension Buffer を 0.5 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。

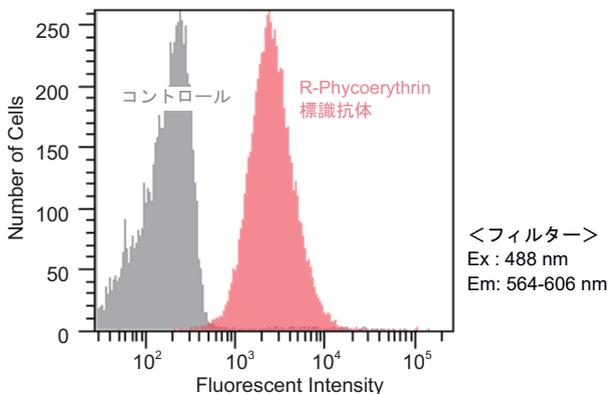
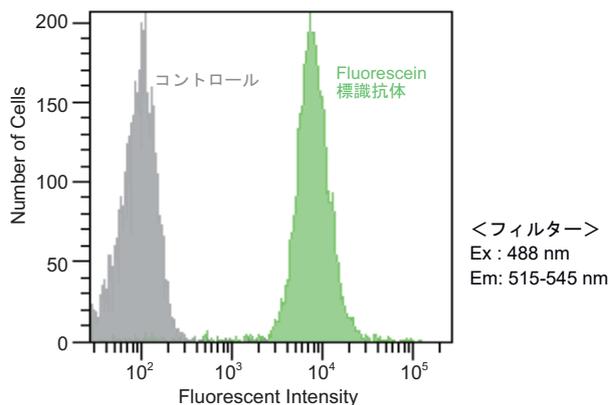


図3 Fluorescein 標識抗体 および R-Phycoerythrin 標識抗体を用いた HL60 細胞の蛍光染色

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

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

III Fluorescein Labeling Kit - NH₂、HiLyte Fluor™ Labeling Kit - NH₂(555, 647, 750) によるアミノ基への標識 (Code: LK01, LK14, LK15, LK16)

1. キット内容

- NH₂-Reactive Fluorescent Dye
- WS Buffer
- Reaction Buffer
- Filtration Tube

2. 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)
- 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)
- DMSO

3. 保存条件

0 ~ 5°Cで保存する。NH₂-Reactive Fluorescent Dye はあらかじめ窒素封入をしているので、外装袋を一旦開封後は、再度窒素封入をして、-20°Cで保存する。

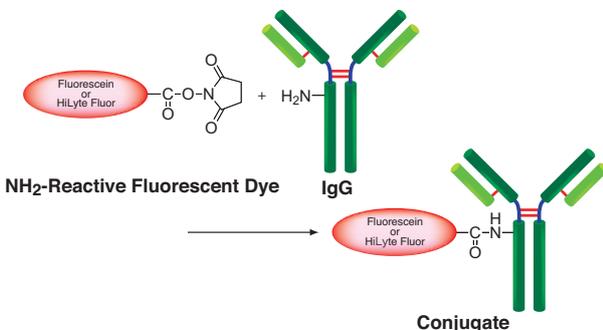


図1 IgG への蛍光色素標識反応

4. 使用上の注意

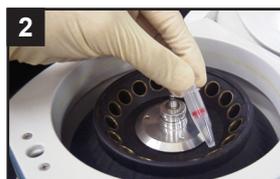
- 分子量が 50,000 以上で、反応性のアミノ基を有するサンプルへ標識することができます。
- 試料溶液中に標識対象以外の分子量 10,000 以上の物質が含まれる場合は、標識反応を阻害する恐れがあります。あらかじめ試料溶液を精製してから、使用する。特に安定化剤としてゼラチンや血清アルブミンなどの高分子が添加されている抗体では、標識反応が阻害されます。このような抗体を使用する場合は、あらかじめアフィニティーカラムなどにより精製を行なって下さい (抗体を精製したいを参照)。
- タンパク質溶液に不溶性の低分子物質が含まれる場合は、遠心して上清のみを標識反応に用いて下さい。冷蔵保存中もしくは室温に戻した際に、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

Immunoglobulin G (IgG) への標識例



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、ピペティングにより軽く混合する^{a)}。



8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。



NH₂-Reactive Fluorescent Dye に 10 µl の DMSO を加え、ピペティングにより溶解する^{c)}。



Reaction Buffer 100 µl を加えた後、NH₂-Reactive Fluorescent Dye を含む DMSO 溶液 8 µl^{d)} を Filtration Tube のメンブレン上に加える。



ピペ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。



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。



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。



WS Buffer 200 µl を Filtration Tube に入れ、10 回程度ピペティングし、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。

- サンプル溶液量は 100 µl 以下で使用する。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 となるようにする。
- 溶液がメンブレン上に残っている場合は、さらに 5 分間遠心する。
- NH₂-Reactive Fluorescent Dye はチューブの底に入っているため、DMSO を加える際はチューブの底に入れ、軽くピペティングして溶解させる。また、NH₂-Reactive Fluorescent Dye 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 へ進む。
- タンパク質 200 µg に標識する場合、NH₂-Reactive Fluorescent Dye 溶液は 10 µl 全量を加える。
- 標識体を回収する際は WS Buffer を使うことを推奨するが、必要に応じて各種の溶液の使用も可能である。

6. 標識率の決定

タンパク 1 分子あたりに標識された蛍光色素の数 (標識率) を算出したい場合は蛍光標識タンパク質溶液を中性の緩衝液で 5 倍に希釈し、280 nm と各蛍光試薬の極大吸収波長の吸光度を測定する。標識率は次式で計算できる。IgG の場合は ϵ として 216,000 を使用すること。蛍光試薬の WS Buffer 中でのモル吸光係数は表 1 を参照いただきたい。また、蛍光試薬の励起および蛍光スペクトルを図 2 に示す。

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

A_{500} : 500 nm の吸光度

A_{280} : 280 nm の吸光度

ϵ : タンパクの 280 nm のモル吸光係数

$$\text{HiLyte Fluor™ 555/タンパク質の標識率} = \frac{A_{555}/150,000}{(A_{280}-A_{555} \times 0.1)/\epsilon}$$

A_{555} : 555 nm の吸光度

A_{280} : 280 nm の吸光度

ϵ : タンパクの 280 nm のモル吸光係数

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

A_{655} : 655 nm の吸光度

A_{280} : 280 nm の吸光度

ϵ : タンパクの 280 nm のモル吸光係数

$$\text{HiLyte Fluor™ 750/タンパク質の標識率} = \frac{A_{760}/270,000}{(A_{280}-A_{760} \times 0.05)/\epsilon}$$

A_{760} : 760 nm の吸光度

A_{280} : 280 nm の吸光度

ϵ : タンパクの 280 nm のモル吸光係数

表 1 蛍光色素の蛍光特性

	極大吸収 (nm)	モル吸光係数 (ϵ)
Fluorescein	500	60,000
HiLyte Fluor™ 555	555	150,000
HiLyte Fluor™ 647	655	250,000
HiLyte Fluor™ 750	760	270,000

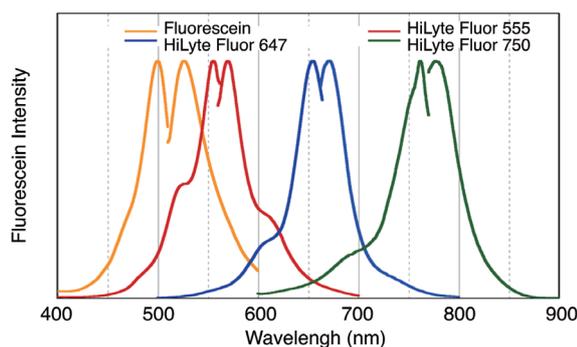


図 2 各蛍光標識体の励起・蛍光スペクトル

IV ICG Labeling Kit-NH₂ によるアミノ基への標識 (Code: LK31)

1. キット内容

- NH₂-Reactive ICG
- WS Buffer
- Reaction 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)
- DMSO
- PBS

3. 保存条件

NH₂-Reactive ICG はアルミラミジップに入っており、一旦開封した後の未使用の NH₂-Reactive ICG 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 で保存する。NH₂-Reactive ICG 以外は、0 ~ 5°C で保存する。

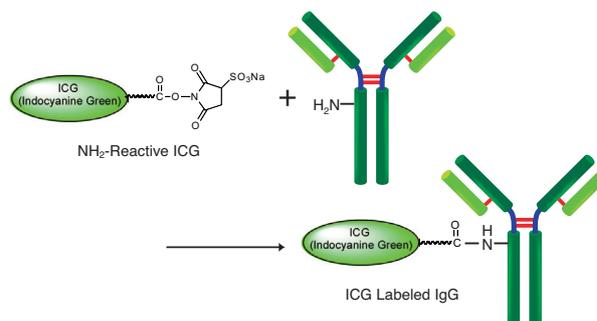


図 3 IgG のアミノ基への蛍光タンパク標識反応

4. 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下さい。
- 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。
- 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

Immunglobulin G (IgG) への標識



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



2 8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。



3 NH₂-Reactive ICG に 10 μ l の DMSO を加え、ピペティングにより溶解する^{c)}。



4 Filtration Tube のメンブレン上に Reaction Buffer 100 μ l を加えた後、NH₂-Reactive ICG を含む DMSO 溶液 8 μ l^{d)} を加える。

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 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。



6 WS Buffer 100 μl を Filtration Tube に入れ、8,000 x g で 15 分間遠心する^{b)}。遠心後、ろ液を捨てる。



7 WS Buffer 200 μl を Filtration Tube に入れ、8,000 x g で 15 分間遠心する^{b)}。この操作をもう一度繰り返す。



8 PBS 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。

- 100 μl 以下の液量を使用すること。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、タンパク質量が 50 ~ 200 μg となるようにする。
- 溶液がメンブレン上に残っている場合は、さらに 5 分間遠心する。
- NH₂-Reactive ICG はチューブの底に入っているため 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する。また、NH₂-Reactive ICG 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 へ進むこと。
- タンパク質 200 μg に標識する場合、NH₂-Reactive ICG 溶液は 10 μl 全量を加える。
- 標識体を回収する際は PBS の他、必要に応じて各種の溶液を使用すること。

6. 標識率の決定

$$\text{ICG/タンパク質の標識率} = \frac{A_{800}/147,000}{(A_{280} - A_{800} \times 0.075) / \epsilon}$$

A₈₀₀: 800 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
* IgG の場合は ε として 216,000 を使用すること。

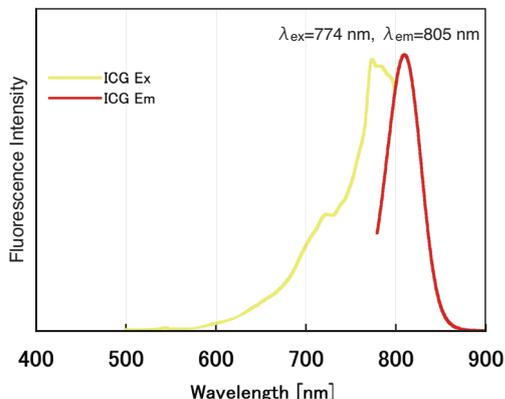


図 4 励起・蛍光スペクトル

7. ICG ラベル抗体を用いたマウス皮下腫瘍の蛍光観察

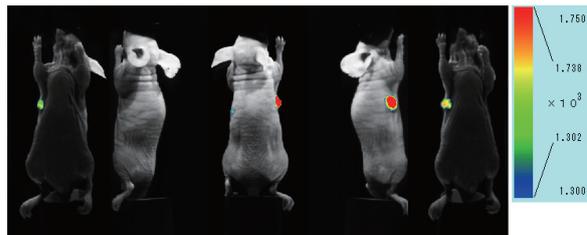


図 5 尾静注により ICG ラベル抗体 50 μg 投与 (投与 48 時間後に測定) *in vivo* 光イメージング装置 (Clairvivo OPT; 島津製作所) を用いて蛍光観察。

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

V R-Phycoerythrin Labeling Kit - NH₂、Allophycocyanin Labeling Kit - NH₂ によるアミノ基への標識 (Code: LK23, LK21)

1. キット内容

- NH₂-Reactive Phycobiliprotein
- WS Buffer
- Reaction Buffer
- Filtration Tube

2. 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)
- 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 Phycobiliprotein は外装袋を一旦開封後は -20°C で保存する。

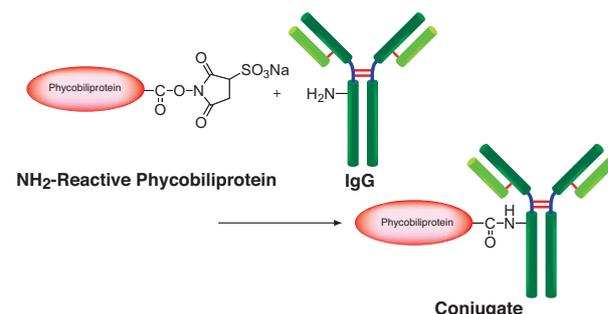


図 6 IgG のアミノ基への蛍光タンパク標識反応

4. 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使用して下さい。特に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。このような抗体を使用する場合は、あらかじめアフィニティーカラムなどによる精製が必要です (抗体を精製したいを参照)。

- ・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。
- ・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

Immunoglobulin G (IgG) への標識例



1 IgG 50 ~ 200 µg を含むサンプル溶液^{a)}と WS Buffer 100 µl を Filtration Tube に加える。



2 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 WS Buffer 100µl を Filtration Tube に加える。



4 8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。



5 Reaction Buffer 10 µl を NH₂-Reactive Phycobiliprotein に加え、ピペッティングにより溶解する^{c)}。



6 NH₂-Reactive Phycobiliprotein を含む溶液を IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上加える。



7 ピペッティングによりメンブレン上の IgG とよく混合した後、37°C で 2 時間反応する。



8 WS Buffer 190 µl を加えて、10 回程度ピペッティングし、標識体を回収する^{d)}。マイクロチューブに移し、0 ~ 5°C で保存する^{e)}。

- サンプルの溶液は 100 µl 以下で使用する。IgG 濃度が 0.5 mg/ml 以下の場合には、操作 1 と 2 を繰り返して IgG 量が 50 ~ 200 µg となるように濃縮する。
- 溶液がメンブレン上に残っている場合は、さらに 8,000 x g で 5 分間遠心する。
- NH₂-Reactive Phycobiliprotein は水分により加水分解しやすいので、Reaction Buffer に溶解後は直ちに操作 6 に進む。
- 1 ~ 2 分子の Phycobiliprotein が IgG 1 分子に標識される。未反応の Phycobiliprotein が残るため、フローサイトメトリーではバックグラウンドが上昇することがある。必要に応じてゲルろ過カラムやアフィニティカラムで精製する。
- 冷凍で長期保存する場合には、等量のグリセロールを添加し、-20°C で保存する。

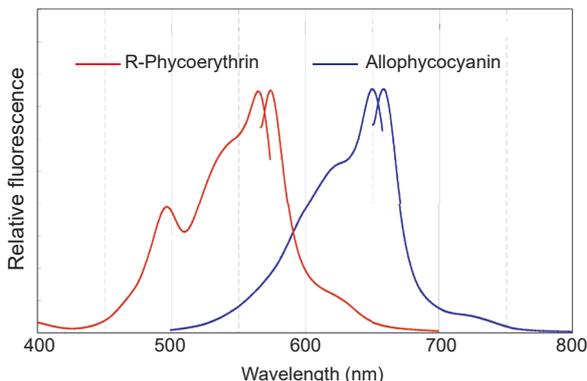


図 7 R-Phycoerythrin および Allophycocyanin の励起・蛍光スペクトル

(注：縦軸は相対蛍光強度で、蛍光タンパク間の蛍光強度の比較したものではありません。同一グラフ上に表すために蛍光強度を変えてプロットしてあります)

VI R-Phycoerythrin Labeling Kit-SH、Allophycocyanin Labeling Kit-SH による SH 基への標識 (Code: LK26, LK24)

1. キット内容

- ・ SH-Reactive Phycobiliprotein
- ・ Reducing Agent
- ・ RA Solution
- ・ WS Buffer
- ・ Reaction Buffer
- ・ Filtration Tube

2. 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)
- ・ 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)

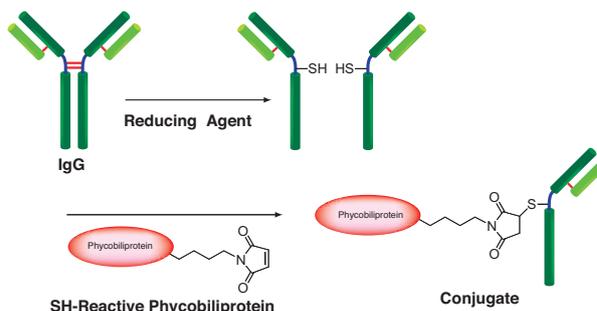


図 8 IgG の SH 基への蛍光タンパク標識反応* (* ヒンジ部分以外の SS 結合が還元される場合もある。)

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

3. 保存条件

0 ~ 5°Cで保存する。SH-Reactive Phycobiliprotein 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

- ・分子量が 50,000 以上で、ジスルフィドまたは SH 基を有するサンプルへ標識することができます。SH 基を有するサンプルでは、還元操作 (操作 3- 操作 6) を省略できます。
- ・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から、使用して下さい。特に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るので、あらかじめアフィニティーカラムなどによる精製を行って下さい (抗体を精製したいを参照)。
- ・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。
- ・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

Immunoglobulin G (IgG) への標識 (反応は図 3 参照)



IgG 50 ~ 200 µg を含むサンプル溶液と WS Buffer 100 µg を Filtration Tube に加える^{a)}。



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)}。



WS Buffer 150 µl を Reducing Agent に加え、ボルテックスして溶解する。



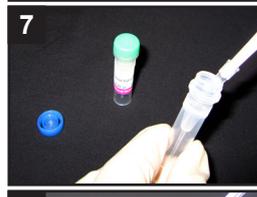
操作 3 の溶液 100 µl を IgG が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上加える。



ピペッティングによりメンブレン上の IgG と混合した後、37°C で 30 分間反応する。



RA Solution 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、RA Solution 200 µl を加え、さらに遠心する^{b)}。



Reaction Buffer 50 µl を SH-Reactive Phycobiliprotein に加え、ピペッティングにより溶解する^{c)}。



操作 7 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。



ピペッティングによりメンブレン上の還元 IgG と混合した後、37°C で 1 時間反応する。



WS Buffer 150 µl を加え、10 回程度ピペッティングし、標識体を回収する^{d)}。溶液をマイクロチューブに移し、0 ~ 5°Cで保存する^{e)}。

- サンプルの液量は 100 µl 以下で使用する。IgG 濃度が 0.5 mg/ml 以下の場合には、操作 1 と 2 を繰り返して IgG 量が 50 ~ 200 µg となるように濃縮する。
- 溶液がフィルター上に残っている場合は、さらに 8,000 x g で 5 分間遠心する。
- SH-Reactive Phycobiliprotein は Reaction Buffer 中で不安定である。溶解後は直ちに操作 8 に進む。
- 1~2 分子の Phycobiliprotein が IgG 1 分子に標識される。未反応の Phycobiliprotein が残るため、フローサイトメトリーではバックグラウンドが上昇することがある。必要に応じて、精製を行うこと。
- 長期保存する場合には、標識体溶液に等量のグリセロールを添加し、50% グリセロール溶液として、-20°Cで保存する。