

はじめに

Peroxidase Labeling Kit - NH₂は、アミノ基を有する分子にペルオキシダーゼを標識するためのキットです。NH₂-Reactive Peroxidaseは、活性エステル基を導入したペルオキシダーゼです。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。低分子化合物にペルオキシダーゼを標識する場合、未反応の低分子化合物は付属の Filtration Tubeを用いて容易に除去することができます。また、IgGのような高分子タンパクにペルオキシダーゼを標識する場合、ペルオキシダーゼ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など）は、Filtration Tubeを用いた前処理によって除去されます。本キットには標識に必要なすべての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ます。

キット内容

- NH₂-Reactive Peroxidase ... 100 µg x 3
- Reaction Buffer 200 µl x 1
- Filtration Tube 3 tubes
- Washing Buffer 4 ml x 1
- Storage Buffer 4 ml x 1

保存条件

0～5℃で保存してください。ご購入後、未開封の状態でも6ヶ月間安定です。

注意

NH₂-Reactive Peroxidase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 Peroxidase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℃で保存してください。*NH₂-Reactive Peroxidase以外は、0～5℃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
- インキュベーター (37℃)
- 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)

使用上のご注意

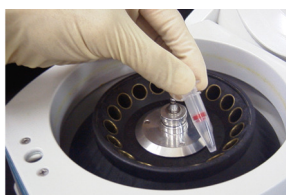
- 以下のサンプルへ標識することができます。
 - ・ アミノ基を有するタンパク質 (分子量50,000以上; 標識タンパク量: 50-200 µg)
 - ・ アミノ基を有する低分子化合物 (分子量5,000以下)
- 試料溶液中に標識対象以外の分子量10,000以上の物質が含まれる場合は、標識反応を阻害する恐れがあります。あらかじめ試料溶液を精製して、ご使用ください。
- 試料溶液に不溶性の低分子物質が含まれる場合は、遠心して上清のみを標識反応に用いてください。

プロトコール 1

Immunoglobulin (IgG)への標識



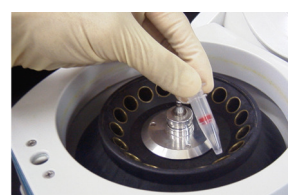
操作1.
IgG 50～200 µgを含むサンプル溶液^{a)}とWashing Buffer 100 µlをFiltration Tubeに加える。



操作2.
ピペティングにより軽く混合した後、8,000 × gで10分間遠心する^{b)}。



操作3.
Washing Buffer 100 µlをFiltration Tubeに加える。



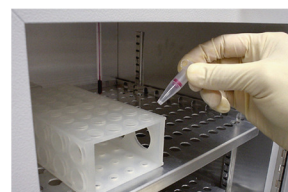
操作4.
8,000 × gで10分間遠心する^{b)}。



操作5.
Reaction Buffer 10 µlをNH₂-Reactive Peroxidaseに加えて、ピペティングにより溶解する^{c)}。



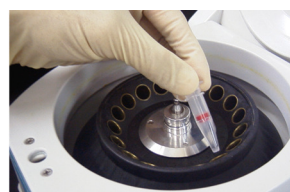
操作6.
NH₂-Reactive Peroxidaseを含む溶液をIgGが濃縮されているFiltration Tubeのメンブレン上加える。



操作7.
ビベ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℃で2時間反応する。



操作8.
Washing Buffer 100 µlをFiltration Tubeに加える。



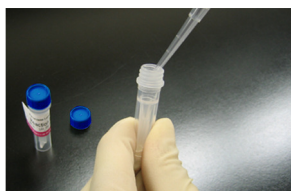
操作9.
8,000 × gで10分間遠心する^{b)}。



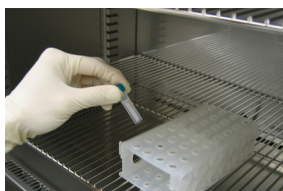
操作10.
Storage Buffer 200 µlを加えて、10回程度ピペティングし、標識体を回収する^{d)}。マイクロチューブに移し、0～5℃で保存する^{e)}。

- ^{a)} 量は100 µl以下でご使用ください。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となるように濃縮してください。
- ^{b)} 溶液がメンブレンに残っている場合は、さらに8,000 × gで5分間遠心してください。
- ^{c)} NH₂-Reactive PeroxidaseはReaction Buffer中で不安定です。Reaction Bufferに溶解後は直ちに操作6へ進んでください。
- ^{d)} 1～3分子のペルオキシダーゼがIgG1分子に標識されます。未反応のペルオキシダーゼは通常のイムノアッセイには影響を及ぼしません。希釈してご使用ください。精製が必要な場合には、ゲルろ過カラムあるいはIgGのアフィニティーカラムにより精製を行ってください。
- ^{e)} 標識体を回収する際は、Storage Bufferのご使用を推奨しますが、必要に応じて各種の溶液をご使用ください。

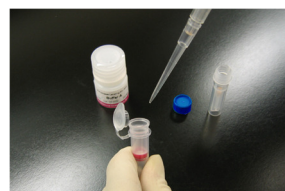




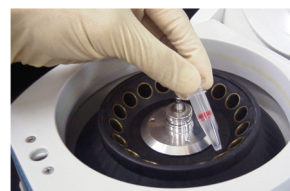
操作1.
Reaction Bufferで調製した1 mmol/l サンプル溶液 50 μl を、NH₂-Reactive Peroxidaseに
加える。



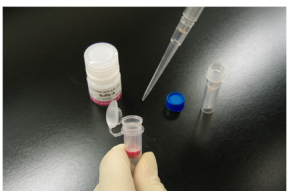
操作2.
ピペッティングによりNH₂-
Reactive Peroxidaseを溶解した
後、37℃で1時間反応する。



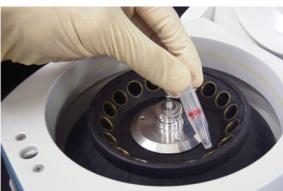
操作3.
Washing Buffer 100 μlを反応溶
液に加え、この溶液をFiltration
Tubeに移す。



操作4.
8,000 × gで10分間遠心する^{b)}。



操作5.
ろ液を捨てた後、Washing
Buffer 200 μlを加える。



操作6.
8,000 × gで10分間遠心する^{b)}。
再度、Washing Buffer 200 μlを
加えて、8,000 × gで10分間遠心
する^{b)}。



操作7.
Storage Buffer 200 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℃で保存
する^{e)}。

^{a)} サンプルがReaction Bufferに溶解しない場合、DMSOを用いて10 mmol/lの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 サンプル溶液としてください。サンプル以外にアミノ基を有する物質（トリスやグリシンなど）が含まれる場合には取り除いてください。

^{b)} 溶液がメンブレン上に残っている場合には、さらに8,000 × gで5分間遠心してください。

^{c)} ペルオキシダーゼ1分子に対し、1～2分子の低分子化合物が標識されます。

^{d)} 標識体を回収する際は、Storage Bufferのご使用を推奨しますが、必要に応じて各種の溶液をご使用ください。

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る場合があります。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ーカラムなどにより精製してご使用ください。精製法について、ご不明な点がございましたらお問い合わせください。

◆ ペルオキシダーゼ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Goat IgGに標識した場合、4℃で2ヶ月間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℃で保存してください。

◆ 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ペルオキシダーゼを標識することができますか？

分子量が5,000以下で、反応性のアミノ基を持っていれば標識できます。
-低分子化合物への標識-のプロトコールに従ってください。

◆ 使用できるIgG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は50～200 μgの場合と比較して、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。

◆ NH₂-Reactive Peroxidaseは標識反応の間にオリゴマーを形成しますか？

NH₂-Reactive Peroxidaseのアミノ基はすべて保護されていますので、オリゴマーは形成されません。

<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



人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社