

はじめに

HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH₂は、アミノ基を有するタンパク質、特に抗体へHiLyte Fluor™ 555色素を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NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 555は、その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します。タンパク質にHiLyte Fluor™ 555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 HiLyte Fluor™ 555は付属のFiltration Tubeを用いて容易に除去することができます。HiLyte Fluor™ 555標識IgGの場合、蛍光波長は $\lambda_{ex/em}$ =555/570 nmです。本キットには、標識に必要なすべての試薬と作製したHiLyte Fluor™ 555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

- NH ₂ -Reactive HiLyte Fluor™ 555	3 tubes
- WS Buffer	4 ml x 1
- Reaction Buffer	500 μ l x 1
- Filtration Tube	3 tubes

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1年間安定です。

注意

NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 555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 HiLyte Fluor™ 555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 HiLyte Fluor™ 555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 μ l, 200 μ l マイクロピペッター
- インキュベーター (37℃)
- 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

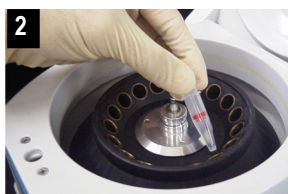
使用上のご注意

- 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、ご使用ください。
- 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ください。

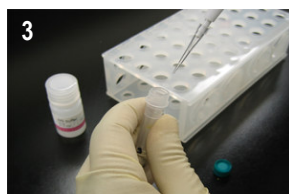
プロトコール



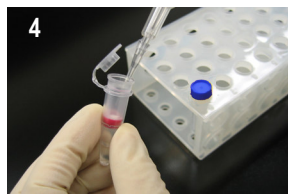
タンパク質 50~200 μ gを含むサンプル溶液とWS Buffer 100 μ lをFiltration Tubeに入れ、ピペティングにより軽く混合する^{a)}。



8,000 x gで10分間遠心する^{b)}。



NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 555に10 μ lのDMSOを加え、ピペティングにより溶解する^{c)}。



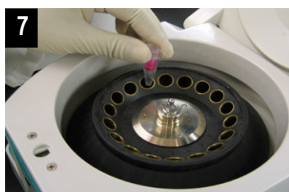
Filtration Tubeのメンブレン上にReaction Buffer 100 μ lを加えた後、NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 555を含むDMSO溶液8 μ l^{d)}を加える。



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℃で10分間反応させる。



WS Buffer 100 μ l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 μ l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 μ l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℃で保存する。

- a) 100 μ l以下の液量を使用してください。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 μ gとなるようにしてください。
- b) 溶液がメンブレン上に残っている場合は、さらに5分間遠心してください。
- c) NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 555はチューブの底に入っています。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てください。また、NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 555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へ進んでください。
- d) タンパク質 200 μ gに標識する場合、NH₂-Reactive HiLyte Fluor™ 555 溶液は10 μ l全量を加えてください。
- e) 標識体を回収する際はWS Bufferを使うことを推奨しますが、必要に応じて各種の溶液をご使用ください。またFiltration Tubeのメンブレンが未反応の色素によって着色されることがありますが、WS Bufferで十分にピペティングすれば、標識体は90%以上回収されています。



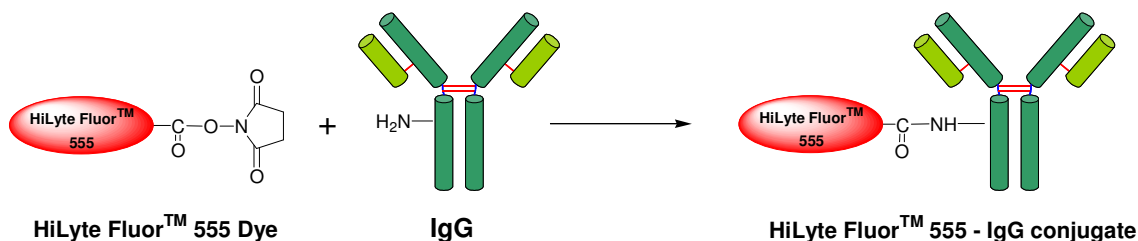
標識率の決定

タンパク1分子あたりに標識されたHiLyte Fluor™ 555の数（標識率）を算出したい場合はHiLyte Fluor™ 555標識タンパク質溶液を中性の緩衝液で5倍に希釈して280 nm, 555 nmの吸光度を測定してください。標識率は次式で計算できます。IgGの場合はεとして216,000を使用してください。HiLyte Fluor™ 555のWS Buffer中でのモル吸光係数は150,000です。

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

A₅₅₅: 555 nmの吸光度
A₂₈₀: 280 nmの吸光度
ε: タンパク質の280 nmでのモル吸光係数

標識反応



Q & A

- ◆ このキットを使って、どのようなタンパク質にHiLyte Fluor™ 555を標識することができますか？
分子量が50,000以上で、反応性のアミノ基を持っていれば標識できます。
- ◆ 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。精製方法につきまして御不明な点がございましたらお問い合わせください。
- ◆ タンパク質 1 分子あたりにHiLyte Fluor™ 555はいくつ導入できますか？
導入数はタンパク質中の反応性のアミノ基の数に依存します。Rabbit IgGの場合、1分子あたり3個から7個導入されます。
- ◆ HiLyte Fluor™ 555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Rabbit IgGに標識した場合、4℃で2ヶ月は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。
- ◆ 使用できるタンパク質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、その後のアッセイで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。
- ◆ 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HiLyte Fluor™ 555をラベル化することはできますか？
オリゴヌクレオチドやペプチドは、Filtration Tubeのメンブレンフィルター孔より分子量が小さく、メンブレンフィルター上に保持することができないため、ラベル化することはできません。
- ◆ 蛍光標識したタンパクを生細胞へ添加したいのですが、注意点はありますか？
細胞状態をより安定に保つため、生細胞懸濁液を調製する際は、2-10% FBSを含むPBSを用いることをお勧めします。
- ◆ 標識体を回収するWS bufferは、生細胞へ影響しませんか？
WS buffer中には、細胞毒性を殆ど示さない量の安定化剤（界面活性剤）を含んでいます。もし細胞への影響が気になる場合は、別途任意のbufferを用いて標識体を回収してください。

<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

HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit - NH₂