

はじめに

B-Phycoerythrin Labeling Kit - SHは、SH基を有する高分子(抗体など)にB-フィコエリスリンを標識するためのキットです。SH-Reactive B-Phycoerythrinは、その構造内にマレイミド基を有しているため、SH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。標的分子がSH基を有しておらず、分子内にS-S結合を有している場合には、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す。

本キットには、標識に必要なすべての試薬と作製したB-フィコエリスリン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

- SH-Reactive B-Phycoerythrin	3 tubes	- Reducing Agent	3 tubes
- RA Solution	1 ml × 1	- Reaction Buffer	200 μ l × 1
- WS Buffer	4 ml × 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6ヶ月間安定です。

注意

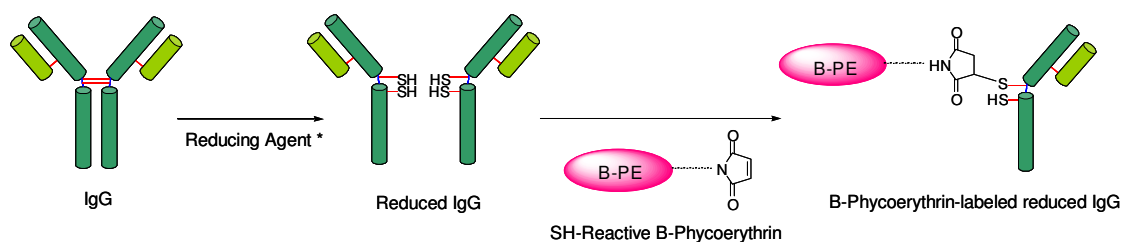
SH-Reactive B-Phycoerythrinは、アルミラミジップに3本入っています。アルミラミジップを一旦開封した後は、未使用のSH-Reactive B-Phycoerythrinは、アルミラミジップに入れたまま、チャックをしっかりと閉め、-20℃で保存してください。*SH-Reactive B-Phycoerythrin以外は、0～5℃で保存してください。

必要なもの
(キット以外)

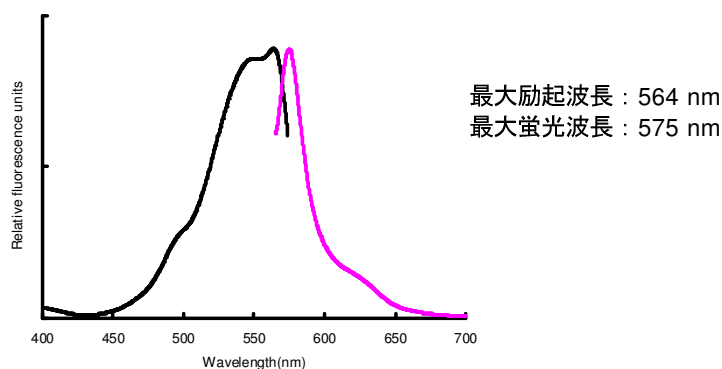
- 10 μ l, 200 μ l マイクロピペッター
- インキュベーター (37℃)
- 遠心機 (マイクロチューブ用)
- マイクロチューブ (標識体保存用)

使用上のご注意

- 分子量が50,000以上で、S-S結合またはSH基を有するサンプルへ標識することができます。SH基を有する場合、還元操作(操作3～6)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、ご使用ください。
- Reducing Agentは、IgGへの標識用として最適化されています。IgG以外のS-S結合を有するサンプルをご使用になる場合は、S-S結合の切断によって標識対象分子の活性が失われる場合がありますので、検討が必要です。
- 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。



※Reducing Agentによる還元反応ではIgGのヒンジ部分以外も還元される場合があります。



B-Phycoerythrin標識タンパクの励起・蛍光スペクトル





操作1.
IgG 50~200 μ gを含む試料溶液とWS Buffer 100 μ lをFiltration Tubeに加える^{a)}。



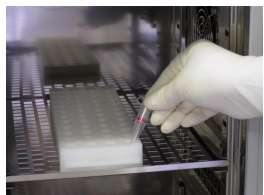
操作2.
ピペティングにより軽く混合した後、8,000 $\times$ gで10分間遠心する^{b)}。



操作3.
WS Buffer 150 μ lをReducing Agentに加えて、ピペティングして溶解する。



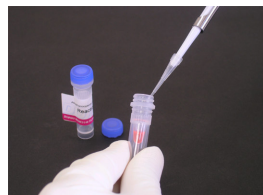
操作4.
操作3の溶液100 μ lをIgGが濃縮されているFiltration Tubeのメンブレン上加える。



操作5.
ピペティングによりメンブレン上のIgGと混合した後、37℃で30分間反応する。



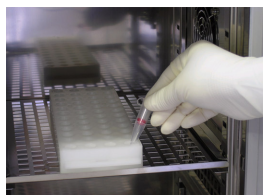
操作6.
RA Solution 100 μ lを加え、8,000 $\times$ gで10分間遠心する^{b)}。ろ液を捨てた後、RA Solution 200 μ lを加え、さらに遠心する^{b)}。



操作7.
Reaction Buffer 50 μ lをSH-Reactive B-Phycoerythrinに加えて、ピペティングにより溶解する^{c)}。



操作8.
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。



操作9.
ピペティングによりメンブレン上の還元IgGと混合した後、37℃で1時間反応する。



操作10.
WS Buffer 150 μ lを加え、10回程度ピペティングし、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℃で保存する^{e)}。

- a) 量は100 μ l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 μ gとなるように濃縮してください。
- b) 溶液がメンブレン上に残っている場合は、さらに8,000 $\times$ gで5分間遠心してください。
- c) SH-Reactive B-PhycoerythrinはReaction Buffer中で不安定になります。溶解後は直ちに操作8へ進んでください。
- d) 1~2分子のフィコエリスリンが還元IgG 1分子に標識されます。また、回収した標識体には未反応のB-フィコエリスリンが残るので、イムノアッセイにおいてバックグラウンドへの影響が考えられます。バックグラウンドを低減する必要がある場合は、ゲルろ過カラムやアフィニティークラムなどにより精製を行ってください。
- e) 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、-20℃で保存してください。

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ク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ご相談ください。

◆ 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 μ gでの使用を推奨しておりますが、10 μ gでも標識は可能です。ただし、10 μ gのタンパク質を標識する場合は50~200 μ g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。

◆ ペプチドなどの低分子物質を標識することはできますか？

分子量が5,000以下で反応性のSH基を持っていれば標識できます。操作1でサンプルをFiltration Tubeに入れた後、還元反応を省略して、操作7から行ってください。この場合、他のチオール化合物を含まないようにしてください。分子量が5,000以上50,000以下の場合はご相談ください。

◆ 保存していた標識体が沈殿を生じましたが、使用できますか？

沈殿が生じた場合は、標識体を遠心分離 (10,000 $\times$ g, 10分間) し、上清をご使用ください。

◆ 蛍光標識したタンパク質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、生細胞に影響しませんか？

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

B-Phycoerythrin Labeling Kit - SH