

はじめに

ICG Labeling Kit - NH₂ は、アミノ基を有するタンパク質、特に抗体へ ICG (Indocyanine green) を標識するためのキットです。ICG は肝機能検査のための色素負荷試験にも用いられているシアニン色素で、近赤外領域に蛍光を持ちます。励起波長は 774 nm 付近、蛍光波長は 805 nm 付近であり、生体内で用いた場合でも、ヘモグロビンなどによる妨害を受けにくいという蛍光特性があり、近赤外蛍光を利用した蛍光内視鏡や *in vivo* 蛍光イメージングへの応用が期待されています。キット付属の NH₂-Reactive ICG 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 ICG 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 ICG は付属の Filtration Tube を用いて容易に除去することができます。

キット内容

	【1 sample】	【3 samples】
- NH ₂ -Reactive ICG	1 tube	3 tubes
- WS Buffer	1.5 ml × 1	4 ml × 1
- Reaction Buffer	250 µl × 1	500 µl × 1
- Filtration Tube	1 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

アルミラミジップを一旦開封した後は、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℃で保存してください。NH₂-Reactive ICG 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℃)
- DMSO
- 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)
- PBS

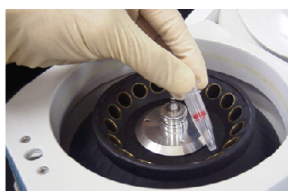
使用上のご注意

- 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。
- 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。
- 冷蔵保存中もしくは室温に戻した際に、Filtration Tube に水適様の液粒が見られることがあります。これはメンブラ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ございません。
- 本キットには溶液の入ったマイクロチューブのコンポーネントが含まれています。チューブ内壁やキャップに溶液が付着していることがありますので、開封前に振り落としてからご使用ください。

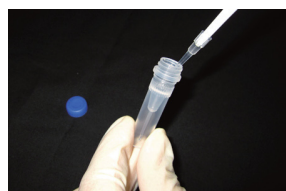
プロトコール



操作 1.
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、ピペッティングにより軽く混合する^{a)}。



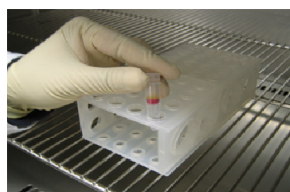
操作 2.
8,000 x g で 10 分間遠心する^{b)}。



操作 3.
NH₂-Reactive ICG に 10 µl の DMSO を加え、ピペッティングにより溶解する^{c)}。



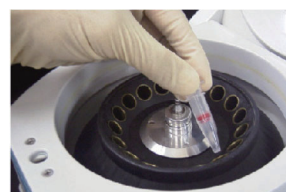
操作 4.
Filtration Tube のメンブレン上に Reaction Buffer 100 µl を加えた後、NH₂-Reactive ICG を含む DMSO 溶液 8 µl^{d)} を加える。



操作 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℃で 10 分間反応させる。



操作 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。



操作 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。



操作 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℃で保存する。

- a) 100 µl 以下の流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、タンパク質量が 50 ~ 200 µg 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 ICG 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、軽くピペッティングして溶解してください。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 へ進んでください。
- d) タンパク質 200 µg に標識する場合、NH₂-Reactive ICG 溶液は 10 µl 全量を加えてください。
- e) 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ご使用ください。

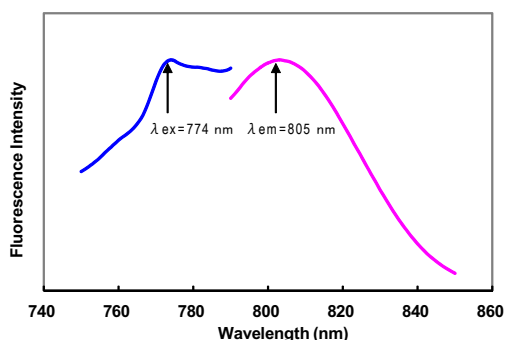
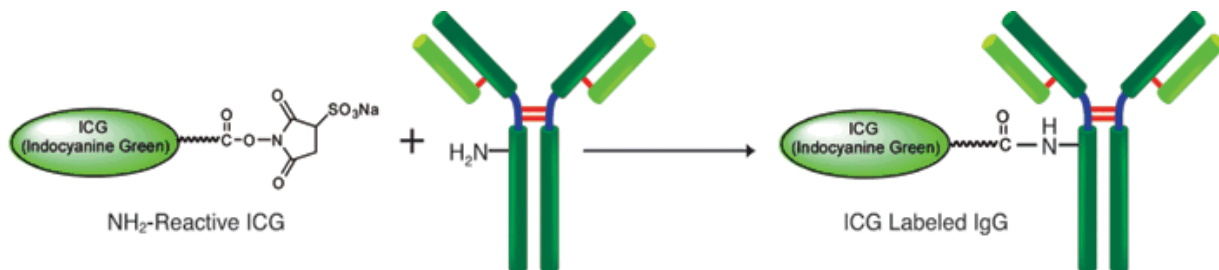
標識率の決定

タンパク質 1 分子あたりに標識された ICG の数(標識率)を算出したい場合は、ICG 標識タンパク質溶液を中性バッファーで 5 倍希釈し、280 nm、800 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。ICG の PBS 中でのモル吸光係数は 147,000 です。

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

A_{800} : 800 nm の吸光度
 A_{280} : 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



ICG の励起スペクトルと蛍光スペクトル

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。
- ◆ **ICG 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。標識体調製後は、なるべく早くご使用ください。長期保存する場合には、少量小分け後、 -20°C で保存することをお勧めします。
- ◆ **タンパク質 1 分子あたりに ICG 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、IgG 1 分子あたり約 1 個の ICG が導入されます。
- ◆ **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 ICG 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。



コスモ・バイオ株式会社

<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