



IST Fluolid-PM タンパク質・抗体用標識キット

IST Fluolid-PM Red	660	タンパク質・抗体ラベル化キット
IST Fluolid-PM Orange	600	タンパク質・抗体ラベル化キット
IST Fluolid-PM Yellow	550	タンパク質・抗体ラベル化キット
IST Fluolid-PM Green	520	タンパク質・抗体ラベル化キット

Contents

IST Fluolid-PM succinimidyl ester DMSO 溶液 20 μ L \times 3
0.2 M Sodium bicarbonate buffer (pH8.3) 240 μ L \times 3

Attention

本製品は研究用試薬です。
色素骨格が分解することはありませんが、活性エステル部位の分解を防ぐために、冷蔵もしくは冷凍下で保存してください。
内容物につきましては、連絡無く変更する場合がございますのでご了承下さい。

Protocol

この標識キットは 0.5 mg の IgG 抗体で最適化されています。

その他のタンパク質・抗体でも同様の操作でご利用が可能です。ただし、標識箇所が著しく低い、もしくは著しく高い場合には、お客様御自身で条件の検討を行うようお願いいたします。

DMSO 濃度を下げて反応させることも可能です。この際、沈殿が生じる場合がございます。基本的には沈殿が生じてもラベル化に支障はありませんが、条件によっては収量に影響する場合がございます。この場合条件を適宜変える必要があります。

なお、本キットと異なる条件でご利用の場合には、お客様御自身で条件の検討を行うよう、お願いいたします。

抗体標識プロトコール

準備するもの

- ・ 0.2M Sodium Bicarbonate buffer pH8.3
- ・ 1 \times TBS buffer (20mM Tris \cdot HCl+137mM NaCl pH7.6)
- ・ 1 \times TBS-T buffer (0.1% Tween20 / 1 \times TBS buffer)
- ・ AmiconUrtra 50 kDa

(1) 抗体溶液の調製

(ア) 500 μ g の抗体を含む抗体溶液(2mg/mL の抗体溶液の場合 250 μ L)を 50kDa の AmiconUrtra を用いて濃縮する(濃縮しすぎないように注意)

(イ) AmiconUrtra を利用して bicarbonate buffer で buffer 交換を行う(200 μ L の buffer を加

えて遠心する操作を 3 回程度繰り返す。濃縮しすぎないように注意)

(ウ) 最終的に 100 μ L 以下になるようにする。

(2) 溶液の混合

1. 総量が 200 μ L 程度になるように bicarbonate buffer を加えピペティングする。
2. Fluolid-PM / DMSO 溶液を 15 ~ 20 μ L 加えて十分にピペティングする。
3. 室温で 1 ~ 2 時間攪拌(または 37 $^{\circ}$ C で 30 ~ 60 分間インキュベート)する。

(3) 標識抗体の洗浄

1. 100 μ L の TBS-T buffer を加え遠心する。
2. 200 μ L の TBS-T buffer を加え遠心する操作を 3 回程度繰り返す。
3. 新しいチューブに AmiconUrtra を逆様に入れ、遠心して反応液を回収する。

(4) 標識抗体溶液の調整

1. 回収した標識抗体溶液を新しい低吸着チューブに量を量って移す。
2. TBS buffer で 200 μ L にメスアップする。

(5) その他

*遠心は 10,000G で 3~5 分間(回収時のみ 2 ~ 3 分間)が基本です。

*必要であれば、2% NaN₃ を加えてください。

*冷凍温度(0 $^{\circ}$ C 以下)で長期保存する場合は、200 μ L の Glycerol を加えてください。

*精製は、必要に応じて、お客様ご自身でサイズ排除を利用した精製を行ってください。

[GE healthcare/amershambioscience Sephadex series (G-25, G-50 など) 、 Bio-Rad Bio Gel P Series (P-6, P-30 など) 、 Millipore Amicon series]

*buffer 交換や洗浄を行う際の buffer は、その都度新しいものをご使用ください。

株式会社 アイエスティー
研究施設

〒816-8580 福岡県春日市春日公園6-1

九州大学 総合研究棟 614号室

TEL. 092-583-8873

E-Mail: info@is-t.co.jp



参考：精製（例）

NAP5 カラムを用いた精製例です。

（ ）精製準備

反応終了の 15-30 分前から、精製に使用する NAP5 カラムの準備を行います。

- (ア) NAP-5 カラムの蓋、コック（出口の蓋）の順で開き、カラム上に入っている溶媒をすべて落とします。
- (イ) 最終 buffer をぎりぎりまで入れ、カラム上の溶媒をすべて落とします。（buffer 交換）
- (ウ) この操作を計 3 回行います。

（ ）精製処理

- (エ) 反応混合溶液を軽く遠心機にかけます（壁面についた溶媒を落とすため）。
- (オ) NAP カラムに反応混合溶液（この場合 500 μ l）を入れ、すべて落ちるのを確認します。
- (カ) サンプル回収用の容器を設置します。
- (キ) 最終 buffer を 1.0ml 入れ、すべて落ちるのを確認します。
 - * はじめの 10 滴程度（約 1/3）は buffer のみが落ちてきますので、11 滴目以降の回収をお勧めします。
 - * NAP の詳しい操作、のせる溶媒量は NAP 付属の資料を確認してください。
 - * 必要であれば、AmiconUrtra などを用いて濃縮してください。

光学特性

(1) 励起波長と蛍光波長（DMSO 中）

Fluolid-PM	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)
Green 520	410	522
Yellow 550	424	546
Orange 600	452	601
Red 660	498	661

測定装置：励起波長 SHIMADZU UV-2600

蛍光波長 SHIMADZU RF-5300pc

(2) フィルター適応表

	励起フィルター（オリンパス）	蛍光フィルター（オリンパス）	DM（オリンパス）
	励起フィルター（Chroma）	蛍光フィルター（Chroma）	DM（Chroma）
Fluolid-PM	BP400-440	BA495-540	DM410
Green 520	ET405/20x	ET535/30m	T425lpxr
Fluolid-PM	BP400-440	BA515-550	DM455
Yellow 550	ET420/40x	ET565/40m	—
Fluolid-PM	BP420-480	—	DM500
Orange 600	ET440/40x	ET605/30m	T510lpxrxt
Fluolid-PM	BP470-495	—	DM505・DM515
Red 660	ET480/40x	ET660/40m	T510lpxrxt

測定装置：励起波長 SHIMADZU UV-2600

蛍光波長 SHIMADZU RF-5300pc

各フィルターは参考です。御使用の際は専門メーカー等に御相談下さい。