Fluorescein Labeling Kit - NH_2 Technical Manual

はじめに

Fluorescein Labeling Kit-NH_2は、アミノ基を有するタンパク質、特に抗体へフルオレセインを標識するためのキットです。キット付属のNH_2-Reactive Fluorescein 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。タンパク質にフルオレセインを標識する場合、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NH_2-Reactive Fluorescein は付属のFiltration Tubeを用いて、容易に除去することができます。フルオレセイン標識IgGの場合、蛍光波長は$\lambda_{ex/em}$＝495/520 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フルオレセイ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

- NH_2-Reactive Fluorescein	3 本
- WS Buffer	4 ml x 1 本
- Reaction Buffer	0.5 ml x 1 本
- Filtration Tube	3 本

保存条件

0〜5℃で保存してください。キットは0〜5℃で1年間安定です。

注）NH_2-Reactive Fluoresceinにはあらかじめ窒素封入されていますので、外装袋を開封後は、再度窒素封入し-20℃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℃)
- 0.5 ml チューブ
- 遠心機（マイクロチューブ用）
- DMSO

プロトコール



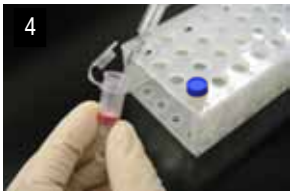
タンパク質 50~200 µgを含むサンプル溶液とWS Buffer 100 µlをFiltration Tubeに入れ、ピペッティングにより軽く混合する[a]。



8,000 x gで10分間遠心する[b]。



NH_2-Reactive Fluoresceinに10 µlのDMSOを加え、ピペッティングにより溶解する[c]。



Reaction Buffer 100 µlを加えた後、NH_2-Reactive Fluoresceinを含むDMSO溶液8 µl[d]をFiltration Tubeのメンブレン上に加える。



ピペッティングによりメンレブレン上のタンパク質と混合した後、37℃で10分間放置する。



WS Buffer 100 µl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 µlをFiltration Tubeに入れ、8,000 x gで10分間遠心する[b]。この操作を再度繰り返す。



WS Buffer 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]。0.5 mlチューブに移し、0〜5℃で保存する。

タンパク質溶液に分子量10,000 以上の物質が含まれる場合は、あらかじめ精製を行ってください。
また、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。

a) 100 µl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、タンパク質量が50〜200 µgとなるようにしてください。
b) 溶液がフィルター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) NH_2-Reactive Fluorescein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させてください。
d) タンパク質 200 µgに標識する場合、NH_2-Reactive Fluorescein 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使用してください。

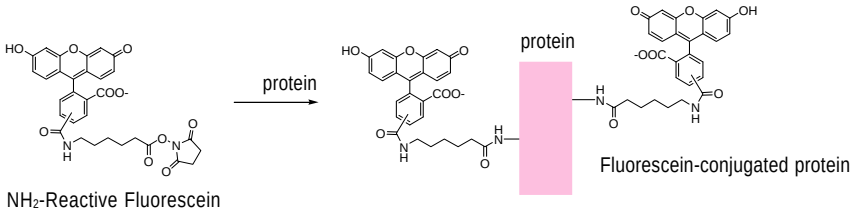
標識率の決定

標識率を算出したい場合はFluorescein標識タンパク質溶液を適当なバッファーで5倍に希釈して280 nm,500 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。

$$\text{Fluorescein/タンパク質の標識率} = \frac{A_{500}\ /60{,}000}{(A_{280} - A_{500} \times 0.22)/(\varepsilon \text{ of protein})}$$

A_{500}: 500 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



NH_2-Reactive Fluorescein

Q & A

◆このキットを使って、どのようなタンパク質にフルオレセイン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。

◆タンパク質１分子あたりにフルイレセインはいくつ導入できますか？
タンパク質が持っているアミノ基の数にもよりますが、Rabbit IgGの場合1分子あたり3個から7個導入できます。

◆フルオレセイン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にフルオレセイン標識した場合、4 ℃で2ヶ月は安定であることを確認しております。ただし、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フルオレセイン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。

＜開発元＞
Dojindo Molecular Technologies, Inc.
211 Perry Parkway, Suite 5, Gaithersburg, Maryland, 20877
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