

一般研究用

# AcidiFluor™ ORANGE Labeling Kit

表1. 製品情報

品番	品名	キット内容	保存条件	安定性
GC304	AcidiFluor™ ORANGE-Labeling Kit	・AcidiFluor™ ORANGE-NHS 5 tubes ・Reaction Buffer 1.5 mL × 1 ・Washing Buffer 10 mL × 1 ・限外ろ過スピナラム 5 tubes	・遮光 -20°C 保存 ・色素開封後は1回使い切り	未開封1年

## 1. はじめに

### ■ AcidiFluor™ ORANGE-NHSについて

AcidiFluor™ ORANGE-NHS (Succinimidyl ester) は、標的となるタンパク質のアミノ基と混合するだけで安定な共有結合を形成する、縮合剤が不要なpHプローブです (図1)。抗体等のタンパク質だけでなく、末端アミノ化を施したオリゴヌクレオチドへの標識も可能です。AcidiFluor™ ORANGE-NHSは標識後も優れたpH応答性を示し、酸性オルガネラ内環境 (pH 5.0) では、生理的pH 7.4と比較して蛍光強度が約20倍に増大します (図2)。本プローブのpH 5.0における吸収極大波長は538 nm、蛍光極大波長は568 nmのオレンジ色の蛍光を発するため、GFPやFluoresceinなどの緑色蛍光、HoechstやDAPIなどの青色蛍光とマルチカラーイメージングが可能です。また、細胞毒性が低く、褪色に強い特徴を持つため、ライブセルイメージングに最適です。AcidiFluor™ ORANGE-Labeling Kitは、標識から精製まで一連の作業に必要な試薬、器具5回分がセットになっています。

※ AcidiFluor™ ORANGE-NHS 1本に、約100 µgの抗体 (150 kDa) 標識に必要な色素量が含まれています。

※ 分子量が30 kDa 以上で、反応性のアミノ基を有するサンプルに標識が可能です。

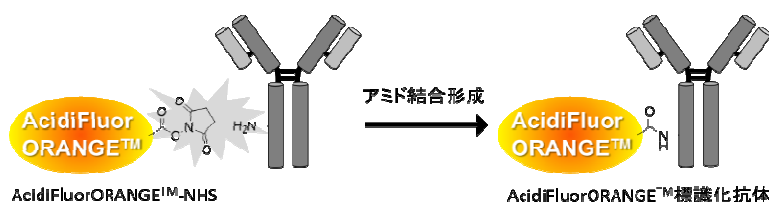


図1. AcidiFluor™ ORANGE-NHSと抗体の反応

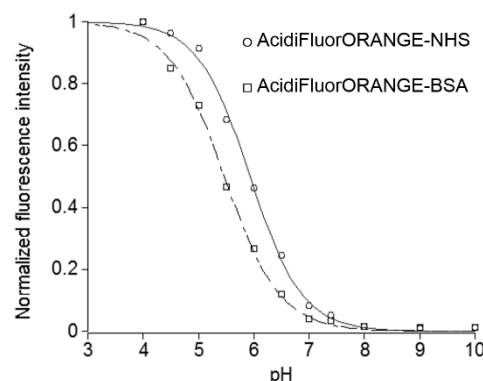


図2. AcidiFluor™ ORANGE-NHSおよび標識BSAのpH依存的な蛍光強度変化

0.1 M リン酸緩衝液 pH 4.0~10で測定。  
 $\lambda_{ex}$  532 nm/ $\lambda_{em}$  568 nm

## 2. タンパク質標識プロトコル

### ■ ご用意頂くもの (キットに含まれないもの)

- ・反応、保存用マイクロチューブ
- ・マイクロピペッター
- ・微量遠心機



## ■ 試薬の調製および蛍光標識方法

- ① 限外ろ過スピカラムにWashing Buffer 200  $\mu$ Lを添加し、5000 g、10分間遠心し、ろ過膜のリンスを行ってください。ろ液は捨ててください。
- ② タンパク質 100  $\mu$ gをReaction Buffer 100  $\mu$ Lに溶解させ、マイクロチューブに移します。※ 溶液中にBSAなどの安定化剤や、他のタンパク質が含まれている場合は反応が阻害される恐れがあるので、あらかじめ試料溶液を精製してから使用してください。
- ③ **AcidiFluor™ ORANGE-NHS**は粉末がキャップなどに付着していることがあります。試薬を室温に戻し、スピンドウンしてから開封してください。
- ④ ②を**AcidiFluor™ ORANGE-NHS**のチューブに直接加え、スピンドウンし、泡立たないように注意しながら色素が完全に溶解するまでピペティングします。
- ⑤ 常温で1時間、暗所で反応させます。20分に1回程度タッピングして攪拌してください。
- ⑥ ①でリンスを行ったスピカラムに反応溶液全量を移し、Washing Buffer 100  $\mu$ Lを加え、5,000 g、5-10分間遠心します。ろ過膜上に多く溶液が残っている場合、さらに3分間遠心を追加してください。ろ液は捨てます。
- ⑦ Washing Buffer 200  $\mu$ Lを加え、5,000 g、5-10分間遠心します。ろ液は捨てます。
- ⑧ ⑥の操作を3回繰り返します。
- ⑨ Washing Buffer 100  $\mu$ Lをスピカラムに加え、ピペティングでろ過膜上のタンパク質を回収してください。

## ■ 標識率の算出

タンパク質1分子あたりに結合する**AcidiFluor™ ORANGE-NHS**の分子数は、次式にて求めることが可能です。

$$\text{標識率} = \frac{A_{551} / \epsilon_{\text{Acidi}}}{(A_{280} - A_{551} \times \text{CF}) / \epsilon_{\text{protein}}}$$

$A_{551, 280}$  : 標識体の551 nm, 280 nmにおける吸光度

CF : Correction Factor (表2参照)

$\epsilon_{\text{Acidi}}$  : **AcidiFluor™ ORANGE-NHS**のモル吸光係数 (表2参照)

$\epsilon_{\text{protein}}$  : IgGの場合、216,000

表2. **AcidiFluor™ ORANGE-NHS**の物性 (pH 7.4)

分子量	pK <sub>a</sub>	Abs max	Flu max	$\epsilon$	CF
935.74	5.3, 6.8	551 nm	571 nm	62,300	0.24

※ **AcidiFluor™ ORANGE-NHS**はpHにより物性が異なります。Washing bufferはpH 7.4であるため、表2に従い標識率を算出してください。蛍光観察は酸性オルガネラ内環境 (pH 5.0) の検出を想定しており、観察方法は下記の「蛍光観察」項を参考にしてください。

## ■ 蛍光観察

励起波長は532 nmまたは514 nmが適当です。蛍光波長はおよそ568 nmをピークに検出されます。用いるフィルタは、Cy3, TRITC (Nikon社) もしくはU-FGWA, U-FGW (Olympus社) 等が最適です。

## ■ 保存

色素は窒素封入、乾燥状態で冷凍出荷しております。入荷後は乾燥した冷暗所 (−20 °C以下) に保存してください。



■ 関連試薬

【GC301】AcidiFluor™ ORANGE (10 µg × 20)

【GC302】AcidiFluor™ ORANGE-NHS (1 mg)

【GC305】AcidiFluor™ ORANGE-Zymosan A (1 mg)

【GC306】AcidiFluor™ ORANGE-Dextran 10k (1 mg)

【GC309】AcidiFluor™ ORANGE-Transferrin (1 mg)