

一般研究用

Indocyanine Green Labeling Kit

表1. 製品情報

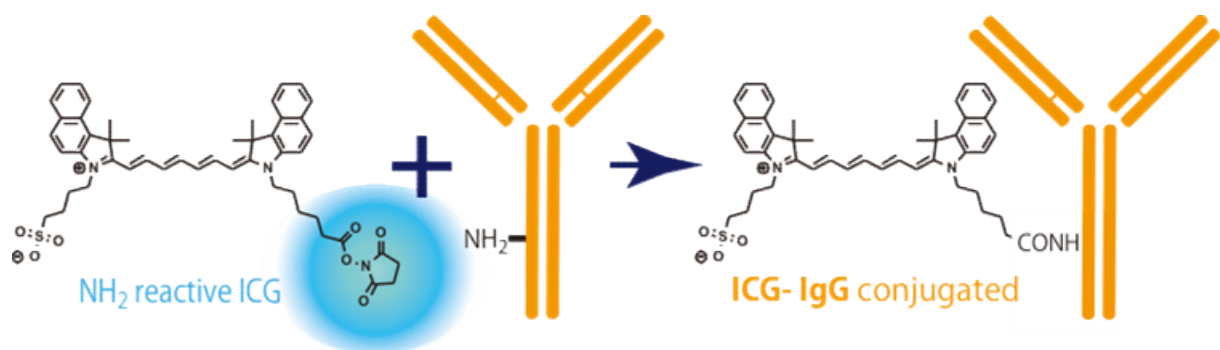
品番	品名	キット内容	保存条件	安定性
IM118	Indocyanine Green Labeling Kit	<ul style="list-style-type: none"> ・Indocyanine Green-NHS × 5 ・Dimethylsulfoxide 500 μL × 1 ・Reaction Buffer 1.5 mL × 1 ・Washing Buffer 10 mL × 1 ・限外ろ過スピンカラム × 5 	遮光-20°C保存。 DMSO溶解後は 1回使い切り。	未開封 1年

1. はじめに

■アミン反応性プローブについて

Indocyanine Green-NHS (succinimidyl ester) は、タンパク質等のアミノ基に結合する、縮合剤が不要な近赤外プローブです。抗体等のタンパク質だけでなく、ペプチド等への標識も可能です。本キットは、Indocyanine Greenの標識から精製までの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。Indocyanine Green-NHS 1 本には、約300 μ g の IgG 等タンパク質へのラベル化に最適な量が含まれています。

注意：分子量 30 kDa 以下のサンプルには使用できません。



2. タンパク質ラベル化プロトコル

■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 限外ろ過スピンカラムに Washing Buffer 200 μ L を添加して 10000 g で 5 分間遠心し、ろ過膜のリンスを行う。ろ液は捨てる。
- ② タンパク質 100 μ g を Reaction Buffer 100 μ L に溶解させ、マイクロチューブに移す。
 - * 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 反応直前に、Indocyanine Green-NHS に DMSO 30 μ L を加え、ピペティングでよく溶解させる。
 - * アミン反応性色素はDMSO中では不安定であるため、溶解後は直ちに次のステップにお進みください。

- ④ ②のタンパク質溶液に①の Indocyanine Green-NHS 溶液 10 μL を加え、ピペッティングでよく混合した後、1 時間暗所・37 $^{\circ}\text{C}$ で反応させる。
 - ⑤ ①でリンスを行ったスピнкаラムに、反応溶液全量を移す。
 - ⑥ さらに Washing Buffer 200 μL を加え、10000 g で 5 分間遠心する。ろ過膜上に溶液が残っている場合、さらに5分間遠心を行う。
 - ⑦ ろ液を捨て、⑥の操作を 3 回繰り返す。
 - ⑧ Washing Buffer 100 μL をスピнкаラムに加え、ピペッティングでろ過膜上のタンパク質を回収する。タンパク質溶液は、新しいマイクロチューブに移し、4 $^{\circ}\text{C}$ で保存する。
- * Washing Buffer 以外の適切な buffer を用いても問題ありません。

■ラベル化の確認

電気泳動後の蛍光検出により確認可能です。

3. 標識率の算出

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

$$\text{標識率} = \frac{A_{800} / \epsilon_{\text{Indocyanine Green}}}{(A_{280} - A_{800} \times \text{CF}) / \epsilon_{\text{protein}}}$$

$A_{800, 280}$: 標識体の 800 nm、280 nm における吸光度

CF : Correction Factor

0.075

$\epsilon_{\text{Indocyanine Green}}$: Indocyanine Green 標識体の PBS 中でのモル吸光係数
147,000

$\epsilon_{\text{protein}}$: 標識タンパク質 のモル吸光係数
IgG (whole) の場合、216,000