

HMSiR-NHS

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
A208-01	HMSiR-NHS	100 µg	湿気を避け、遮光冷凍保存 DMSO 溶解後は使い切り	未開封で約 1 年

1. はじめに

■ HMSiR-NHS について

HMSiR は超解像イメージング専用開発された蛍光プローブです。超解像イメージングの中でも 1 分子局在化法 (single molecule localization microscopy) に分類される STORM や PALM に適した、自発的に明滅する蛍光プローブです。従来の色素に必要なチオールや強力なレーザー照射がなくとも生理的な中性の pH で自発的に明滅するため、染色するだけで超解像イメージングが可能です。HMSiR-NHS は混合するだけでアミノ基と共有結合を形成するため、タンパク質や核酸を簡単に標識することができます。本製品でおよそ 35 nmol (IgG 抗体の場合はおよそ 5 mg) のタンパク質を標識できます。

表 2. 0.1M クエン酸バッファー (pH 3.5) 中での HMSiR の蛍光特性

λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
654	669	1.2×10^5

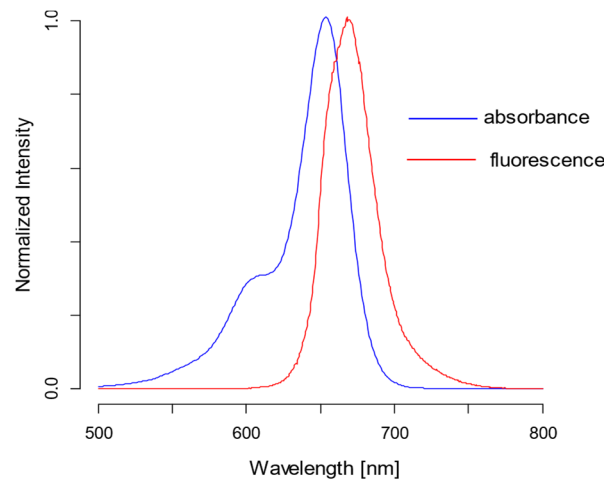
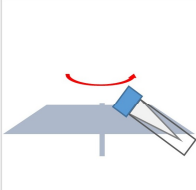

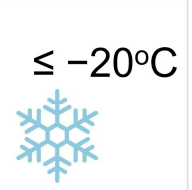

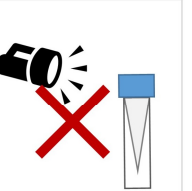


図 1. 吸収、蛍光スペクトル タンパク質に結合させた HMSiR-NHS のスペクトルをクエン酸バッファー (pH 3.5) 中で測定したもの。

				
Spin down before opening.	Do not open the frozen vial.	Store at $\leq -20^{\circ}C$	Keep dry	Store at dark place
開封前に遠心してください	室温に戻してから開封してください	冷凍保存	乾燥保存	暗所保管

2. IgG 抗体の標識例

■ ご用意いただくもの

- ・ 脱水 dimethyl sulfoxide (DMSO)
- ・ 標識バッファー (0.1 M NaHCO₃, pH 8.4)
- ・ 溶出バッファー (PBS pH 7.4, IgG 以外を標識するときは、観察対象物に適したバッファーをご用意ください。)
- ・ タンパク質濃縮用の遠心式限外濾過フィルター (例: Pall Nanosep または Amicon Ultra, MWCO 10K)
- ・ ゲルろ過カラム (例: GE Healthcare 社 NAP-5, NAP-10, NAP-25 など、標識するタンパク質の量に合わせたサイズをご用意ください)
- ・ ブロッキング溶液 PBS pH 7.4 に溶解した 10 mg/mL BSA 溶液

■ 試薬の調製

1. HMSiR-NHS は薄青色の粉末ですが、色が薄いため粉末を目で確認しづらいこともあります。また、輸送中の振動で結晶がキャップに付着していることがありますので、念のためキャップを開ける前にチューブをマイクロ遠心機等で遠心し、粉末をチューブの底に集めてください。
2. 試薬は湿気で反応性が低下します。吸湿を防ぐため、完全に室温に戻してから開封してください。
3. HMSiR-NHS 1 バイアルを DMSO 18 μ L に溶解し、10 mM ストック溶液を作成します。10 回ほどピペティングして十分溶解させてください。均一な薄青色の溶液になります。やや濁りがみられることがありますが、反応には問題がありません。この溶液は使用直前に準備し、すぐにご使用ください。

■ IgG 抗体の標識

1. 遠心式限外濾過フィルターにブロッキング溶液を入れて室温で 15 分間インキュベートしたのち、ブロッキング溶液を取り除き、溶出バッファーで 10 回以上十分に洗浄します。その後、200 μ L の溶出バッファーを入れて遠心し、フィルターを洗っておきます。
2. ゲルろ過カラムの保存液を捨てて、カラムの最大容量 (NAP-5 ゲルろ過カラムの場合、500 μ L) のブロッキング溶液を入れて室温で 15 分間インキュベートしたのち、カラム一杯の溶出バッファーで 10 回以上 (NAP-5 の場合、トータルで 30 mL 以上) 洗浄します。これでカラムの洗浄と平衡化が完了です。
※ ブロッキングは省略可能ですが、ブロッキングによりたんぱく質の回収率を上げることができます。
3. IgG 抗体を遠心式限外濾過フィルターに入れて遠心し、1/10 程度に濃縮します。次に標識バッファーを加えて攪拌し、元の量に戻します。さらに遠心して濃縮し、1.5 mg/mL 以上の濃度になるようにしてください。
4. モル比でタンパク質の 2-3 倍量の HMSiR-NHS を加え、ピペティングでよく混合します。例えば 3 mg/mL の IgG (分子量 150 kDa, 10 nmol) 500 μ L に対して 10 mM HMSiR-NHS を 3 μ L (30 nmol, 3 倍量) 加えます。
5. 遮光して、37°C で 30 分間インキュベートします。ときどきタッピングで攪拌してください。
6. あらかじめ平衡化しておいたゲルろ過カラムに反応液を添加し、溶出バッファーで溶出して抗体と未反応の色素とを分画します。カラムメーカーから提供されているマニュアルに従ってください。
7. このように標識した抗体は通常、標識率が 0.9-1.8 程度となります。1:1 でグリセロールを加え (終濃度 50%) -20°C で凍結させないように保存します。

■ 標識率の計算

HMSiR は中性溶液中で消光（閉環）と蛍光発光（開環）の状態を行き来しているため、酸性溶液中で開環させた状態で定量する必要があります。そのため、以下のように標識率を計算してください。

標識したタンパク質のモル濃度 (C_{prot}) は BCA 法や Lowry 法などで通常通り測定してください。次に HMSiR 標識抗体を pH 3.5 の 0.1 M クエン酸バッファーに 30 倍以上の倍率で希釈し（希釈倍率: d ）、654 nm における吸光度を測定してください。次式に従って HMSiR の標識率を計算することができます。 $\epsilon(654 \text{ nm})$ における HMSiR の分子吸光係数) の値は表 2 を参照してください。

$$\text{標識率} = \frac{dA_{654}/\epsilon}{C_{prot}}$$

■ 蛍光観察

HMSiR の観察には STORM または PALM に対応した顕微鏡が必要です。励起光源は通常の Alexa Fluor® 647 観察時の 30% 程度、647 nm レーザー 100 W/cm² を使用します。用いるフィルタは、692/40 nm band pass emission filter (Semrock) 等が使用できます。Alexa Fluor® 647 を用いる観察に必要な 405 nm のレーザー照射の必要はありません。PBS などの緩衝液中でも観察は可能ですが、より安定した画像取得のため、退色防止剤入りの封入材の使用を推奨します。顕微鏡のマニュアルに従って画像を約 10,000 枚~30,000 枚またはそれ以上取得し、画像処理により超解像イメージを作成します。

■ 保存

色素は窒素封入、乾燥状態で冷蔵出荷しております。入荷後は遮光し -20°C 以下で冷凍保存してください。DMSO 溶解後はすぐにご使用ください。

表 3. 関連製品

型番	品名	主な用途
A201-01	HaloTag® HMSiR Ligand	HaloTag® を付加したタンパク質の超解像イメージングに。
A209-01	HMSiR-maleimide	タンパク質のシステイン残基などに含まれるチオール基を標識可能な超解像イメージングプローブ
A202-01	HMSiR 標識 Goat Anti-Mouse IgG (H&L)	マウス 1 次抗体を用いた超解像イメージング用の免疫染色に
A203-01	HMSiR 標識 Goat Anti-Rat IgG (H&L)	ラット 1 次抗体を用いた超解像イメージング用の免疫染色に
A204-01	HMSiR 標識 Goat Anti-Rabbit IgG (H&L)	ウサギ 1 次抗体を用いた超解像イメージング用の免疫染色に
A308-01	HaloTag® STELLA Fluor™ 650 Ligand	HaloTag® を付加したタンパク質の STED 超解像イメージングなどに。
ST1008-11	STELLA Fluor™ 650 NHS	STED による超解像イメージングなどに（タンパク質などのアミノ基を標識可能な NHS 体）

HaloTag®はプロメガ社の登録商標です。