

一般研究用

AcidiFluor™ ORANGE-NHS

表1. 製品情報

品番	品名	容量	保存条件	安定性
GC302	AcidiFluor™ ORANGE-NHS	1 mg	遮光冷凍保存。 溶解後は使い切り。	未開封で1年
GC303	AcidiFluor™ ORANGE-NHS	5 samples		

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、褪色に強い特徴も持つため、ライブセルイメージングに最適です。

【GC302】AcidiFluor™ ORANGE-NHS 1 mg に対し、約20 mgの抗体 (150 kDa) への標識が可能です。

【GC303】AcidiFluor™ ORANGE-NHS 1本あたり約100 µgの抗体 (150 kDa) に標識することが可能です。

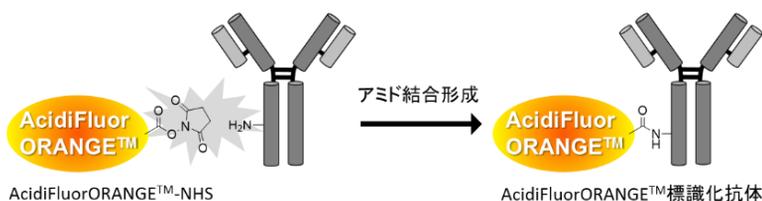


図1. AcidiFluor™ ORANGE-NHSと抗体の反応

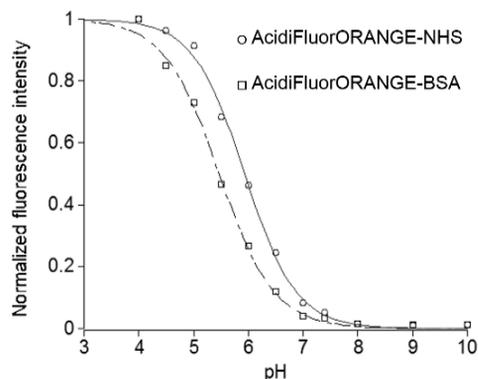


図2. AcidiFluor™ ORANGE-NHSおよび標識BSAのpH依存的な蛍光強度変化

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

2. タンパク質標識プロトコル

■ ご留意頂くもの

・0.1 M sodium bicarbonate バッファー (pH 8.3)

・精製用に以下のいずれかをご用意ください (弊社にて使用可能を確認した方法例)

標識物に合った分子サイズの限外ろ過カラム (ナノセップ®遠心ろ過デバイス オメガメンブレン 10K, PALL社)

または透析チューブ (Normal MWCO12,000-14,000, Fisherbrand社)、あるいはゲルろ過カラム (担体例:

Sephadex G-25)

■ 試薬の調製および蛍光標識方法【GC302】

- ① 限外ろ過スピナラム使用の場合: PBS 200 μ 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。
ゲルろ過カラム使用の場合: PBSで担体の平衡化を行ってください。
- ② タンパク質を 1~5 mg/mLとなるように、0.1 M sodium bicarbonate (pH 8.3) バッファーに溶解させます。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りますので、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 PBS 106.9 μ Lを加えAcidiFluor™ ORANGE-NHSを完全に溶解させ、10 mM ストックとします。溶解後は分注し、遮光、-20 $^{\circ}$ Cで保存してください。
- ④ タンパク質に対し、色素モル当量を5から10となるように色素を加え、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攪拌してください。
- ⑤ ①で前処理した各精製方法で未反応のAcidiFluor™ ORANGE-NHSを除去します。

■ 試薬の調製および蛍光標識方法【GC303】

- ① 限外ろ過スピナラム使用の場合: PBS 200 μ 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。
ゲルろ過カラム使用の場合: PBSで担体の平衡化を行ってください。
- ② タンパク質100 μ gを0.1 M sodium bicarbonate (pH 8.3) バッファー 100 μ l に溶解させます。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りますので、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 ②をAcidiFluor™ ORANGE-NHSのチューブに直接加え、スピンドアウンし、泡立て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。
- ④ 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攪拌してください。
- ⑤ ①で前処理した各精製方法で未反応のAcidiFluor™ ORANGE-NHSを除去します。

■ 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)

ϵ_{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 _a	Abs max	Flu max	ϵ	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。溶出バッファーはPBS pH 7.4を推奨しており、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) の検出を想定しているため、観察方法は下記の「蛍光観察」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)

【GC304】 AcidiFluor™ ORANGE Labeling Kit (5回分)

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

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

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