五稜化薬株式会社

更新日： 2019 年 9 月 3 日

一般研究用試薬

SaraFluor™ 650B-maleimide

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
A209-01	SaraFluor 650B-maleimide	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. SaraFluor 650B-NHS について

SaraFluor 650B (別名 HMSiR) は超解像イメージング専用に開発された深赤色の蛍光プローブです。自発的に明滅する性能を利用して、１分子局在化法（single molecule localization microscopy, SMLM）による超解像イメージングに使用されます。STORM や PALM 用などの顕微鏡システムで、一般的な蛍光色素の明滅を誘導するためのチオールや脱酸素剤の添加および強力なレーザー照射を行うことなく、生理的溶液条件で超解像イメージングを行うことができます。SaraFluor 650B-maleimide は混合するだけでチオール基と共有結合を形成するため、タンパク質やその他の高分子等を簡単に標識することができます。

※本製品は従来 HMSiR-NHS として販売していたものと同一です。

表 2. 0.1M クエン酸バッファー (pH 3.5) 中での SaraFluor 650B の蛍光特性

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

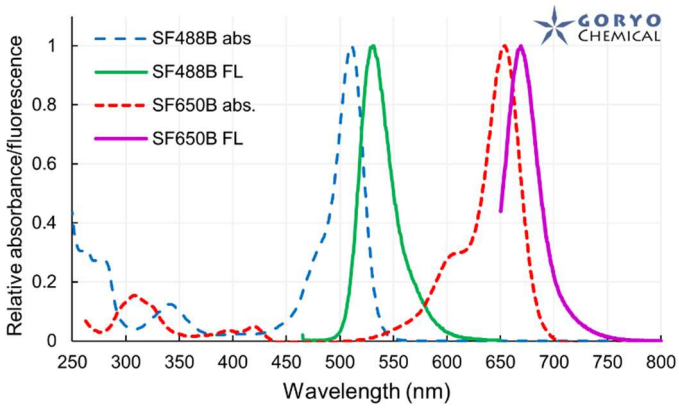

図 1 . SaraFluor B のスペクトル。

■ 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。溶液で保存した試薬の活性は保証しておりません。

2. IgG 抗体の標識例

■ ご用意いただくもの

- 脱水ジメチルスルホキシド (DMSO)
- TCEP-HCl などの還元剤（DTT や 2-メルカプトエタノールなども使用可）
- リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) もしくは標識タンパク質に適したバッファー溶液。
- タンパク質濃縮用の遠心式限外ろ過フィルター(例: Pall Nanosep または Amicon Ultra など、タンパク質分子量の 1/3－1/6 の MWCO をお選びください。)
- ゲルろ過カラム (例: GE Healthcare 社 NAP-5, NAP-10, NAP-25 カラムなど、標識するタンパク質の量および分子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)
- 透析膜（DTT または 2-メルカプトエタノールを使用する場合。アズワン微量透析キット 12－14kDa などが使用可）

■ 試薬の調製

1. 輸送中の振動等で試薬がキャップや壁面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、試薬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. SaraFluor 650B-maleimide 1 バイアルを DMSO 17 µL に溶解し、10 mM ストック溶液を作成します。10 回ほどピペッ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 5 回以上十分に洗浄します。その後、200 µL 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、カラムの説明書に従い平衡化を充分に行います。
   ※ 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。

タンパク質の精製および、濃縮・溶液交換

1. 標識したいタンパク質溶液を確認してください。充分に精製されていないタンパク質や、安定化剤として BSA など別のタンパク質が混在している場合は、精製が必要です。それぞれのタンパク質の性質によって適切な精製方法が異なります。タンパク質に適した精製方法をご検討ください。例えば IgG の場合は、Protein A または Protein G を使用したアフィニティ精製法が多く使われています。その他溶液にチオール基を持つ低分子が含まれている場合には、溶液交換が必要です。スピンカラムや NAP-5 などのゲルろ過カラム、もしくは透析によりチオール基を持つ物質を十分に取り除いてください。
2. 標識したいチオールが-S-S- 結合を形成している場合は標識できません。あらかじめ還元して -SH にしておく必要があります。例えば標識したい物質 10 µM の溶液に、終濃度 0.1 mM の TCEP-HCl（もしくは 0.1 mM DTT または 2-メルカプトエタノールのいずれか。標識したい物質の 10－100 倍の濃度を目安とします）を加えて 4℃で 30 分以上反応させ、標識したい物質を充分に還元してください。これらの還元剤は標識を阻害しますので、還元後は充分に透析を行い、還元剤を除去してください。（ただし、TCEP-HCl の場合、透析は不要です。）組み換えタンパク質を精製直後に標識する場合は、タンパク質精製を 0.2－1 mM DTT 存在下で行い、精製の最終段階において DTT なしのバッファー溶液で精製用カラムから溶出し、すぐ標識するといった方法も使われます。また、適切な還元の程度はタンパク質によって異なります。タンパク質本来の活性を保つ適切な還元剤濃度をあらかじめご検討ください。
3. 精製したタンパク質の濃度を測定し、遠心式限外ろ過フィルターで 1－3 mg/mL 程度まで濃縮します。タンパク質の濃度測定には、280 nm の吸光度 (A_{280}) から式 1 を用いてタンパク質の濃度 ($C_{protein}$) を算出するのが簡便です。

五稜化薬株式会社

$$C_{\text{protein}} = \frac{A_{280} \times MW_{\text{protein}}}{\varepsilon_{protein}} \quad \text{(式 1)}$$

$MW_{protein}$: タンパク質の分子量。IgG の場合は 150,000 g/mol, BSA の場合は 66,400 g/mol

$\varepsilon_{protein}$: タンパク質の 280 nm におけるモル吸光係数。IgG の場合は 216,000 $M^{-1}cm^{-1}$, BSA の場合は 43,800 $M^{-1}cm^{-1}$

タンパク質の標識

1. モル比で色素がタンパク質の 5－10 倍量となるように、色素をタンパク溶液に添加し、ピペッティングでよく混合します。
2. 遮光して、37℃で 30 分－1 時間、もしくは 4℃ で一晩（12－18 時間程度）インキュベートします。
3. 平衡化しておいたゲルろ過カラムに反応液を添加し、PBS または適切なバッファーで溶出してタンパク質と未反応の色素を分画します。各分画の A_{280} 測定によりタンパク質濃度を求めてから、タンパク質のある分画のみを回収します。後に続く未結合色素の分画が含まれないように注意してください。
   ※ タンパク質の分子量やゲルろ過カラムの仕様により、溶出条件が異なります。ゲルろ過カラムの説明書などに従ってください。
4. 標識したタンパク質を 4 ℃で保存します。もしくは、終濃度 50% のグリセロールを加えて－20℃で凍結させないように保存する方法、または終濃度 10% の sucrose を加えて液体窒素で凍結後、－80℃で保存する方法も一般的に行われています。タンパク質に合わせた適切な方法をご検討ください。

■ 標識率の計算

SaraFluor 650B 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 SaraFluor 650B 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 SaraFluor 650B の標識率を計算することができます。ε（654 nm における SaraFluor 650B の分子吸光係数）の値は表 2 を参照してください。

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

■ 蛍光観察

SaraFluor 650B の観察には STORM または PALM に対応した顕微鏡が使用できます。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/cm^2 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数百枚から数万枚取得し、画像処理により超解像イメージを作成します。

■ 参考文献

S.N. Uno, M. Kamiya, T. Yoshihara, K. Sugawara, K. Okabe, M.C. Tarhan, H. Fujita, T. Funatsu, Y. Okada, S. Tobita, Y. Urano (2014) *Nat. Chem.* **6**: 681-689. DOI:10.1038/nchem.2002

F.C. Chien, C.Y. Linb, G. Abrigoa (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**: 27245-27255. DOI:10.1039/C8CP02942C

五稜化薬株式会社

表 3．関連製品

型番	品名	主な用途
A201-01	HaloTag® SaraFluor 650B Ligand	HaloTag® を付加したタンパク質の超解像イメージングに。
A202-01	SaraFluor 650B goat anti-mouse IgG	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	SaraFluor 650B goat anti-rat IgG	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	SaraFluor 650B goat anti-rabbit IgG	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
A208-01	SaraFluor 650B-NHS	タンパク質のリジン残基などに含まれるアミノ基を標識可能な超解像イメージングプローブ
A218-01	SaraFluor 488B-NHS	488 nm レーザー励起により自発的に点滅する緑色の蛍光色素。SaraFluor 650B と併用することで超解像 2 色イメージングに。
A308-01	HaloTag® SaraFluor 650T 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。

HaloTag®はプロメガ社の登録商標です。

五稜化薬株式会社
〒060-0008　北海道札幌市中央区北 8 条西 18-35-100 エアリービル 5 F
TEL: 011-624-5860　URL: https://www.goryochemical.com/