

SaraFluor™ 488B-NHS

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
A218-01	SaraFluor 488B-NHS	100 µg	湿気を避け、遮光冷凍保存	未開封で約 1 年

1. SaraFluor 488B-NHS について

SaraFluor 488B (別名 HEtetTFER) は超解像イメージング専用開発された緑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、生理的溶液条件下で超解像イメージングを行うことができます。この試薬は混合するだけでアミノ基と共有結合を形成する NHS 体のため、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 5.5–11 nmol (IgG 抗体の場合はおよそ 0.8–1.6 mg) のタンパク質を標識できます。

この蛍光色素は SaraFluor 650B (別名 HMSiR) と比較してやや点滅頻度が低いため、抗体を標識する場合は標識率が高め (3–5) になるように標識することを推奨します。

表 2. SaraFluor 488B の物性

λ_{ex} (nm) ^{*1}	λ_{em} (nm) ^{*2}	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^{*3}
507	530	80,000

*1 励起最大波長

*2 蛍光最大波長

*3 励起最大波長におけるモル吸光係数

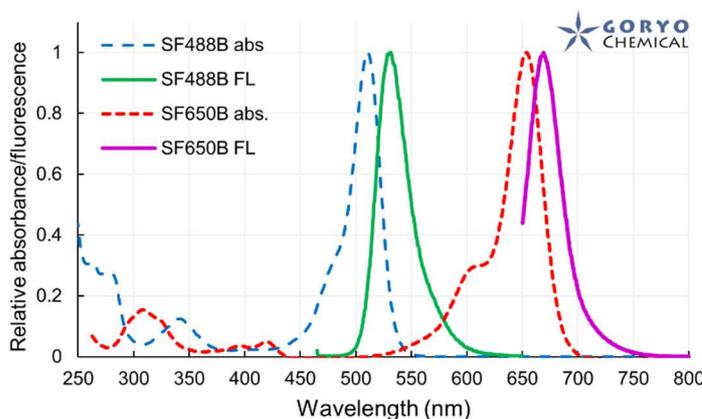


図 1. SaraFluor B のスペクトル

■ 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 溶解後は使い切ってください。溶液で保存した試薬の活性は保証しておりません。



2. タンパク標識例

■ ご用意いただくもの

1. 無水ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide, anhydrous)
2. 0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (NaHCO₃, pH 8.4)
3. 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。
4. 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。)
5. 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。)
6. 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. 輸送中の振動等で試薬固体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、朱色(黄色みのある赤色)の試薬をチューブの底に集めてください。
2. 本製品は湿気に触れると分解され、反応性が低下します。吸湿を防ぐために、完全に室温に戻してから開封し、試薬を使用する直前に溶解してください。

※ SaraFluor 488B-NHS 100 µg を DMSO 11 µL に溶解し、10 mM ストック溶液を作成します。10 回ピペティングして十分溶解させてください。溶液は均一な朱色となります。

■ IgG 抗体の標識例

標識前の準備

1. 遠心式限外ろ過フィルターにブロッキング溶液を入れてから、室温で 15 分インキュベートしたのち、ブロッキング溶液を取り除き、PBS で 10 回以上十分に洗浄します。その後、200 µL の PBS 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、カラムの説明書に従い平衡化を充分に行います。
3. 標識したい抗体溶液の成分を確認してください。十分に精製されていないタンパク質や、安定化剤としての 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。

抗体の場合は、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。また、Tris バッファーなどの 1 級アミンが含まれている溶液にタンパク質が溶解されている場合は、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、1 級アミンの含まれないバッファー溶液に交換してください。

抗体の濃縮・溶液交換

1. 精製したタンパク質の濃度を測定し、抗体溶液を遠心式限外ろ過フィルターに入れてから、体積が 1/10 程度となるように、遠心で濃縮します。
2. 遠心式限外ろ過フィルターでタンパク質を 10 倍程度に濃縮したのち、0.1 M NaHCO₃ (pH 8.4) バッファーを加えて、元の体積に戻します。抗体濃度が 2 mg/mL 以上となるように、さらに遠心で濃縮します。
IgG の濃度測定には、280 nm の吸光度 (A₂₈₀) から式 1 を用いて算出するのが簡便です。

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

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

ε_{protein} タンパク質の 280 nm におけるモル吸光係数。IgG の場合は 210,000 M⁻¹cm⁻¹

※ 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.4) バッファー中では安定性が低いタンパク質もあるため、適宜溶液条件を検討するとともに、バッファー置換後は手早く操作を行ってください。

抗体標識

標識率が 3–5 となるよう、以下のように標識を行います。

1. モル比でタンパク質の 10–20 倍量となるように、色素を抗体溶液に添加し、ピペティングでよく混合します。例えば 3 mg/mL の IgG 100 µL (分子量 150 kDa として 2 nmol) に対して、10 mM SaraFluor 488B-NHS DMSO 溶液を 4 µL (40 nmol, 20 倍量) 加え、ピペティングでゆっくり攪拌してください。
2. 遮光し、4°C で 1 晩 (12–18 時間程度) インキュベートします。(室温または 37 °C で 1–3 時間標識も一般的ですが、標識率が低めになる傾向があります。)
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。

※ 分画についてはゲルろ過カラムの説明書に従ってください。

標識率の計算

SaraFluor 488B-NHS 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、正確な定量のためには酸性溶液中で完全に開環させて吸光度を測定する必要があります。以下のように標識率を計算してください。

1. タンパク質濃度を評価するため、280 nm の吸光度 (A_{280}) を測定するか、またはブラッドフォード法でタンパク質濃度 (C_{protein} , mg/mL) を求めてください。
2. SaraFluor 488B 標識抗体を 0.1–1 規定（バッファー濃度の 10 倍以上。PBS の場合は 0.1 規定）塩酸に 30 倍以上の倍率で希釈し（希釈倍率: d ）、507 nm における吸光度 (A_{507}) を測定してください。ブラッドフォード法でタンパク質濃度を求めた場合は式 2 に、 A_{280} を測定した場合は式 3 に従って標識率を計算することができます。このとき、 CF_{280} の値として 0.07 を使用してください。

$$\text{標識率} = \frac{A_{507} \times d \times MW_{\text{protein}}}{\epsilon_{\text{dye}} \times C_{\text{protein}}} \quad (\text{式 2})$$

$$\text{標識率} = \frac{A_{507} \times d \times \epsilon_{\text{protein}}}{(A_{280} - A_{507} \times d \times CF_{280}) \times \epsilon_{\text{dye}}} \quad (\text{式 3})$$

3. 標識した抗体を遮光し 4 °C 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 °C で凍結させないように保存したり、または終濃度 10% の sucrose を加えて液体窒素で凍結後、-80 °C で保存する方法も一般的に行われています。

■ 観察方法

SaraFluor 488B の観察には STORM または PALM に対応した顕微鏡を使用するのが便利です。その他の 1 分子イメージングが可能な光学系でも観察できます。染色時の抗体濃度 5–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を目安に細胞染色を行ってください。励起光源は 488 nm レーザーが適切です。目安として 250 W/cm^2 前後の照明を使用してください。蛍光フィルターは Alexa Fluor® 488, ATTO 488, FITC 用などが使用できます。一般的な蛍光分子のスウィッチングに必要な 405 nm のレーザー照射は不要です。STORM または PALM 用の顕微鏡の場合、取扱説明書に従い画像を数百枚から数万枚程度取得し、画像処理により超解像画像を作成してください。ImageJ と ThunderSTORM 等のソフトウェアでも画像処理が可能です。

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（赤色レーザー励起）
A202-01	SaraFluor 650B goat anti-mouse IgG	マウス由来の 1 次抗体を用いた超解像イメージング用の免疫染色に（赤色レーザー励起）
A203-01	SaraFluor 650B Goat anti-rat IgG	ラット由来の 1 次抗体を用いた超解像イメージング用の免疫染色に（赤色レーザー励起）
A204-01	SaraFluor 650B Goat anti-rabbit IgG	ウサギ由来の 1 次抗体を用いた超解像イメージング用の免疫染色に（赤色レーザー励起）
A208-01	SaraFluor 650B-NHS	タンパク質や抗体などのアミノ基の標識に（赤色レーザー励起）
A209-01	SaraFluor 650B-MLI	マレイミドによる、タンパク質のシステイン残基等に含まれるチオールの標識に（赤色レーザー励起）
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（赤色レーザー励起）

Alexa Fluor® は ThermoFisher Scientific 社の、HaloTag® はプロメガ社の登録商標です。