

AcidiFluor™ ORANGE-NHS

表 1. 製品情報

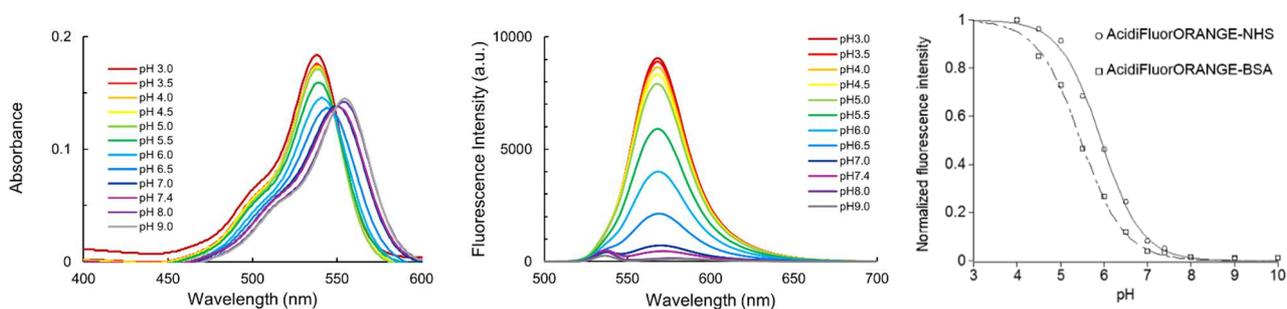
品番	品名	容量	保存	安定性
GC302	AcidiFluor ORANGE-NHS	1 mg	湿気を避け、遮光冷凍保存	未開封で1年
GC303		5 µg × 5		

1. AcidiFluor ORANGE-NHS について

AcidiFluor ORANGE-NHS は N-ヒドロキシサクシミドエステルを介してタンパク質等のアミノ基（1級アミン）を標識できる酸性 pH 感受性蛍光プローブです。標識後も優れた pH 応答性を示し、酸性オルガネラ環境（pH 5.0）では、生理的環境（pH 7.4）と比較して蛍光強度が約 20 倍に増大し、pH 3 以下で最も明るい蛍光を示します（ $E_{X_{max}}$

544 nm, $E_{m_{max}}$ 565 nm, $\epsilon = 80,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, QY. = 0.7)。蛍光強度の変化は可逆的で、細胞毒性が低く褪色が遅いため、pH の時間変化の追跡も可能です。

GC302 AcidiFluor ORANGE-NHS 1 mg を用いると、10 – 50 mg の抗体が標識できます。GC303 はおよそ 100 µg の抗体を標識できる量（5 µg）ずつ分注された製品です。



各 pH での吸収及び蛍光スペクトルと、BSA に結合させたときの pH 応答性 (λ_{ex} 532 nm/ λ_{em} 568 nm)

■ 保存

色素は窒素封入し冷凍出荷しています。入荷後は暗所にて冷凍保存し、吸湿を避けてください。また試薬は室温に戻してから開封してください。まれに試薬が蓋などに付着していることがあるため、キャップを開ける前に卓上遠心機などでスピンドウンし、試薬を底に集めてください。



2. 抗体標識プロトコル例

■ ご用意いただくもの

- ・ 0.1 M 炭酸水素ナトリウム (pH 8.3)
- ・ 脱水したジメチルスルホキシド (DMSO)
- ・ 精製用ゲルろ過カラム (NAP-5, GE Healthcare など、または透析膜、限外濾過カラム)

■ 試薬の調製および蛍光標識

1. タンパク質を 2–10 mg/mL となるように、0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液に溶解してください。BSA など他のタンパク質が含まれている場合や、Tris、グルタチオンなどのアミンを含んだ溶液中では反応が阻害されるため、あらかじめ精製やバッファー置換を行ってください。
2. **GC302** (1 mg バイアル) の試薬の場合、DMSO 107 μ L を加えてピペティング等でよく混和し、10 mM 溶液を作成します。この DMSO 溶液を前記のように準備した標識したい抗体のモル量に対して 2倍から5倍量添加し、すみやかにピペティングで均一になるように混ぜてください。**GC303** の場合、DMSO での溶解を省略し、バイアルに直接 100 μ g 分の抗体液を添加し、すみやかにピペティングで混合し、試薬を溶解するとともに均一になるようにしてください。
3. 25°C で 1 時間反応させます。反応中はできるだけ光を当てないようにして、15 分に 1 回程度タッピングにより攪拌してください。
4. ゲルろ過カラム (または透析、限外濾過カラム) によって PBS に溶液交換し、未反応の色素や炭酸ナトリウ

ムバッファーを除いてください。詳細はカラム等の説明書に従ってください。

■ 標識率の算出

タンパク質 1 分子あたりに結合した AcidiFluor ORANGE-NHS の分子数 (DOL) が必要な場合、以下のよう

$$DOL = \frac{A_{551}/\epsilon_{280,pH7.4}}{(A_{280} - A_{551} \times CF_{280/551})/\epsilon_{pr}}$$

A_{551} , A_{280} : 標識体の 551 nm, 280 nm における吸光度

$\epsilon_{280,pH7.4}$: AcidiFluor ORANGE-NHS の pH 7.4, 551 nm におけるモル吸光係数 (表 2)

$CF_{280/551}$: 吸光度の補正係数 (correction factor, 表 2)

ϵ_{pr} : 標識したいタンパク質のモル吸光係数。IgG の場合、210,000 $M^{-1}cm^{-1}$

表 2. AcidiFluor ORANGE-NHS の物性 (pH 7.4)

λ_{Abs} (nm)	$\epsilon_{280,pH7.4}$	$CF_{280/551}$
551 nm	62,300	0.24

この値は pH 7.4 の溶液中での標識率算出用のもので、酸性環境では異なります。pH 3.0 では 544 nm において $\epsilon = 80,000 M^{-1}cm^{-1}$ を示します。

■ 蛍光観察

励起波長は 532 nm または 514 nm が適当です。蛍光波長はおよそ 568 nm をピークに検出されます。用いるフィルタは、Cy3 用などの一般的な G 励起フィルタが使用できます。

表 3. 関連製品

型番	品名	主な用途
GC301	AcidiFluor ORANGE	ライソソームのイメージングに
GC304	AcidiFluor ORANGE Labeling Kit	修飾のためのオールインワンタイプ
GC305	AcidiFluor ORANGE-Zymosan A	ファゴサイトーシスの解析に
GC306	AcidiFluor ORANGE-Dextran 10k	エンドサイトーシスの解析に
GC309	AcidiFluor ORANGE-Transferrin	エンドサイトーシスの解析に