

# AcidiFluor™ ORANGE Labeling Kit

表 1. 製品情報

品番	品名	内容	保存	安定性
GC304	AcidiFluor ORANGE-Labeling Kit	AcidiFluor ORANGE-NHS 5 バイアル Reaction Buffer 1.5 mL×1 Washing Buffer 10 mL×1 限外ろ過スピンカラム 5 tubes	湿気を避け、遮光 冷凍保存。	未開封で 1年

## 1. AcidiFluor ORANGE Labeling Kit について

本製品は酸性で明るいオレンジ色蛍光を示す pH 感受性蛍光プローブによる抗体標識用キットです。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 ( $Ex_{max}$  544 nm,  $Em_{max}$  565 nm,  $\epsilon = 80,000 M^{-1}cm^{-1}$ ,  $QY. = 0.7$ )。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。抗体標識から精製まで一連の作業に必要な試薬、器具 5 回分がセットになっています。

※ AcidiFluor ORANGE-NHS 1 本に、約 100  $\mu g$  の抗体 (150 kDa) 標識に必要な色素量が含まれています。

※ 抗体以外にも、分子量が 30 kDa 以上で、反応性のアミノ基を有するサンプルに標識が可能です。

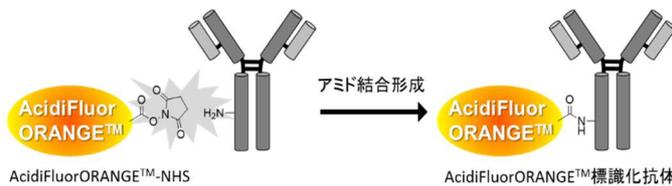


図 1. AcidiFluor ORANGE-NHS と抗体の反応

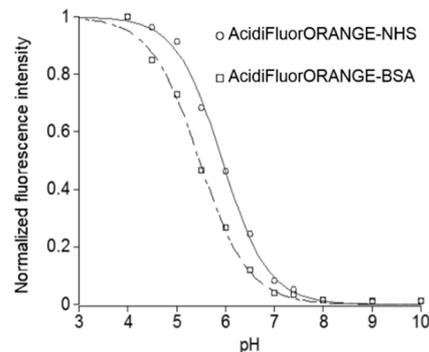


図 2. AcidiFluor ORANGE-NHS および標識 BSA の pH 依存的な蛍光強度変化。

$\lambda_{ex}$  532 nm/ $\lambda_{em}$  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。未開封のバッファーおよびスピンカラムは室温または冷蔵保管も可能です。ご購入後 1 年以上経過したものは品質劣化の恐れがありますので、新しいもののご購入をおすすめいたします。



## 2. 抗体標識プロトコル

### ■ キット以外に必要なもの

- ・ マイクロピペットおよびピペットチップ
- ・ 実験用手袋、安全メガネ
  - ※ 本製品は反応性の色素を含みます。操作にあたっては色素が皮膚に付着したり目に入ったりしないよう、また衣類に付着しないよう充分ご注意ください。
- ・ 微量高速冷却遠心機 (1.5 mL プラスチックチューブを 5000×g で遠心できるもの)
- ・ 超微量分光光度計 (Thermo Scientific™ NanoDrop™ など、標識率を算出する場合に必要)
- ・ 標識したい精製済みの抗体 (100 μg)
  - ※ 血清、腹水、培養上清などの粗精製抗体の場合、または保存のために BSA などのタンパク質が添加されている抗体は本キットでの標識前に精製が必要です。市販の抗体精製用カラムなどの説明書に従って精製を行ってください。
  - ※ 抗体がトリスバッファーを含む溶液に溶解されている場合は、あらかじめ透析や脱塩カラムなどでトリスバッファーを PBS などに完全に置換してください。

### ■ 試薬の調製および蛍光標識方法

1. キットを完全に室温に戻します。室温に戻るまでキャップを開けないでください。
2. スピнкаラムに Washing Buffer 200 μL 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。ろ液は捨ててください。
3. 抗体 100 μg が粉末の場合、Reactrion Buffer 100 μL に溶解してください。PBS などに溶解されている溶液の場合、スピнкаラムに抗体溶液を添加し、5000×g、3-10 分間遠心して 20 μL 程度まで濃縮し、200 μL になるように Reaction Buffer を加えてからピペッティングで均一になるようによく攪拌してから再度遠心し、100 μL 程度まで濃縮し、再度よく攪拌してください。
4. AcidiFluor ORANGE-NHS のバイアルを室温に戻し、遠心機でスピンドウンしてから開封してください。
5. 3 のタンパク質を AcidiFluor ORANGE-NHS のバイアルに直接加え、泡立た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ッティングしてください。3 でスピнкаラムを使用した場合は、再度同じスピ

ンカラムを使用するので、捨てずに取っておいてください。

6. 室温で 1 時間、暗所で反応させます。15-20 分に 1 回程度タッピングで攪拌してください。
7. 2 でリンスを行った (もしくは 3 で使用した) スピнкаラムに反応液全量に移し、Washing Buffer 100 μL を加えて 5000×g、5-10 分間遠心してください。ろ過膜上に溶液が多く残っている場合、更に 3 分間遠心してください。ろ液は捨ててください。
8. Washing Buffer 200 μL を加え 5000×g 5-10 分間遠心し、ろ液を捨ててください。
9. 8 の操作を 3 回繰り返してください。
10. Washing Buffer 100 μL をスピнкаラムに加え、数回ピペッティングしてろ過膜上のタンパク質を回収してください。

### ■ 標識率の算出

抗体 1 分子あたりに結合した AcidiFluor ORANGE-NHS の分子数 (DOL) は、次式にて求めることが可能です。

$$\text{標識率} = \frac{A_{551}/\epsilon_{\text{AcidiFluor}}}{(A_{280} - A_{551} \times \text{CF})/\epsilon_{\text{Protein}}}$$

$A_{551}$ ,  $A_{280}$ : 標識体の 551 nm, 280 nm での吸光度

CF: 補正係数 (correction factor, 表 2 参照)

$\epsilon_{\text{AcidiFluor}}$ : AcidiFluor ORANGE-NHS のモル吸光係数 (表 2 参照)

$\epsilon_{\text{protein}}$ : IgG の場合、210,000

表 2. pH 7.4 における AcidiFluor ORANGE-NHS の物性

$\lambda_{\text{Abs}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{AcidiFluor}}$	CF
551 nm	62,300	0.24

※ AcidiFluor ORANGE-NHS は pH により物性が異なります。PBS pH 7.4 で溶出した標識体の標識率は上記のように算出してください。一方、酸性環境では物性が異なります。

### ■ 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。蛍光顕微鏡の場合、Cy3 用などの一般的な G 励起フィルターセットが使用できます。

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
GC302	AcidiFluor ORANGE-NHS	抗体を含むタンパク質等への修飾に
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
GC310-01	AcidiFluor ORANGE HaloTag® Ligand	ハロタグリガンド化された pH センサー
GC3006-01	HySOx	細胞内の次亜塩素酸の検出に