

一般研究用

POLARIC[®] Labeling Kit

表1. 製品情報

品番	品名	キット内容	保存条件	安定性
GC211	POLARIC[®] Labeling Kit	<ul style="list-style-type: none"> ・POLARIC-NHS ×5 ・Dimethylsulfoxide 500 μL ×1 ・Reaction Buffer 1.5 mL ×1 ・Washing Buffer 10 mL ×1 ・限外ろ過スピнкаラム ×5 	遮光-20℃保存。 DMSO溶解後は 1回使い切り。	未開封 1年

1. はじめに

■アミン反応性プローブについて

POLARIC[®]-NHS (succinimidyl ester) は、タンパク質等のアミノ基に結合する、縮合剤が不要な蛍光色素POLARICです。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。本キットは、POLARICの標識から精製までの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。POLARIC[™] -NHS 1 本には、100 μg の IgG 等タンパク質へのラベル化に最適な量が含まれています。

注意：分子量 30 kDa 以下のサンプルには使用できません。

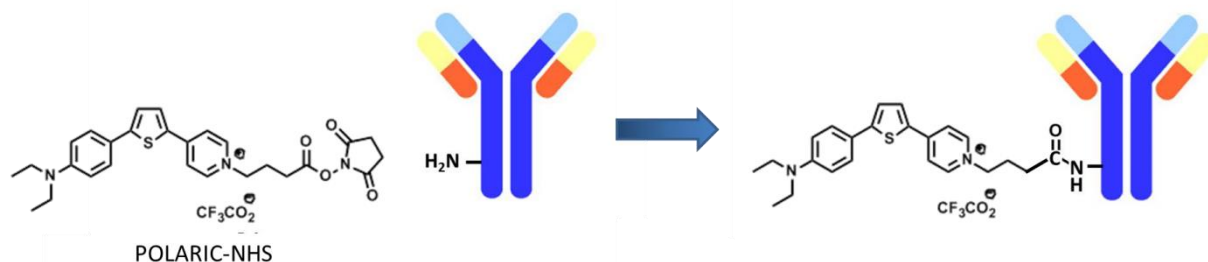


図1. POLARIC-NHSと抗体の反応

2. タンパク質ラベル化プロトコル

■ご用意頂くもの(キットに含まれないもの)

- ・反応、保存用マイクロチューブ
- ・マイクロピペッター
- ・微量遠心機

■試薬の調製および蛍光標識方法

- ① 限外ろ過スピнкаラムに Washing Buffer 200 μL を添加して 5,000 g で 10 分間遠心し、ろ過膜の rins を行う。ろ液は捨てる。
- ② タンパク質 100 μg を Reaction Buffer 100 μL に溶解させ、マイクロチューブに移す。
* 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るので、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 反応直前に、POLARIC-NHS に DMSO 10 μL を加え、ピペティングでよく溶解させる。
* アミン反応性色素は DMSO 中では不安定であるため、溶解後は直ちに次のステップにお進みください。

④ ②のタンパク質溶液に①の POLARIC-NHS 溶液全量を加え、ピペッティングでよく混合した後、1 時間暗所・室温

で反応させる。

⑤ ①でリンスを行ったスピнкаラムに、反応溶液全量を移す。

⑥ さらに Washing Buffer 100 μ L を加え、5,000 g で 10 分間遠心する。ろ過膜上に溶液が残っている場合、さらに5分間遠心を行う。

⑦ ろ液を捨て、⑥の操作を 3 回繰り返す。

⑧ Washing Buffer 100 μ L をスピнкаラムに加え、ピペッティングでろ過膜上のタンパク質を回収する。タンパク質溶液は、新しいマイクロチューブに移し、4°C で保存する。

* Washing Buffer 以外の適切な Buffer を用いても問題ありません。

■ラベル化の確認

色素の極大吸収波長は 480 nm ですが、電気泳動後の UV (350 nm 前後) 観察で確認可能です。

3. 標識率の算出

タンパク質1分子あたりに結合する POLARIC-NHS の分子数は、次式にて求めることが可能です。

$$\text{標識率} = \frac{A_{480} / \epsilon_{\text{POLARIC-NHS}}}{(A_{280} - A_{480} \times \text{CF}) / \epsilon_{\text{protein}}}$$

$A_{480, 280}$: 標識体の 480 nm、280 nm における吸光度

CF : Correction Factor (表2 参照)

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

$\epsilon_{\text{protein}}$: 標識タンパク質 のモル吸光係数

IgG の場合、216,000

表2. POLARIC-NHS の物性

	Abs max	Flu max	ϵ	CF (Correction Factor)
POLARIC-NHS	480 nm	554 nm*	50,000	0.31

* この値は水溶液中での値となります。

蛍光ソルバトクロミック色素 POLARIC は、周りの環境により蛍光波長が変化します。