

# SaraFluor™ Labeling Kit

## 1. SaraFluor Labeling Kit について

本製品は蛍光色素である SaraFluor-NHS を用いて抗体を簡便、迅速に標識できるキットです。弱塩基性条件で混合するだけで1級アミンとすみやかに共有結合を形成する NHS 体 (N-hydroxysuccinimide ester) を用いて約3時間で蛍光標識抗体を作成できます。本キットで 100–250 µg の IgG 抗体の標識を5回行うことができます。

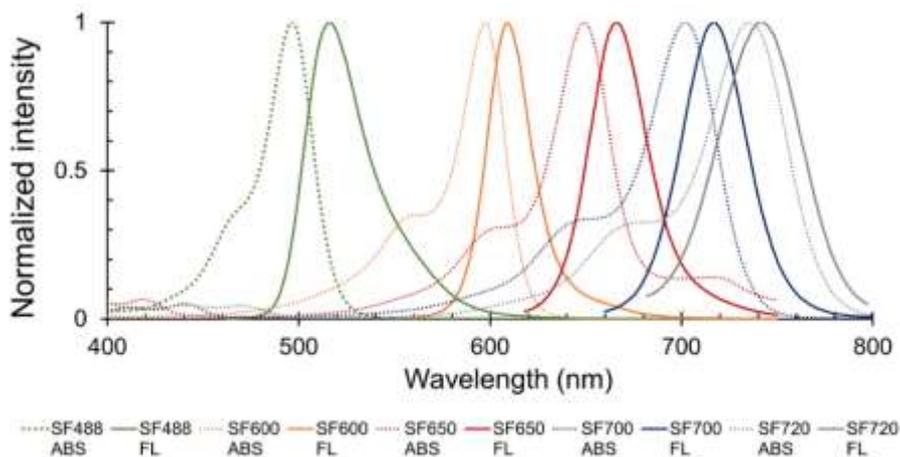
抗体以外の分子量 100 kDa 以上のタンパク質の標識にも使用可能です。

### ■ 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。未開封のバッファーおよびスピнкаラムは冷蔵または室温保管も可能です。ご購入後1年間以上経過したものは反応性の低下など品質劣化の恐れがありますので、新しいものをご購入をおすすめします。

### 製品情報

品名	品番	容量
SaraFluor 488 Labeling Kit	AR6031-N5K	5 回分 キット
SaraFluor 600 Labeling Kit	AR6061-N5K	
SaraFluor 650 Labeling Kit	AR6081-N5K	
SaraFluor 700 Labeling Kit	AR6101-N5K	
SaraFluor 720 Labeling Kit	AR6111-N5K	



SaraFluor の吸収・蛍光スペクトル

## 2. タンパク質標識プロトコル例

### ■ キット内容物

使用前にご確認ください。

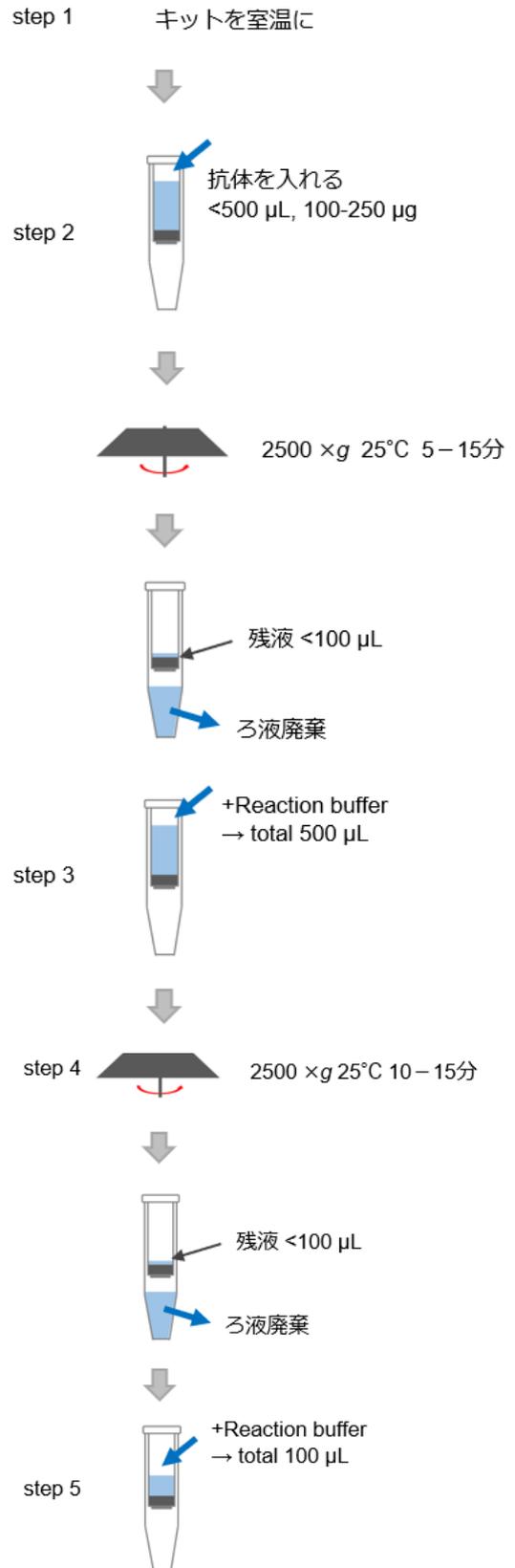
1. スピンカラム 5 本
2. DMSO (ジメチルスルホキシド) 500  $\mu$ L
3. Reaction buffer (反応バッファー) 5 mL
4. Washing buffer (洗浄バッファー) 10 mL
5. 色素 (SaraFluor 488/600/650/700/720-NHS) 5 nmol  $\times$  5 本  
(ご購入内容によって波長が異なります)

### ■ キット以外に必要なもの

- ・ マイクロピペット
  - ・ 実験用保護手袋および安全メガネ
- ※ 本製品は有機溶媒および反応性の色素を含みます。操作にあたっては、色素および溶媒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。
- ・ 37°C 恒温槽
  - ・ 微量高速冷却遠心機 (1.5 mL チューブが 2500  $\times$ g で遠心できるもの。)
  - ・ タンパク質定量キット、または Thermo Scientific™ NanoDrop™ などの超微量分光光度計
  - ・ 標識したい精製済抗体 (100 – 250  $\mu$ g)
- ※ 血清、腹水、培養上清といった粗精製抗体の場合、または保存のために BSA などのタンパク質が加えてある抗体は、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 Tris buffer を含む溶液に溶解されている場合は、あらかじめ透析などで Tris buffer を PBS に置換してください。もしくは後述の「オプショナル 脱塩プロトコル」に従い Tris を十分に除いてください。

### ■ 抗体標識プロトコル

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. スピンカラムのフィルター上に 500  $\mu$ L 以下の抗体溶液 (抗体量 100 – 250  $\mu$ g) を入れ、25°C に設定した遠心機を使い、2500  $\times$ g (一般的な回転半径約 65 mm のローターでは約 5000 rpm) で 100  $\mu$ L 以下になるまで遠心します。一般的に最適な遠心時間は 5 – 15 分ですが、抗体濃度と液量によって異なるため、最初に 5 分間遠心し、フィルター上の液量が多いときは適宜遠心時間を追加してください。チューブの底に溜まったろ液は捨てます。



3. スピнкаラムのフィルター上に Reaction buffer を 400  $\mu\text{L}$  以上加えて液量 500  $\mu\text{L}$  に調整します。
4. step 2 と同様に 25°C 2500 $\times g$  で 100  $\mu\text{L}$  以下になるまで遠心します。ろ液は捨てます。
5. スピнкаラムのフィルター上で Reaction buffer を加えて液量 100  $\mu\text{L}$  になるよう調節します。
6. 色素のチューブのキャップを開ける前にスピンドウンして、色素をチューブの底に集めてください。
7. 色素のチューブに、5  $\mu\text{L}$  の DMSO を加えて数回のピペティングで色素を溶解し、スピнкаラムのフィルター上の抗体溶液とすばやく混ぜてください。ピペットの先端でスピнкаラムの膜を傷つけないよう注意してください。
8. 溶液が不均一にならないよう、再度 100  $\mu\text{L}$  にセットしたピペットで数回混和します。
9. 37°C にセットしたインキュベーターで 30 分間インキュベートします。このとき、チューブをアルミホイルなどで覆って強い光が当たらないようにします。
- 10.スピнкаラムのフィルター上に 400  $\mu\text{L}$  の washing buffer を加えて、25°C 2500 $\times g$  で 8–20 分遠心してフィルター上の液量を 50  $\mu\text{L}$  以下にします。ろ液は捨てます。
- 11.スピнкаラムのフィルター上に 400–500  $\mu\text{L}$  の washing buffer を加えて step 10 と同様に遠心する操作を 3 回繰り返します。
- 12.フィルター上に残った溶液を回収し、更に 10  $\mu\text{L}$  の washing buffer をフィルター上に乗せて数回ピペティングし、フィルターに吸着した抗体も回収します。お手持ちのタンパク質定量キットまたは超微量分光光度計で抗体濃度を測定してください。末尾 Appendix のパラメーターを使用して以下の式から標識率を算出することもできます。一般的には使用した抗体の 40–90% の抗体が標識体として回収されます。

$$\text{標識率} = \frac{A_{\lambda_{\text{ex}}} \times \epsilon_{\text{protein}}}{(A_{280} - A_{\lambda_{\text{ex}}} \times CF_{280}) \times \epsilon_{\text{ST}}}$$

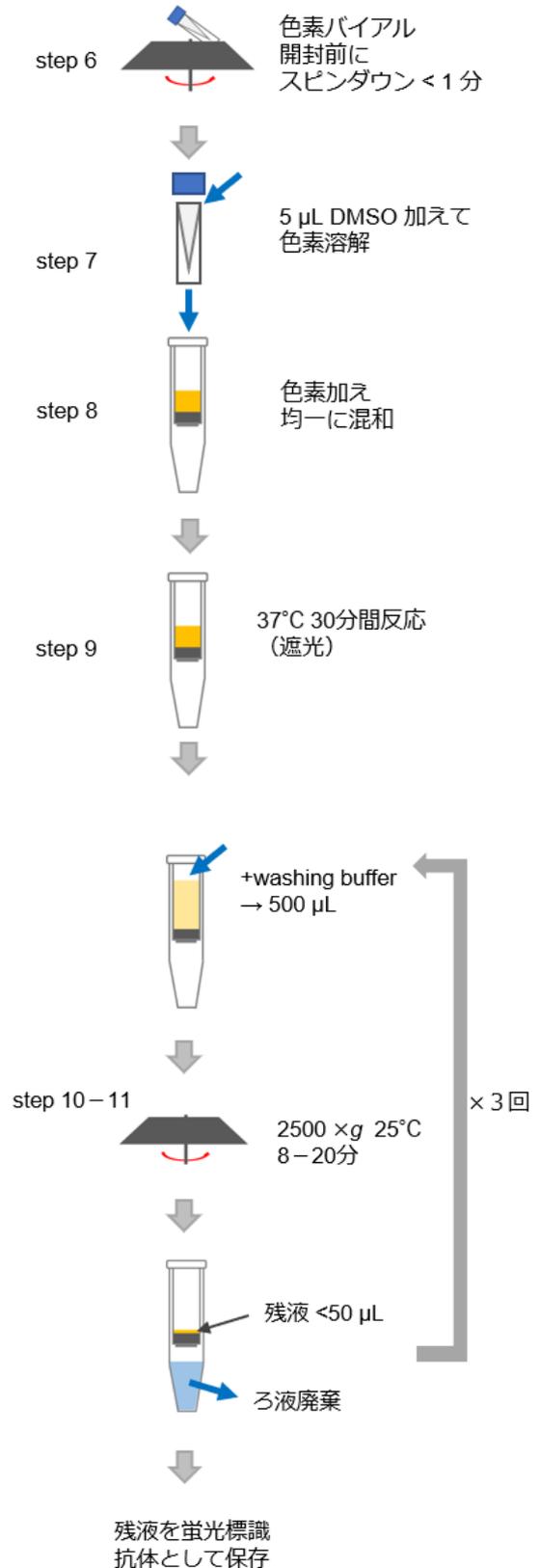
$A_{280}$ ,  $A_{\lambda_{\text{ex}}}$  標識体の 280 nm および最大吸収波長  $\lambda_{\text{ex}}$  における吸光度

$CF_{280}$  280 nm における correction factor

$\epsilon_{\text{ST}}$  色素のモル吸光係数

$\epsilon_{\text{protein}}$ : 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  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

- 13.標識抗体は遮光して 4°C で保存するか、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、早めにご使用ください。



### ■ オプション: Tris バッファの脱塩

1. PBS をおよそ 5 mL 準備します。
2. Tris バッファに溶解されている抗体溶液をキット中のスピнкаラムのフィルター上に入れ、25°Cに設定した遠心機を使い、2500 xg（一般的な回転半径約 65 mm のローターでは約 5000 rpm）で 50 μL 以下になるまで遠心します。チューブの底に溜まったろ液は捨てます。
3. PBS をフィルター上に加えて液量が 500 μL になるようにします。
4. 25°C 2500 xg で 50 μL 以下になるまでおよそ 10 - 15 分間遠心します。ろ液は捨てます。
5. 上記 step 3-4 を 5 - 6 回繰り返します。（1 回のステップで Tris 濃度がおよそ 1/10 に希釈されます。Tris 濃度が抗体濃度の 1/10 以下になるまで十分な回数を繰り返します。）
6. このスピнкаラムを使ってそのまま標識してください。

※ PBS は別途ご用意ください。

※ 市販の脱塩スピнкаラムを使用するとより容易に脱塩できます。

### ■ オプション: 抗体回収率を上げる工夫

使用前のスピнкаラムのフィルター上に 5% Tween 20 水溶液を 500 μL 入れて室温で 15 分間インキュベートしたのち、液を捨てます。次に 500 μL の PBS または超純水を入れてから捨てる（リンスする）ことで余分な Tween 20 を除いてください。この操作でカラムへの非特異的な抗体吸着が減少し、抗体回収率が改善することがあります。

※ Tween 20 と PBS は別途ご用意ください。

### ■ 蛍光観察

各色素の波長に適した観察条件で観察してください。SaraFluor 488 には FITC や GFP などに使われる B 励起フィルターセットが、SaraFluor 600 には TexasRed などに使われる Y 励起フィルターセットが使用できます。また、SaraFluor 650, 700, 720 にはそれぞれ Cy5, Cy5.5, Cy7 用のフィルターセットが使用できます。

## Appendix. SaraFluor シリーズの物性

色素	粉末/DMSO 溶液の色	$\lambda_{ex}$ (nm) *1	$\lambda_{em}$ (nm) *2	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) *3	CF <sub>280</sub> *4
SaraFluor 488	橙 / 黄	494	514	$0.82 \times 10^5$	0.25
SaraFluor 600	茶色 / 紫	597	607	$1.3 \times 10^5$	0.18
SaraFluor 650	青 / 青	646	660	$1.1 \times 10^5$	0.09
SaraFluor 700	濃紺 / 水色	691	712	$1.0 \times 10^5$	0.07
SaraFluor 720	緑 / 淡青緑	721	740	$1.6 \times 10^5$	0.14

\*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

\*4 タンパク質の標識率を算出するための補正係数