

ICG-NHS ester

表 1. 製品情報

品番	品名	容量	保存	安定性
AR5503-J1	ICG-NHS ester	1 mg	湿気を避け、遮光 冷凍保存	未開封で約 1 年
AR5503-J5		1 mg × 5		
AR5503-J10		1 mg × 10		

1. ICG-NHS ester について

Indocyanine Green-NHS ester (ICG-NHS ester) は、タンパク質等のアミノ基に結合する、縮合剤が不要な近赤外プローブです。抗体等のタンパク質だけでなく、ペプチド等への標識も可能です。

■ 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。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. プロトコル

2. タンパク質標識プロトコル例

■ ご用意いただくもの

- ・ 脱水ジメチルスルホキシド (DMSO, anhydrous)
- ・ 0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (NaHCO_3 , pH 8.4)
- ・ 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。
- ・ 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。)

- ・ 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。)
- ・ 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、粉末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。
3. 本製品 1 mg に対し、121 μ L の DMSO を添加し、10 mM のストック溶液を用意します。10 回ほどピペティングして充分溶解させてください。

■ タンパク質の標識

標識前の準備

- ※ 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室温で 10–15 分間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 5 回以上充分に洗浄します。その後、200 μ L の PBS を入れて遠心し、フィルターを洗っておきます。
- ※ 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。

タンパク質の精製および、濃縮・溶液交換

1. 標識したいタンパク質溶液を確認してください。充分に精製されていないタンパク質や、安定化剤として BSA など別のタンパク質が混在している場合は、精製した方が必要です。それぞれのタンパク質の性質によって適切な精製方法が異なります。タンパク質に適した精製方法をご検討ください。例えば IgG 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チオール基を持つ物質を十分に除いてください。
2. 精製したタンパク質の濃度を測定し、遠心式限外ろ過フィルターで 1–3 mg/mL 程度まで濃縮します。タンパク質の濃度測定には、280 nm の吸光度 (A_{280}) から式 1 を用いてタンパク質の濃度 (C_{protein}) を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, BSA の場合は 66,400 g/mol

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

3. 同様に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 NaHCO_3 バッファーを加えて、10 倍に濃縮する前の体積に戻します。pH 8.4 の 0.1 M NaHCO_3 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。

タンパク質の標識

1. モル比で色素がタンパク質の 2–4 倍量となるように、色素をタンパク溶液に添加し、ピペティングでよく混合します。通常はタンパク質の 2.5 倍量程度でよく標識されますが、タンパク質によって結果が異なるため、調節が必要です。

- 遮光して、37°Cで30分～1時間インキュベートします。10～15分ごとにタッピングで攪拌してください
- 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。

※ タンパク質の分子量やゲルろ過カラムの仕様により、溶出条件が異なります。ゲルろ過カラムの説明書などに従ってください。

- 標識したタンパク質の分画を集め、必要に応じて濃縮してから、吸光度を測定することにより、以下の式2によりターゲットとなるチオール基あたりの標識率を求めることができます。

$$\text{標識率} = \frac{A_{\lambda_{\text{ex}}} \times \varepsilon_{\text{protein}}}{(A_{280} - A_{\lambda_{\text{ex}}} \times CF_{280}) \times \varepsilon_{\text{ST}}} \quad (\text{式2})$$

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

CF_{280} : 0.075 (280 nm における補正係数)

ε_{ST} : 147,000。ICG のモル吸光係数

$\varepsilon_{\text{protein}}$: タンパク質の280 nm におけるモル吸光係数。IgG の場合は $210,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

- 標識したタンパク質を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。タンパク質に合わせた適切な方法をご検討ください。