

Zenon® Mouse IgG Labeling Kit

ひとこと

届いた製品はすぐに下記の条件下で保存してください：

- 2~6°C
- 遮光条件下

励起/蛍光波長：表 1 参照

はじめに

Zenon® Mouse IgG Labeling Kit は、抗体コンジュゲート生成のための、迅速かつ汎用的で信頼性のある方法を提供します。しかも、出発物質はごく少量 (µg 以下) からでも可能です。Zenon®テクノロジーを用いて調製した抗体コンジュゲートは、フローサイトメトリー、イメージング、ハイスループットなど、直接標識した一次抗体を利用するアプリケーションの細胞染色に用いることができます。以前は、複数のマウス由来抗体を同一のサンプルに使用するといったアプリケーションは時間がかかり、実用的ではありませんでしたが、このようなアプリケーションも本テクノロジーにより簡略化できます。

各 Zenon® Mouse IgG Labeling Kit は、特定のマウスモノクローナル抗体アイソタイプ (IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b} など) 用にデザインされています。販売中の標識は、当社の Alexa Fluor®色素シリーズをはじめ、従来型色素である R-フィコエリトリン (R-PE)、アロフィコシアニン (APC)、Alexa Fluor®色素-R-PE や Alexa Fluor®色素-APC タンデムコンストラクト、酵素およびビオチンなど、豊富な高品質蛍光色素を取りそろえています (表 1)。当社ではさらに、Zenon® Tricolor Mouse IgG Labeling Kit を複数提供しており、いずれも 3 種類の Zenon® Mouse IgG 標識試薬をお選びいただけます (表 2)。

Zenon®標識テクノロジーでは、インタクトな IgG 一次抗体の Fc 部位に選択的な、フルオロフォア、ビオチン、または酵素を標識した Fab フラグメントを用いて標識複合体を生成します (図 1)。標識 Fab フラグメントは、製造過程においてアフィニティ精製され、一次抗体の Fc 部位に対する高い親和性および選択性が確保されています。Zenon®標識法は免疫選択性を利用していますの

で、複合体生成前に、抗体から血清アルブミンのような外因性タンパク質やアミン含有バッファーを取り除く必要はありません。他の種由来の抗体との交差反応性は低く抑えられています。

Fab フラグメント・抗体複合体は 5 分以内に形成でき、混合反応液中のほぼすべての一次抗体が標識されます (図 2)。Zenon®テクノロジーにより形成された複合体は、直接標識した一次抗体と同等の蛍光強度または酵素活性を示します。さらに、標識 Fab フラグメントと一次抗体のモル比を変えるなど、添加する Zenon®標識試薬の量を変更することで、抗体の標識の程度 (すなわちプローブの蛍光強度または酵素活性) を調節することが可能です。

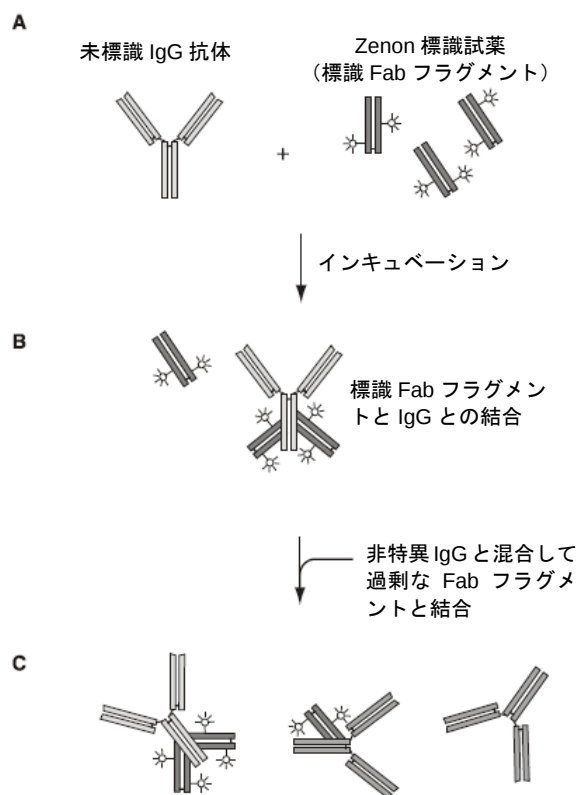


図 1. Zenon®標識の模式図。未標識 IgG をフルオロフォア標識した Fab フラグメントを含む Zenon®標識試薬とインキュベートします (A)。標識 Fab フラグメントは、IgG 抗体の Fc 部位と結合し (B)、過剰の Fab フラグメントは非特異的 IgG を添加して中和します (C)。非特異的 IgG を添加することにより、同一タイプの一次抗体が複数存在する実験において交差標識を防ぐことができます。

試薬

Zenon[®] Mouse IgG Labeling Kit は、キットの種類によって 50 回、25 回、または 10 回分の標識に必要な量の試薬が含まれています（下記の「内容物」をご覧ください）。アフィニティ精製したインタクトなマウス IgG 抗体 1 µg を、Fab と抗体のモル比が 3 : 1 の条件で標識するのに必要な Zenon[®] 標識試薬の量を標識 1 回分とします（注 A）。

内容物

低分子量色素またはビオチンによる標識用 Zenon[®] Mouse IgG Labeling Kit :

- Zenon[®]マウス IgG 標識試薬 (Component A)、250 µL
- Zenon[®]ブロッキング試薬 (マウス IgG) (Component B)、250 µL

50 回分の標識に必要な試薬が含まれています。

R-フィコエリトリン (R-PE)、アロフィコシアニン (APC) または酵素による標識用 Zenon[®] Mouse IgG Labeling Kit :

- Zenon[®]マウス IgG 標識試薬 (Component A)、125 µL
- Zenon[®]ブロッキング試薬 (マウス IgG) (Component B)、125 µL

25 回分の標識に必要な試薬が含まれています。

Alexa Flour[®] dye-R-PE または Alexa Flour[®] dye-APC タンデムコンストラクトによる標識用 Zenon[®] Mouse IgG Labeling Kit :

- Zenon[®]マウス IgG 標識試薬 (Component A)、50 µL
- Zenon[®]ブロッキング試薬 (マウス IgG) (Component B)、50 µL

10 回分の標識に必要な試薬が含まれています。

Zenon[®] Tricolor Mouse IgG Labeling Kit (表 2 参照) :

- 第一蛍光色の Zenon[®]マウス IgG 標識試薬 (Component A)、50 µL
- 第二蛍光色の Zenon[®]マウス IgG 標識試薬 (Component B)、50 µL
- 第三蛍光色の Zenon[®]マウス IgG 標識試薬 (Component C)、50 µL
- Zenon[®]ブロッキング試薬 (マウス IgG) (Component D)、150 µL

3 種類の標識試薬は、それぞれ 10 回分の標識に必要な量が含まれています。

Zenon[®]マウス IgG 標識試薬は、標識したヤギ Fab フラグメントで、キットによって異なる IgG アイソタイプ (IgG₁、IgG_{2a} または IgG_{2b}) のマウス IgG 抗体の Fc 部位に選択性を示します。低分

子量蛍光色素またはビオチンとコンジュゲートした Zenon[®] マウス IgG 標識試薬は、5 mM のアジ化ナトリウムを含む pH 7.5 の 0.1 M リン酸ナトリウム、0.1 M 塩化ナトリウム溶液中に、Fab フラグメントを 200 µg/mL の濃度で含む試薬として提供されています。R-フィコエリトリン、アロフィコシアニン、Alexa Flour[®] 色素-R-PE または Alexa Flour[®] 色素-APC タンデムコンストラクトとコンジュゲートした Zenon[®] マウス IgG 標識試薬は、5 mM のアジ化ナトリウムを含む pH 6.8 の 0.1 M リン酸ナトリウム、0.1 M 塩化ナトリウム溶液中に、Fab フラグメントを 200 µg/mL の濃度で含む試薬として提供されています。西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした Zenon[®] マウス IgG 標識試薬は、0.02% のチメロサルを含む pH 6.8 の 0.1 M リン酸ナトリウム、0.1 M 塩化ナトリウム溶液中に、Fab フラグメントを 200 µg/mL の濃度で含む試薬として提供されています。Zenon[®] ブロッキング試薬 (マウス IgG) は、5 mM のアジ化ナトリウムを含む pH 7.2 のリン酸緩衝食塩水中、5 mg/mL の濃度の試薬として提供されています。

表 1. Molecular Probes の Zenon® Mouse IgG Labeling Kit

標識	Ex/Em*	カタログ番号		
		Mouse IgG ₁	Mouse IgG _{2a}	Mouse IgG _{2b}
Alexa Fluor® dyes				
Alexa Fluor® 350	346/442	Z25000	Z25100	Z25200
Alexa Fluor® 405	402/421	Z25013	Z25113	Z25213
Alexa Fluor® 430	434/539	Z25001		
Alexa Fluor® 488	495/519	Z25002	Z25102	Z25202
Alexa Fluor® 532	531/554	Z25003		
Alexa Fluor® 546	556/573	Z25004	Z25104	Z25204
Alexa Fluor® 555	555/565	Z25005	Z25105	Z25205
Alexa Fluor® 568	578/603	Z25006	Z25106	Z25206
Alexa Fluor® 594	590/617	Z25007	Z25107	Z25207
Alexa Fluor® 647	650/668	Z25008	Z25108	Z25208
Alexa Fluor® 660	663/690	Z25009		
Alexa Fluor® 680	679/702	Z25010	Z25110	Z25210
Alexa Fluor® 700	696/719	Z25011		
従来型色素				
Pacific Orange™	400/551	Z25256	Z25257	
Pacific Blue™	410/455	Z25041	Z25156	
Fluorescein	494/518	Z25042		
Texas Red®-X	595/615	Z25045		
ビオチン				
Biotin-XX	NA	Z25052	Z25152	Z25252
DSB-X™ + biotin	NA	Z25053		
R-フィコエリトリン、アロフィコシアニンおよびタンデムコンストラクト				
R-phycoerythrin (R-PE)	496 ‡/578	Z25055	Z25155	Z25255
Alexa Fluor® 610-R-PE	496 ‡/630	Z25020		
Alexa Fluor® 647-R-PE	496 ‡/668	Z25021	Z25121	Z25221
Alexa Fluor® 680-R-PE	496 ‡/702	Z25022		
Allophycocyanin (APC)	650/660	Z25051	Z25151	Z25251
Alexa Fluor® 700-APC	650/723	Z25030		
Alexa Fluor® 750-APC	650/775	Z25031		
酵素				
Horseradish peroxidase	NA	Z25054	Z25154	Z25254

*およその励起および蛍光の最大波長 (nm 単位)。†DSB-X は、デスチオビオチン-X の当社の登録商標です。‡546 nm および 565 nm にも吸収ピークが存在します。NA=該当なし。

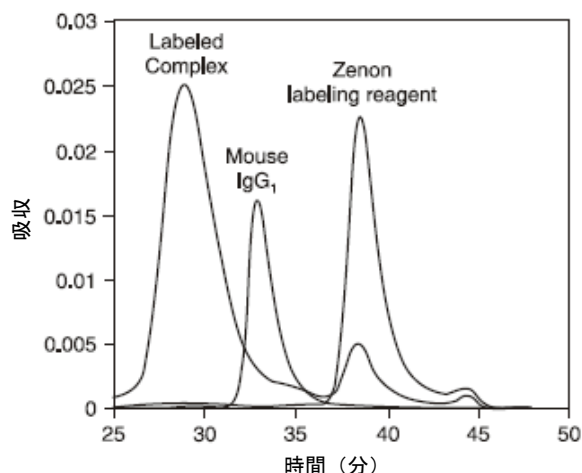


図 2. マウス IgG₁ 抗体に結合した Alexa Fluor® 488

Zenon®標識試薬の高性能サイズ排除クロマトグラフィー分析。Zenon®標識試薬単独では 38 分に、マウス IgG₁ 抗体単独では 33 分にそれぞれピークが現れます。Zenon®標識試薬とマウス IgG₁ 抗体を約 5 : 1 のモル比で混合すると、IgG₁ が定量的に標識複合体へ変換され、29 分にピークが現れます。

保存および取り扱い

Zenon® Mouse IgG Labeling Kit は、お手元に届き次第、いずれも 2~6°C で保存し、蛍光物質を含む試薬は遮光条件下で保存してください。長期間保存する場合、低分子量蛍光色素またはビオチンを含む Zenon®マウス IgG 標識試薬および Zenon®ブロッキング試薬は、単回使用量に分注し、-20°C 以下で冷凍保存が可能です。R-フィコエリトリン、アロフィコシアニン、Alexa Fluor® 色素-R-PE または Alexa Fluor® 色素-APC タンデムコンストラクト、および西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼを含む Zenon®マウス IgG 標識試薬は、決して冷凍しないでください。

Zenon® 複合体の形成

以下に示すプロトコールは、抗体 1 µg を Zenon®マウス IgG 標識試薬で標識する場合のプロトコールで、Fab と抗体のモル比は 3 : 1 となります (注 A)。このモル比は、実験開始濃度として推奨されているもので、大半のアプリケーションにおいて、十分な標識を行うことができる必要最小限のモル比となっています。ただし、実験によっては、モル比を高くしないと十分なシグナルが得られない場合もあります (注 B)。使用する抗体量が多いか少ない場合は、本プロトコールに示す試薬量を必要に応じてスケールアップまたはスケールダウンすることが可能です。Zenon®マウス IgG 標識反応では、抗体試料に含まれる可能性のあるウシ血清アルブミン (BSA) や他の安定化タンパク質を除去する必要はありません。腹水またはハイブリドーマ上清中に含まれる抗体も直接標識することができ、標識前後の抗体精製は必要ありません。

注意: 標識プロトコールを開始する前に、使用するマウス抗体のアイソタイプが、Zenon® Mouse IgG Labeling Kit のアイソタイプと一致することを確認してください。キットに含まれる Zenon®マウス IgG 標識試薬はアイソタイプ特異的ですので、試薬と対応しないマウス IgG アイソタイプの抗体への標識は推奨いたしません。

1.1 リン酸緩衝食塩水（PBS）などの適切なバッファーを用いて抗体 1 µg を調製してください。容量は、20 µL 以下であれば問題ありません。濃度が不明の抗体を使用する場合には、注 C を参照してください。腹水またはハイブリドーマ上清といった未精製の抗体試料を使用する場合は、注 D を参照してください。

1.2 抗体溶液に Zenon®マウス IgG 標識試薬（Component A）5 µL を加えてください（Zenon® Tricolor Kit を使用する場合には Component A、Component B、または Component C から必要な標識試薬を選択してください）。

1.3 混合溶液を室温で 5 分間インキュベートしてください。

1.4 Zenon®ブロッキング試薬（Component B、または Zenon® Tricolor Kit を使用する場合には Component D）5 µL を混合反応液に加えてください。ブロッキング試薬はアイソタイプ特異的ではなく、すべての Zenon® Mouse IgG Labeling Kit に共通です。単一標識抗体のみを用いるアプリケーションに関しては、注 E を参照してください。

1.5 溶液を室温で 5 分間インキュベートしてください。

上記の操作により使用準備の整った複合体は、約 30 分以内に試料と反応させてください。これよりも長期間の保存が必要な場合は、注 F を参照してください。

一般的アプリケーション情報

コンジュゲートの使用: Zenon®テクノロジーによって標識されたマウス IgG 抗体は、直接標識した抗体を利用できるすべてのアプリケーションに適していると考えられます。Zenon®試薬で標識した複数のマウス IgG 抗体は、一つの実験において、連続的に使用することも単一の染色混合液にして使用することも可能です。

コンジュゲートの安定性: コンジュゲートが形成され、過剰な Fab フラグメントをブロッキング試薬で除去したら、標識複合体は約 30 分以内に使用してください。

使用濃度: 直接標識した一次抗体を主に使用するアプリケーションでは、Zenon®テクノロジーを用いて標識した抗体は通常、直接標識した一次抗体と同等かそれより高い濃度（1.5～3 倍）で使用することが可能です。

表 2. Molecular Probes の Zenon® Tricolor Mouse IgG Labeling Kit

Tricolor Labeling Kit	標識*	カタログ番号		
		Mouse IgG ₁	Mouse IgG _{2a}	Mouse IgG _{2b}
キット 1 (イメーシング用)	Alexa Fluor® 488 Alexa Fluor® 555 Alexa Fluor® 647	Z25060	Z25160	Z25260
キット 2 (イメーシング用)	Alexa Fluor® 350 Alexa Fluor® 488 Alexa Fluor® 594	Z25070	Z25170	Z25270
キット 3 (フローサイトメトリー用)	Alexa Fluor® 488 R-phycoerythrin (R-PE) Alexa Fluor® 647-R-PE	Z25080	Z25180	Z25280

*蛍光励起および放射の最大波長は表 1 をご覧ください。

シグナルがほとんど検出されない: 適切なコントロールで一次抗体の標的への結合が確認されているにもかかわらず、Zenon®テクノロジーを用いて標識した抗体でシグナルが検出されない場合、Zenon®標識試薬を追加して Fab と抗体のモル比を増加させるか、一次抗体の最終濃度を増加させることでシグナルが増加する可能性があります。多くの場合、3 : 1 のモル比が適切ですが、モル比は 6 : 1 まで増加させることが可能です。6 : 1 以上にモル比を増加させてもシグナル強度の顕著な増加にはつながりません。

標識解離または移動: 標識 Fab フラグメントは一次抗体と共有結合しているわけではないため、時間経過に伴って標識 Fab フラグメントが多少失われる可能性があります。複数のマウス IgG 一次抗体を用いるアプリケーションにおいては、Fab フラグメントが一つの一次抗体から他の一次抗体へ徐々に移動することもあります。ホルムアルデヒドを用いた染色後の固定ステップを追加して Fab の解離を減らす必要があります（下記の染色アプリケーションをご覧ください）。

染色アプリケーション

以下に示すプロトコールは、Molecular Probes 社において、Zenon®マウス IgG 標識試薬で標識した一次抗体を用いて、細胞および組織を染色するために開発されました。実験によっては、本プロトコールをそのまま適用できない可能性もありますので、これらのプロトコールをお客様のニーズに合わせて変更されることをお勧めします。

免疫細胞化学

本プロトコールは、ウシ肺動脈上皮細胞（BPAE）、ホエジカ細胞、およびメイディン・ダービー・イヌ腎臓細胞（MDCK）など多くの細胞株の染色に成功しています。十分な量の標的が存在する一次抗体の場合には、Zenon®標識試薬

(Fab) と抗体のモル比が 3 : 1 となる条件で Zenon[®] 標識複合体を形成させるのが適切です。標的の量が少ない場合には、モル比を 6 : 1 とすることを推奨しています。

2.1 適切な培地を用いて細胞を培養してください。顕微鏡観察用の接着性細胞株は、スライドガラスまたはカバーガラス上で直接培養することが可能です。ただし、染色操作中は、スライドガラスまたはカバーガラスが乾燥しないようにしてください。

2.2 細胞サンプルを、4%のホルムアルデヒドを含む PBS 溶液中、室温で 15 分間固定してください。または、試料を 5% CO₂ 雰囲気下、37°C で 15 分間インキュベートして固定することも可能です。後者の固定法のほうが、細胞骨格形態をよりよい状態で保存できることが確認されています。

2.3 細胞サンプルを 1 回以上 PBS で洗浄してください。

2.4 0.1%の Triton[®] X-100 を含む PBS 中に、サンプルを室温で 5 分間インキュベートし、細胞の透過処理を行ってください。界面活性剤溶液を除去します。

2.5 細胞サンプルを、10%の正常ヤギ血清 (NGS) を含む PBS 中で 30 分間処理し、サンプル中の非特異的結合部位をブロックします。

2.6 Zenon[®] 標識複合体 (上記 Zenon[®] 複合体の形成に従って調製したもの) を、10%の NGS を含む PBS を用いて、必要な使用濃度に希釈し、細胞サンプルを浸漬するのに十分な容量を添加してください。数種類の Zenon[®] 標識複合体を用いて染色を行う場合、すべての複合体を合わせて単一の染色溶液とすることが可能ですので、1 種類ずつ連続的に染色を行う必要はありません。一次抗体の濃度がすでに二次的検出試薬用に最適化されている場合には、一次抗体の濃度を 1.5~3 倍高くして Zenon[®] 標識法に用いてください。もしくは、各実験に適切な濃度を経験的に決定することが必要です。

2.7 細胞サンプルを室温で 30~60 分間インキュベートしてください。フルオロフォアを用いた Zenon[®] 標識試薬は、インキュベーション中に遮光する必要があります。染色が完了したら、サンプルを PBS で 1 回以上洗浄してください。

2.8 4%のホルムアルデヒドを含む PBS 溶液中で細胞サンプルの 2 回目の固定を室温で 15 分間行ってください。固定が完了したら、サンプルを 1

回以上 PBS で洗浄してください。Zenon[®] Fab フラグメントは、一次抗体に共有結合しているわけではないため、この 2 回目の固定を行わないと、時間と共に解離します。特に多色アプリケーションでは、他の一次抗体に移動することさえあります。この工程は、単一の一次抗体を用いる実験においてはオプションですが、通常 2 回目の固定を行うことでシグナル強度が増強されます。

2.9 必要に応じて、核酸染色剤 (Hoechst 33342、DAPI または SYTOX[®] Green 染色剤等) または他の標識試薬 (フルオロフォア標識ファロイジン等) で細胞サンプルを対比染色してください。各染色工程の後には必ず PBS で洗浄を行ってください。

2.10 必要であれば、細胞をスライドガラスまたはカバーガラスにのせるか、あるいはフローチューブ内に入れてください。細胞を顕微鏡観察する際には、適切なアンチフェード封入剤にて封入してください (ProLong[®] Gold アンチフェード試薬、製品番号 P36930 を使用してください)。適切な方法で、試料の分析または観察を行ってください。

免疫組織化学

本プロトコールは、経心腔的灌流によって 4% のホルムアルデヒド溶液で固定した組織から 10~12 μm の凍結切片用を作成するためのプロトコールです。グルタルアルデヒドを含む固定化剤は使用しないでください。グルタルアルデヒドを使用すると試料の自己蛍光が増強され、タンパク質の過剰な架橋が生じるため、抗体の接近が妨げられることや、抗原が変性することがあります。可能であれば、薄い切片を使用することにより、抗体を組織中に完全かつ迅速に浸透させてください。Zenon[®] 標識複合体は、パラフィンに埋め込まれた切片については、試験および最適化を行っていません。存在量の少ない抗原の一部は、Zenon[®] 標識テクノロジーでは、従来の二次的な検出法を用いた場合ほど容易に検出できません。Zenon[®] 法は、組織試料中での存在量が極めて少ない標的分子には推奨されません。

実験試料の標識と並行して、ネガティブコントロール試料を、一次抗体を使用しない点を除いて上記と同一のプロトコールを用いて調製し、非特異的標識の評価を行う必要があります。従来の二次的検出法で標識されたポジティブコントロール試料を予備実験に使用することで、Zenon[®] 標識法を使用した際に見られる染色パターンの特異性を確認することができます。

3.1 凍結組織切片を含むスライドガラスを室温で解凍してください (通常 15~30 分かかります)。必要に応じて、組織切片のまわりを PAP ペンで

四角く囲んでください。

3.2 組織片を PBS に入れ、室温で 15 分間再水和させてください。本プロトコールの残りの工程において、組織切片が乾燥しないようにしてください。

3.3 0.2%の Triton® X-100 を含む PBS 中、室温で 20 分間組織切片の透過処理を行ってください。

3.4 0.2%の BSA および 5% 非働化済み正常ヤギ血清を含む PBST 中、室温で 30 分間を処理し、非特異的結合部位をブロックしてください。血清の代わりに 1%BSA 溶液を使用することも可能です。インキュベーションが完了したら、ブロッキングバッファーを除去してください。

3.5 Zenon®標識複合体（上記 Zenon®複合体の形成に従って調製したもの）を、PBST を用いて適切な使用濃度に希釈してください。水平染色皿に 100~250 µL の使用溶液を添加し、切片を浸漬させてください。初期実験においては、さまざまな一次抗体濃度、および Zenon®標識試薬（Fab）と抗体のモル比を検討してください。組織染色には 6 : 1 のモル比を実験開始濃度として推奨しています。一般に Zenon®標識法では、標準的な二次的検出法より高濃度の一次抗体が必要となります。染色用バッファーに界面活性剤を添加して抗体の浸透性を高めることが重要です。上述のように、PBST 緩衝液には 0.2%の Triton® X-100 が含まれていますが、抗原が界面活性剤抽出の影響を受けやすくなる可能性と組織浸透性との均衡がとれるように、界面活性剤の種類および濃度（通常 0.1~0.5%）を最適化しなければならない場合もあります。

3.6 組織切片を染色溶液と共に加湿容器内、室温で 1~2 時間インキュベートしてください。フルオロフォアを用いた Zenon®標識試薬は、インキュベーション中遮光する必要があります。数種類の Zenon®標識複合体を用いて染色を行う場合、すべての複合体を合わせて単一の染色溶液とすることが可能ですので、1 種類ずつ連続的に染色を行う必要はありません。長時間のインキュベーションは、行わないでください。インキュベーション時間が長くなると、Zenon® Fab フラグメントが一次抗体から解離して、S/N 比が低下し、多色染色アプリケーションにおいて一次抗体の交差反応が起こる可能性があります。

3.7 染色溶液を除去し、組織切片を PBST 中、室温で 10~15 分間洗浄してください。洗浄をさらに 2 回繰り返してください。洗浄は、縦型 Coplin 染色ビン内で行ってください。

3.8 染色した組織切片を PBS 中、室温で 5 分間洗

浄してください。同じ操作を繰り返してください。

3.9 ホルムアルデヒドを 4%含む PBS 溶液中、室温で 15 分間組織切片の 2 回目の固定を行ってください。固定が完了したら、組織切片を 1 回以上 PBS で洗浄してください。Zenon® Fab フラグメントは、一次抗体に共有結合しているわけではないため、この 2 回目の固定を行わないと、時間と共に解離します。特に多色アプリケーションでは、他の一次抗体に移動することさえあります。

3.10 必要に応じて、核酸染色剤（Hoechst 33342、DAPI または SYTOX® Green 染色剤等）または他の標識試薬（フルオロフォア標識ファロイジン等）で組織切片を対比染色してください。各染色工程の後には必ず PBS で洗浄を行ってください。

3.11 組織切片を適切なアンチフェード封入剤にて封入し（ProLong®アンチフェード試薬、製品番号 P36930 を使用してください）、適切なフィルターを用いて蛍光を観察してください。

フローサイトメトリー

以下に示すプロトコールは、末梢血単核細胞の染色用に開発されたものですが、他のタイプの細胞または全血サンプルにも容易に応用できます。十分な量の標的が存在する一次抗体の場合には、Zenon®標識試薬（Fab）と抗体のモル比が 3 : 1 となる条件で Zenon®標識複合体を形成させるのが適切です。標的が少量の場合にはモル比を増加させる必要があります。Zenon®テクノロジーによって標識した抗体を用いる場合には Fc ブロッキングの工程が不要であることに注目してください。

4.1 細胞懸濁液または血液サンプルを任意の方法で調製してください。

4.2 培養細胞（ 1×10^6 細胞/mL）100 µL または全血サンプル 100 µL をフローサイトメトリーチューブに添加してください。

4.3 （オプション）4%のホルムアルデヒドを含む PBS 溶液中、室温で細胞試料を 15 分間固定してください。細胞試料を PBS で洗浄し遠心分離操作によって細胞をペレット化し、上清を廃棄してください。細胞を残りのバッファーに再懸濁してください。**注意：**本工程および以降の工程は、細胞内マーカーを検出する場合にのみ必要です。細胞表面に対する抗体と細胞内マーカーに対する抗体を一つの実験で同時に用いる場合には、先に細胞表面マーカーの染色を行ってから、本工程および 4.4~4.7 の工程に従って細胞内マーカーの染色を行ってください。

4.4 (オプション) Triton® X-100 を 0.1%含む PBS 中、室温で 5 分間細胞試料をインキュベートし、透過処理を行ってください。細胞サンプルを PBS で洗浄し、遠心分離操作によって細胞をペレット化し、上清を廃棄してください。細胞を残りのバッファーに再懸濁してください。

4.5 一次抗体 1 µg を、上記の Zenon® 複合体の形成に従って標識してください。

4.6 Zenon® 標識混合溶液 (ステップ 4.5 で調製したもの) の全量をサンプルチューブに添加してください。**注意**：全血サンプルを用いる場合、赤血球溶解を行うのは、細胞染色の前後どちらでも構いません (ステップ 4.6~4.7)。

4.7 サンプルを室温で 30 分間インキュベートしてください。フルオロフォアを用いた Zenon® 標識試薬は、インキュベーション中遮光する必要があります。インキュベーションが完了したら、遠心分離操作によって細胞をペレット化し、上清を廃棄してください。細胞を残りのバッファーに再懸濁してください。イメージングアプリケーションに必要な染色後の固定は、フローサイトメトリーにおいては必要ありません。

4.8 適切な装置パラメータを用いて、試料の分析を行ってください。

注

[A] 標識プロトコールにおいて使用する Zenon® マウス IgG 標識試薬の量を決定する際、Fab と抗体の比は重要な因子です。すべての Zenon® Mouse IgG Labeling Kit に付属の Zenon® 標識試薬は、Fab フラグメントの質量に基づき、200 µg/mL の濃度で提供されます。Fab フラグメントの分子量は約 50 kDa、一方 intact な IgG の分子量は約 150 kDa です。したがって、すべての Zenon® 標識試薬において、その 5 µL をマウス IgG 抗体 1 µg と混合すると Fab と抗体のモル比は、3 : 1 となります。

[B] 標識する抗体の量または Fab と抗体のモル比を調節する際には、常に同量の Zenon® 標識試薬と Zenon® ブロッキング試薬を使用することが重

要です。例えば、使用する Zenon® 標識試薬の量を 10 µL に増加した場合は、Zenon® ブロッキング試薬の量も 10 µL に増加させてください。抗体 1 µg あたり Zenon® 標識試薬 10 µL を添加すること (モル比は 6 : 1 となります) により、しばしば測定シグナルが約 50% 増加することに注目してください。モル比をこれ以上増加させても、シグナル強度の増加幅は減少していきます。

[C] マウス IgG の濃度が特定されていない場合は、提供先に問い合わせ、少なくとも IgG のおよその含有量に関する情報を入手してください。提供先に問い合わせても濃度が分からない場合には、Zenon® 標識試薬による滴定を行って最適な標識条件を決定する必要があります。

[D] 製造元から入手できるモノクローナル抗体は、通常、精製した IgG 画分、腹水またはハイブリドーマ上清として提供されています。未精製の一次抗体でも、Zenon® マウス IgG 標識試薬で標識することが可能で、非特異的 IgG や血清タンパク質を除去する必要はありません。ステップ 1.2 において Zenon® 標識試薬の適切な添加量を、標識する試料中の IgG 総量を用いて決定することが必要です。IgG 1 µg あたり Zenon® マウス IgG 標識試薬 5 µL を使用してください。非特異的 IgG も特異的 IgG と同時に標識されますが、標識された非特異的 IgG は、試料を染色しても検出可能なほどではなく、染色工程において洗い流されます。

[E] マウスの細胞または組織を使用せず、また単一標識の抗体のみが必要なアプリケーションの場合、標識プロトコールのステップ 1.4 および 1.5 (ブロッキング試薬の添加) を省略できます。複合体化していない Zenon® 標識試薬の強度は低く、バックグラウンド強度を増加させることはありません。

[F] 標識複合体を長期間保存する場合、標識手順をステップ 1.3 で中断してください。この段階であれば、2 mM のアジ化ナトリウムを保存剤として用いることで、複合体を 4°C で数週間保存することができます。保存しておいたコンジュゲートを使用する際には、プロトコールのステップ 1.4 および 1.5 を完了してからコンジュゲートを実験試料に添加してください。

Contact Information

Molecular Probes, Inc.
29851 Willow Creek Road
Eugene, OR 97402
Phone: (541) 465-8300
Fax: (541) 335-0504

Customer Service:
6:00 am to 4:30 pm (Pacific Time)
Phone: (541) 335-0338
Fax: (541) 335-0305
probesorder@invitrogen.com

Toll-Free Ordering for USA:
Order Phone: (800) 438-2209
Order Fax: (800) 438-0228

Technical Service:
8:00 am to 4:00 pm (Pacific Time)
Phone: (541) 335-0353
Toll-Free (800) 438-2209
Fax: (541) 335-0238
probestech@invitrogen.com

Invitrogen European Headquarters
Invitrogen, Ltd.
3 Fountain Drive
Inchinnan Business Park
Paisley PA4 9RF, UK
Phone: +44 (0) 141 814 6100
Fax: +44 (0) 141 814 6260
Email: euroinfo@invitrogen.com
Technical Services: eurotech@invitrogen.com

For country-specific contact information,
visit www.invitrogen.com.

Further information on Molecular Probes products, including product bibliographies, is available from your local distributor or directly from Molecular Probes. Customers in Europe, Africa and the Middle East should contact our office in Paisley, United Kingdom. All others should contact our Technical Service Department in Eugene, Oregon.

Molecular Probes products are high-quality reagents and materials intended for research purposes only. These products must be used by, or directly under the supervision of, a technically qualified individual experienced in handling potentially hazardous chemicals. Please read the Material Safety Data Sheet provided for each product; other regulatory considerations may apply.

Limited Use Label License No. 223: Labeling and Detection Technology

The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) to not transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of the above patents based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, Tel: (541) 465-8300, Fax: (541) 335-0354.

Several Molecular Probes products and product applications are covered by U.S. and foreign patents and patents pending. All names containing the designation ® are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Copyright 2008, Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice.