

APEX™ Antibody Labeling Kits

Table 1. Contents and storage information.

Material	Amount	Concentration	Storage*	Stability
Reactive fluorescent label (Component A)	5 vials	Not applicable	<ul style="list-style-type: none"> • 2–6°C • Desiccate • Protect from light • Do not freeze 	When stored as directed this kit is stable for 6 months.
APEX™ antibody labeling tips (Component B)	5 each			
wash buffer (Component C)	1.8 mL	0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.5, 2 mM azide		
dimethylsulfoxide (DMSO, Component D)	100 µL	Not applicable		
labeling buffer (Component E)		50 mM borate buffer, pH 8.3		
neutralization buffer (Component F)		1 M Tris, pH 9.0		
elution buffer (Component G)	1 mL	0.2 M acetic acid, pH 3.3		
elution syringe (Component H)	1 each	Not applicable		

*受領時にキット全てを保存する際、これらの保存条件が適切です。各コンポーネントの最適な保管条件については、個々のコンポーネントのラベルをご参照ください。

アッセイ数: 以下のプロトコルに基づいて、10-20 µgのIgG抗体の標識5回分に十分な材料が供給されています。

おおよその最大励起波長/最大蛍光波長: 表2を参照。

序論

APEX™ Antibody Labeling Kit は、少量のIgG抗体(約10~20 µg)に蛍光色素を共有結合で結合するのに便利な方法を提供しています。蛍光色素を直接標識された一次抗体は、バックグラウンドの蛍光をより低くする、また非特異的結合が少ないといった特徴を示します。更に、同じアイソタイプまたは、同じ生物種に由来する複数の一次抗体が組み合わせ可能な蛍光色素で直接標識されている場合は、同じ実験に容易に用いることができます。IgG抗体の多くは、少量でパッケージングされているのみの場合が多く、安定化タンパク質(例えばBSAのような)やその他の夾雑物が含まれていることがあり、蛍光色素を抗体に共有結合で結合する際に一般に使用されるアミン反応性標識試薬に干渉する可能性があります。しかし、これらの夾雑物の除去は、IgG抗体の大きなロスをもたらします。

APEX™ Antibody Labeling Kitは、APEX™ Antibody Labeling Tip (図1)の内部のレジンに、IgG抗体を捕捉する固相標識法を用いています。安定化タンパク質やアミン含有緩衝液を含む、すべての夾雑物は、チップを通して溶出されます。アミン反応性標識試薬(レジン上のIgG抗体への蛍光標識)を加えると、蛍光性IgG結合体が形成され、elution bufferを使用してレジンから溶出されます。蛍光性IgG結合体は、わずか2.5時間の作業時間で、イメージングまたはフローサイトメトリー分析に使用できる状態になります。この方法による標識抗体の典型的な収率は、40~80%の範囲です。

APEX™ Antibody Labeling Kitは、10-20 µgのIgG抗体に、Molecular Probesの優れた蛍光色素かbiotin-XXのうちの一つを標識する反応を5回行うのに必要となるすべての試薬を含みます。biotin-XX は抗体とbiotinとの間に 14原子のスペーサーがつきます。

始める前に

必要ですが、提供されていない材料

- 100-200 µL ピペット
- IgG抗体10–20 µg - リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、トリス緩衝生理食塩水(TBS)、Tris-HCl、HEPES、ホウ酸または同等の中性のpH緩衝液で、10 µL以内のもの(そのサンプルは、血清またはその他安定化タンパク質が含まれてもよいです)
- 微量遠心チューブ(1反応あたり2本)。

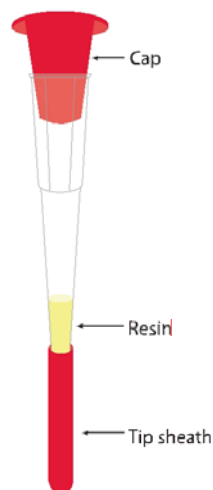


Figure 1. APEX™ antibody labeling tip.

表2 APEX™ Antibody Labeling Kitで提供される標識の分光特性およびアプリケーション。

Fluorophore label	Cat. no.	Excitation (nm)	Emission (nm)	Application
Alexa Fluor® 488	A10468	496	519	イメージングやフローサイトメトリーでの使用のための蛍光標識; anti-Alexa Fluor® 488抗体を用いたシグナル増幅用のハプテン。
Alexa Fluor® 555	A10470	555	565	イメージングでの使用のための蛍光標識。
Alexa Fluor® 568	A10494	578	603	
Alexa Fluor® 594	A10474	590	617	
Alexa Fluor® 647	A10475	650	665	イメージングやフローサイトメトリーでの使用のための蛍光標識。
Oregon Green® 488	A10476	496	524	イメージングやフローサイトメトリーでの使用のための蛍光標識; anti-fluorescein/Oregon Green®抗体を用いたシグナル増幅用のハプテン。
Pacific Blue™ dye	A10478	416	451	イメージングやフローサイトメトリーでの使用のための蛍光標識。
Biotin-XX	A10495	NA*	NA*	イメージングやフローサイトメトリーでの使用のための streptavidin, avidin あるいは neutravidin の結合パートナー。

警告 このキットに溶媒として提供されているDMSO (Component D)は、組織への有機分子の侵入を容易にすることが知られています。DMSOが含まれる試薬は、そのような材料が引き起こす危険に対して適切な器具、手順で取扱って下さい。各地域の規則を遵守して試薬を廃棄して下さい。

分光特性、およびアプリケーション 実験で最良の結果を出すには、色素の分光特性に、光源、励起フィルターおよび蛍光フィルタを合わせる必要があります。詳細は表2を参照してください。

実験プロトコール

抗体標識手順

APEX™ antibody labeling tip へのバッファーや抗体溶液を分注には、200 μ Lピペットを使用することをお勧めします。バッファーを標識チップの中に押し込む、あるいは標識チップ中にバッファーを通す場合は elution syringe (Component H)をお勧めします。ピペットと異なり、APEX™ antibody labeling tip に差し込んでプランジャーを押し込むことで、elution syringe は APEX™ antibody labeling tip への一定の圧力をかけられ、レジンビーズがかき乱されません。elution syringeはバッファーやレジンと接することはないので、5反応全てで利用できます。

カラム中(図2A)のゲルがかき乱されたり、空気が入ってしまうことを抑えるため、ゲルローディングチップを使用してAPEX™ antibody labeling tipのレジンの上部にbufferを加えます。レジンの上部にバッファーを加えた後に、APEX™ antibody labeling tip を200 μ L -ピペット(図2B)またはelution syringe (Component H)に取り付け、バッファーの上面がちょうど堆積しているレジンの上部に入るまで、バッファーをレジンに押し込みます。APEX™ Antibody labeling tipにバッファーを押し込む時、堆積したレジンの中に空気を入れないようにしてください。

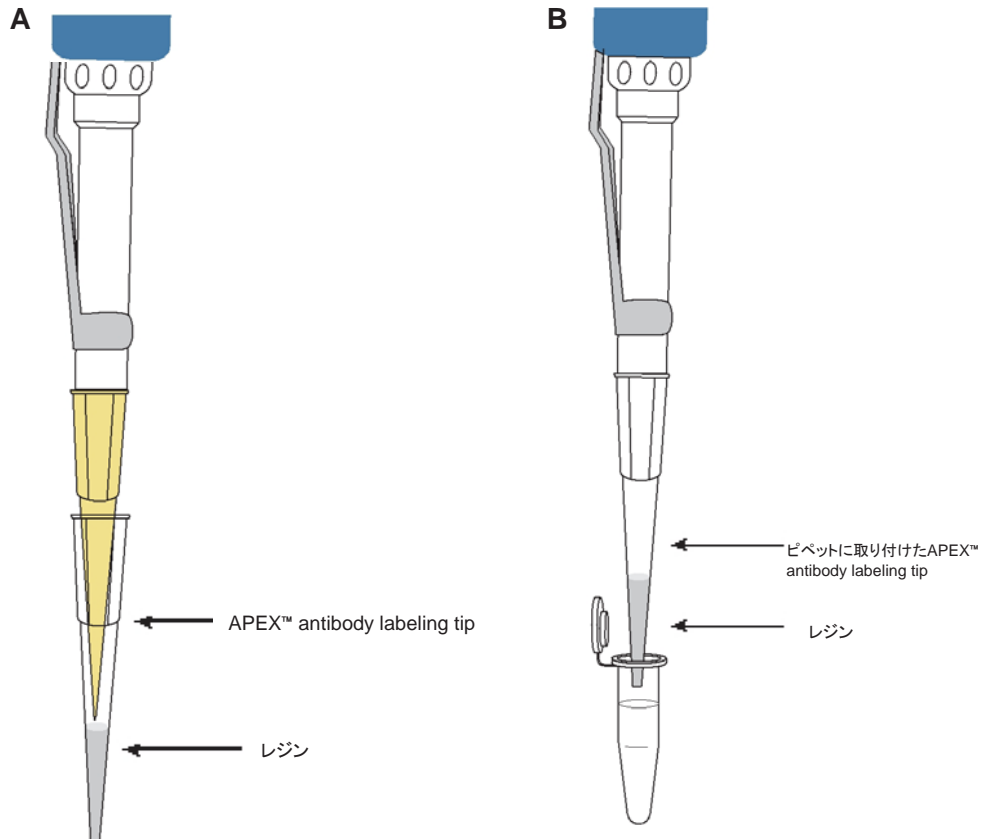


図2. APEX™ antibody labeling tipの使用法。パネルA:チップ内のレジンに溶液を加える。パネルB:ピペットにAPEX™ antibody labeling tipを取り付けてチップ内のレジンに溶液を押し込む。

1.1 APEX™ antibody labeling tip (Component B) をチップの底に全てのレジンを定着させるために、硬いところで静かにタップします。

1.2 APEX™ antibody labeling tip から両端のキャップを外し、そのlabeling tipを清浄なマイクロ遠心チューブに入れます。

1.3 ゲルローディングチップを用い、APEX™ antibody labeling tipのレジんに、100 µLの wash buffer (Component C)を加え、APEX™ antibody labeling tip (Component B)を水和させます(図2A)。

注記:もしelution syringe (Component H) の代わりにピペットを使用している場合は、レジンベッドがかき乱されないようにするため、プランジャーを解放する前にピペットを外してください。APEX™ antibody labeling tipを直接ピペットに取り付け、マイクロ遠心チューブ(図2B)に、wash bufferを静かにチップから送り出します。水和したレジンベッドの容積は、10-15 µLです。

1.4 IgG抗体溶液 10-20 µgをAPEX™ antibody labeling tip の上部に加え、次に、elution syringe (Component H) を用いてゆっくりと抗体溶液をレジんに押し込みます。抗体溶液の容量は、10 µLを超えてはいけません。抗体溶液をカラムの上へ押し出すと、チップから一滴溶出する場合があります。この溶出液は廃棄物として捨てます。

1.5 reactive dye (Component A)のバイアルに、以下を追加します。

- 2 µLのDMSO (Component D);ピペットを上下して溶かします。
- 18 µLのLabeling buffer (Component E);ピペットを上下して溶かします。

1.6 Step 1.5のreactive dye 10 µLをレジンの上加え、次にゆっくりと溶液をチップに押し込みます。少量の色素が、チップから溶出する場合があります。この溶出液を廃棄物として捨てます。

1.7 チップを室温で2時間、または4°Cで一晩インキュベートします。

1.8 APEX™ antibody labeling tip を各50 µLで2回洗浄するため、wash buffer (Component C) 50 µLをレジンの上から加え、次にマイクロ遠心チューブ内へチップから押し通します。

1.9 清浄なマイクロ遠心チューブに、10 µL neutralization buffer (Component F)を加えます。

1.10 neutralization buffer が含まれている微量遠心チューブにAPEX™ antibody labeling tipを置き、レジンの上に40 µLのelution buffer (Component G)を加えます。neutralization buffer を含んだ微量遠心チューブに標識された抗体が溶出されるよう、チップを押し通します。

注記:正しいpHを確保するために、neutralization buffer とelution bufferの比率は、1:4に維持する必要があります。溶出は、20~40 µLのelution bufferを用いて実施できます。溶出量を減少させると、抗体濃度が高くなる可能性があります。全抗体収量は減少します。

1.11 中和を確実にするために、標識抗体溶液を混合します。最終溶出液量は、~50 µLです。標識抗体溶液を含むマイクロ微量遠心チューブにキャップをして、使用するまで、チューブを氷の上に置きます。標識抗体は、イメージングやフローサイトメトリーですぐに使用できる状態であり、また抗体を保存することもできます(以下を参照)。

バイオハザード廃棄物として、APEX™ antibody labeling tip を廃棄します。APEX™ antibody labeling tipは再利用しないでください。

標識抗体の保存

標識抗体溶液は、elution/neutralization buffer 中において4°Cで短期間保存できます(最長2週間まで)。長期保存の場合、透析またはゲルろ過により、PBSまたは同等の緩衝液の保存バッファに交換し、-20°Cで保存します。必要に応じて、標識抗体溶液にBSAのような他の安定剤を加えることもできます。

標識キット

インビトロジェンでは、少量のIgG抗体の標識、大量のIgG抗体の標識、あるいは >30 kDaのタンパク質の標識のために最適化されたいくつかの抗体およびタンパク質標識キットを提供しています(Table 3)。

Table 3. Antibody and protein labeling kits from Invitrogen.

IgGの量	製品	特徴
<1–20 µg	Zenon IgG Labeling Kit	<ul style="list-style-type: none"> ・10分間で使用できる標識抗体を調製できる ・アイソタイプ特異的に標識 ・速い、非共有結合での標識 ・BSAのような安定化タンパク質存在下でも標識可能
10–20 µg	APEX™ Antibody Labeling Kit	<ul style="list-style-type: none"> ・2.5時間(~15分の作業時間)で使用できる標識抗体を調製できる ・共有結合の標識 ・BSAのような安定化タンパク質存在下でも標識可能
20–100 µg	Microscale Protein Labeling Kit	<ul style="list-style-type: none"> ・2時間(~30分の作業時間)で使用できる標識抗体 ・共有結合での標識 ・IgG抗体(~150 kDa)を含む、10~150 kDaのタンパク質に最適化 ・標識する前に、安定化タンパク質をサンプルから除去する必要がある
100 µg	Monoclonal Ant body Labeling Kit	<ul style="list-style-type: none"> ・90分(~15分の作業時間)で使用できる標識抗体を調製できる ・共有結合での標識 ・IgG抗体(~150 kDa)に最適化 ・標識する前に、安定化タンパク質をサンプルから除去する必要がある ・ポリクローナルIgG抗体およびモノクローナルIgG抗体を標識するために設計されている
1 mg	Protein Labeling Kit	<ul style="list-style-type: none"> ・2時間(~30分の作業時間)で使用できる標識抗体を調製できる ・共有結合での標識 ・IgG抗体(~150 kDa)に最適化 ・標識する前に、安定化タンパク質をサンプルから除去する必要がある

Product List 価格については、当社のウェブサイト、あるいはカスタマーサービスへお問い合わせ下さい。

Cat. no.	Product Name	Unit Size
A10468	APEX™ Alexa Fluor® 488 Antibody Labeling Kit	1 kit
A10470	APEX™ Alexa Fluor® 555 Antibody Labeling Kit.....	1 kit
A10474	APEX™ Alexa Fluor® 594 Antibody Labeling Kit	1 kit
A10475	APEX™ Alexa Fluor® 647 Antibody Labeling Kit	1 kit
A10476	APEX™ Oregon Green® 488 Antibody Labeling Kit	1 kit
A10478	APEX™ Pacific Blue™ Antibody Labeling Kit.....	1 kit
Related Products		
A11094	anti-Alexa Fluor® 488, rabbit IgG fraction *1 mg/mL*	0.5 mL
A889	anti-fluorescein/Oregon Green®, rabbit IgG fraction *1 mg/mL*	0.5 mL
A982	anti-fluorescein/Oregon Green®, rabbit IgG fraction, biotin-XX conjugate *1 mg/mL*	0.5 mL
A6413	anti-fluorescein/Oregon Green®, rabbit IgG Fab fragment *0.5 mg/mL*	0.5 mL
A6421	anti-fluorescein/Oregon Green®, mouse IgG _{2a} , monoclonal 4-4-20.....	0.5 mg
A11090	anti-fluorescein/Oregon Green®, rabbit IgG fraction, Alexa Fluor® 488 conjugate *1 mg/mL*.....	0.5 mL
A11091	anti-fluorescein/Oregon Green®, rabbit IgG fraction, Alexa Fluor® 594 conjugate *1 mg/mL*	0.5 mL
A11095	anti-fluorescein/Oregon Green®, goat IgG fraction *1 mg/mL*	0.5 mL
A11096	anti-fluorescein/Oregon Green®, goat IgG fraction, Alexa Fluor® 488 conjugate *1 mg/mL*	0.5 mL
A21250	anti-fluorescein/Oregon Green®, rabbit IgG fraction, R-phycoerythrin conjugate *2 mg/mL*	250 µL
A21253	anti-fluorescein/Oregon Green®, rabbit IgG fraction, horseradish peroxidase conjugate.....	0.5 mg
Q10137MP	Qdot® 565 goat anti-fluorescein conjugate *2 µM* *whole IgG*.....	500 µL
Q15421MP	Qdot® 565 goat anti-fluorescein conjugate *2 µM* *whole IgG*.....	200 µL

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 2009, Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice.