

# Alexa Fluor® 488 Monoclonal Antibody Labeling Kit

表1.内容および保管情報。

Material	Amount	Storage*	Stability
Alexa Fluor® 488 reactive dye (Component A)	5 vials	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-6°C</li> <li>• 遮光</li> </ul>	表記通りに保存すれば、少なくとも3カ月間安定です。
Sodium bicarbonate (Component B)	~84 mg		
Purification resin, 30,000 MW size-exclusion resin in PBS, pH 7.2, plus 2 mM sodium azide (Component C)	~10 mL		
Spin columns (Component D)	5 columns		
Collection tubes (Component E)	5 tubes		

\*キットは上記の条件で保存できます。個々のコンポーネントの最適な保存条件は、バイアルまたはバッグについているラベルを参照してください。

**標識回数:** キットに含まれる5本のreactive dyeは1本あたり、最大100 µg のモノクローナル抗体の標識に対して最適化されています。

**最大励起波長と蛍光波長:** Alexa Fluor® 488 コンジュゲートで494/519 nm。

## 序章

Molecular Probeの Alexa Fluor® 488 Monoclonal Antibody Labeling Kitは優れたAlexa Fluor® 488色素で少量のモノクローナル抗体を標識する便利な手段を提供します。多くのモノクローナル抗体は少量で販売されていますが、このキットは1回の反応につき100 µgのモノクローナル抗体を標識するのに最適化されています。同じように少量のポリクローナル抗体または他のタンパク質(>30 kDa)も標識できます。より多量 (~1 mg) のタンパク質を標識する場合は、当社のAlexa Fluor® 488 Protein Labeling Kit (A10235)をお使い下さい。

蛍光スペクトル的にfluoresceinに類似するAlexa Fluor® 488色素は、fluoresceinコンジュゲートより明るく、光安定性が高いタンパク質コンジュゲートを生成します。さらに、fluoresceinとは異なりAlexa Fluor® 488色素の蛍光は、pH 4~10のpHに感受性がありません。Alexa Fluor® 488色素標識タンパク質の吸収および蛍光極大波長はそれぞれ約494 nm、519 nmです(図1)。

Alexa Fluor® 488 Monoclonal Antibody Labeling Kitには、5回の別々の標識反応を実施し、得られたコンジュゲートを精製するのに必要なものがすべて含まれています。Alexa Fluor® 488 reactive dye(図2)には、テトラフルオロフェニル(TFP)エステル部分があり、これはタンパク質の第一級アミンと効率的に反応して、安定な蛍光色素タンパク質コンジュゲートを形成します。キットに含まれる5本のreactive dyeは1本あたり、最大100 µg のモノクローナル抗体を標識するのに最適化されています。

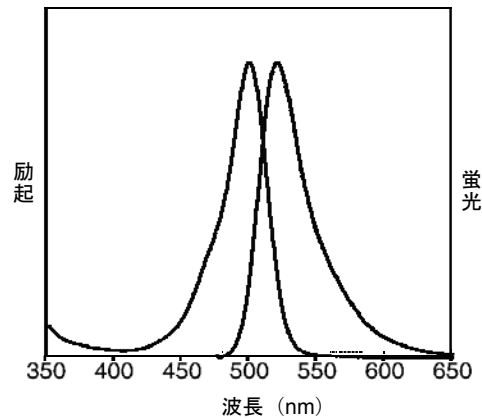


図1. pH 8の緩衝液中でヤギ抗マウスIgGに結合させた Alexa Fluor® 488色素のノーマライズされた蛍光励起および蛍光スペクトル

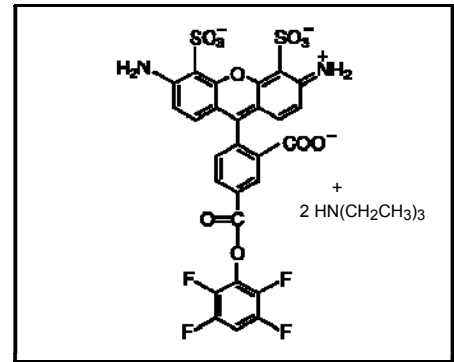


図2. Alexa Fluor® 488 carboxylic acid, TFP ester. bis (triethylammonium salt (MW ~885).

## 始める前に

### タンパク質の調製

#### 重要

緩衝液中にアンモニウムイオンまたは第一級アミンが含まれると、それらがモノクローナル抗体のアミノ基と競合するので、それらを含まない緩衝液に溶解させたモノクローナル抗体をお使い下さい。モノクローナル抗体以外のタンパク質を含む場合、あるいはアンモニウムイオンまたは第一級アミンを含む緩衝液(例えば、トリスまたはグリシン) から凍結乾燥したモノクローナル抗体の場合、または硫酸アンモニウムを用いて分画した場合には溶媒を微量透析によりリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に交換する必要があります。少量(例10-500 µL)のタンパク質用の微量透析器は、Pierce Chemical Company ([www.piercenet.com](http://www.piercenet.com))が提供しています。未精製抗体または牛血清アルブミン(BSA)やゼラチンで安定化させた抗体はうまく標識されません。低濃度のアジ化ナトリウム(≤3 mM) またはチメロサル(≤1 mM)はコンジュゲート反応に影響しません。

100 µgのモノクローナル抗体を標識するために、各反応は最適化されています。同量のポリクローナル抗体または他のタンパク質(>30 kDa)も標識できます。

#### 警告

DMSOは組織へ有機分子の浸透を促進する事が知られておりますので、DMSO stock solution は、特別の注意を払って取り扱ってください。この試薬を使用する際は、細心の注意と判断をもって行い、各地域の規則を遵守して色素を廃棄してください。

## 実験プロトコル

### タンパク質の標識

- 1.1 脱イオン水(dH<sub>2</sub>O) 1 mlを付属のsodium bicarbonate (Component B)のバイアルに加え、重炭酸ナトリウムの1 M溶液を調製します。完全に溶けるまで、ボルテックスまたはピペティングします。この1 M sodium bicarbonate溶液(pH ~8.3)は、2-6°Cにて最大2週間保存できます。
- 1.2 標識する抗体の濃度が≥1 mg/mLで、適切な緩衝液中にある場合(タンパク質の調製参照)、1 mg/mLに希釈してから、1/10量の1 M sodium bicarbonate溶液(ステップ1で調製)を加えます。

タンパク質が適当な緩衝液から凍結乾燥させた粉末である場合、タンパク質に0.1 M sodium bicarbonate溶液を適量添加して1 mg/mLの抗体溶液を作ります。0.1 M sodium bicarbonate溶液は、1 M sodium bicarbonate溶液を10倍量のdH<sub>2</sub>Oで希釈することで調製します。

TFPエステルがアルカリ性pHで効率的に反応するので、反応混合液のpHを上昇させるために、sodium bicarbonate(ph ~8.3)を加えます。

- 1.3 reactive dyeのバイアルにタンパク質溶液(ステップ1.2から)100 μLを移します。バイアルにキャップをして、数回静かに反転させ色素を完全に溶解させます。タンパク質溶液の激しい攪拌は、タンパク質変性をもたらす可能性があります。

色素が完全に溶けたことを、視覚的に確認するために、reactive dyeのバイアルのラベルを剥がすことをお勧め致します。

- 1.4 タンパク質溶液を室温で1時間インキュベートします。2つの反応物を混合し標識効率を高めるために、10-15分ごとにバイアルを静かに数回反転します。

インキュベーション中に、標識タンパク質の精製用のスピncラムを用意するために、2.1-2.4のステップに進みます。これは、15分程度かかります。

## 標識タンパク質の精製

---

- 2.1 スピncラムを13 × 100 mmガラスチューブに入れます。
- 2.2 purification resin (Component C)をかき混ぜ、その懸濁液1 mlをカラムに添加し、定着させます。
- 2.3 ベッド体積が~1.5 mLになるまで、さらに懸濁液を添加し続けます。
- 2.4 カラム緩衝液を重力によってカラムから流出させます。最初に緩衝液の最初の数滴が溶出するのに、すこし圧力を加える必要があるかもしれません。付属のコレクションチューブの一つにスピncラムを置き、スイング型バケットローターを使って1100 × gで3分間カラムを遠心します。回転数(rpm)を相対遠心力(g-フォース)に変換するためには遠心分離機メーカーによって提供される換算表を調べるか、次の式を用います。
$$\text{相対遠心力} = (1.12 \times 10^{-5}) \times (\text{rpm})^2 \times (\text{半径})$$
ここでは、半径=遠心機スピンドルの中心から回転バケットの底まで測定したセンチでの半径です。溶出した緩衝液を捨ててコレクションチューブを保管します。これでコンジュゲートした抗体を精製するスピncラムの準備ができました。

スイング型バケットローターが使用可能ではない場合、固定アングルローターをお使い下さい。
- 2.5 100 μLのタンパク質反応溶液(ステップ1.4から)をスピncラムの中心に滴下してロードします。溶液をゲルベッドに吸収させます。
- 2.6 スピncラムを空のコレクションチューブに入れ、1100 × gで5分間遠心します。
- 2.7 遠心分離の後、コレクションチューブには、約100 μLのPBS、pH 7.2、2 mM アジ化ナトリウム中の標識タンパク質が入っているはずですが、遊離色素は、カラムベッドに残ります。スピncラムは廃棄します。

## 標識率を決定する

---

3.1 PBSまたは他の適切な緩衝液に少量の精製されたコンジュゲートを希釈し、280 nm( $A_{280}$ )と494 nm( $A_{494}$ )の両波長で、1 cm光路キュベット中の吸光度を測定します。

3.2 サンプル中のタンパク質の濃度を計算します:

$$\text{タンパク質濃度}(M) = \frac{[A_{280} - (A_{494} \times 0.11)] \times \text{希釈係数}}{203,000}$$

ここで、203,000は、280 nmでの典型的なIgG のモル吸光係数( $\epsilon$ ,  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )で、0.11は280 nmの吸光度における蛍光色素の影響を補正する係数です。

3.3 標識の程度を計算します。

$$\text{タンパク質1モルあたりのモル色素} = \frac{A_{494} \times \text{希釈係数}}{71,000 \times \text{タンパク質濃度}(M)}$$

ここで、71,000  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ は494 nmでのAlexa Fluor® 488 色素のおおよそのモル吸光係数です。IgGの場合、抗体1モルあたり4-9 molのAlexa Fluor® 488色素で標識されることが最適であると考えられます。

## コンジュゲートの保存

---

標識タンパク質は、遮光して2-6°Cで保存します。精製されたタンパク質コンジュゲートの終濃度が1 mg/mL未満である場合、1-10 mg/mLでBSAまたはその他安定化タンパク質を加えます。2 mMアジ化ナトリウムの存在下では、コンジュゲートは、2-6°Cで数カ月間安定です。より長い期間の保存する場合、コンジュゲートを少量に分け、遮光して-20°C以下で冷凍しますが、凍結融解の繰返しは避けて下さい。

## トラブルシューティング

---

### 標識不足

計算で、タンパク質の標識が145,000 MWタンパク質1モルあたり、4モルの蛍光色素より有意に低い場合、そのタンパク質はおそらく標識不足です。多くの条件によって、タンパク質の標識が非効率になりえます。

- 緩衝液に含まれる1級アミン含有成分は色素に反応し、タンパク質標識効率を低下させます。標識に用いたタンパク質がアミン含有緩衝液中にあった場合(例 トリスまたはグリシン)、標識前にPBS に対して透析して下さい。
- タンパク質の希釈溶液( $\leq 1$  mg/mL) は効率的に標識されません。
- TFPエステル類が弱アルカリ性のpHで第一級アミンと最も効率的に反応するため、1 M sodium bicarbonate溶液の添加(ステップ1.2)は反応混合液のpHを~8まで上げるよう設計されています。タンパク質溶液がより低いpHで強く緩衝されている場合、sodium bicarbonate塩の添加では、最適なレベルまでpHが上がリません。この場合、さらにsodium bicarbonate塩を添加するか、反応開始前に0.1 M sodium bicarbonate溶液含有のPBS (pH 8.3) で透析(または別の方法)により緩衝液を交換して下さい。

- タンパク質(異なる抗体等)はそれぞれ異なる速度で蛍光色素と反応するため、また色素標識の割合でタンパク質の活性が変わる場合もあるため、標準プロトコルが必ずしも最適な標識につながるとは限りません。標識の量を増やすために、同じタンパク質サンプルを再標識することや、1回の反応に供するタンパク質の量を減らす事、反応色素の量を増やして新たなタンパク質サンプルを標識する事などをご検討下さい。反応における色素量を増やすには、2本の反応色素バイアルの中身を混ぜる事も可能です。一部の研究者は、まず室温で1時間インキュベートしてから4℃で一晩インキュベートして、良好な標識を得ています。

#### 過剰標識

タンパク質コンジュゲートの標識がIgG抗体1モルあたり9モルの蛍光色素より有意に大きい場合、そのタンパク質はおそらく過剰標識となっております。結合した色素分子の数が多いコンジュゲートはそのままお使いいただけるケースもありますが、過剰標識によりタンパク質コンジュゲートの凝集が引き起こされる場合もあり、その抗体の抗原に対する特異性も低下し、いずれも非特異的染色に至る場合があります。過剰標識は、またコンジュゲートの蛍光消光の原因になることもあります。標識の量を減らすには、反応時にさらに多くのタンパク質を加えてタンパク質に対する色素のモル比率を減らすか、反応時間を短くします。

#### 遊離色素の除去が不十分

付属のスピнкаラムによりタンパク質コンジュゲートから遊離色素を効率的に除去できますが、精製後のコンジュゲート溶液に微量の遊離色素が残ることもあります(薄層クロマトグラフィーによって判定できる)。遊離色素があると、標識率の計算値が誤って高くなることにつながります(標識率の判定参照)。残存する微量の遊離色素は、別のカラムにコンジュゲートを加えること、あるいは透析によって除去できます。

#### タンパク質またはタンパク質コンジュゲートがスピнкаラムに残る

タンパク質が遠心により溶出しなかった場合、追加の緩衝液をカラムに加えないで下さい。このような場合、タンパク質を溶出するために更に1回以上遠心して下さい。

**現在の価格はウェブサイトからあるいはカスタマーサポートへお問い合わせください。**

Cat #	Product Name	Unit Size
A20181	Alexa Fluor® 488 Monoclonal Antibody Labeling Kit *5 labelings*	1 kit

## 連絡先

---

**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

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 2006, Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice.