

# Zenon Rabbit IgG Labeling Kits

## Quick Facts

Storage upon receipt:

- 2-6°C
- Protect from light

Abs/Em: See Table 1

## 序論

Zenon™ウサギIgG標識キットは、マイクログラム以下の非常に少ない抗体からでも、抗体複合体を製造するための、迅速で汎用性の高い確実な方法を提供します。Zenon技術を使って形成される抗体複合体は、フローサイトメトリー、イメージング、ハイスループットおよび他のアプリケーションを含め、直接一次抗体に標識された抗体複合体が適するいかなるアプリケーションでも細胞を染色するために使用することができます。さらにこの技術は、以前は時間がかかるようなアプリケーションや、複数のウサギ由来の抗体を同時に用いて染色するプロトコールなど実現できなかったアプリケーションを単純化します。

ZenonウサギIgG標識キットは、全てのAlexa Fluor色素を含む品質の高い蛍光色素や、R-phycoerythrin, allophycocyaninといった一般的な蛍光色素や、酵素およびビオチンなど幅広いラインアップから必要なものを選ぶことができます(表1)。また、また3つの異なるZenonウサギIgG標識試薬を選ぶことができるZenon Tricolor ウサギIgG標識キットが2種類あります。

Zenon標識技術は、標識複合体を形成するためにIgGの一次抗体のFc領域に結合する蛍光色素分子、ビオチン、または酵素によって標識されたFabフラグメントを利用する技術です(図1)。標識Fabフラグメントは、一次抗体のFc領域に高い親和性と選択性を保つために、作製時にアフィニティー精製されています。Zenon標識法は抗原抗体反応に基づく方法なので、抗体との複合体を形成する前に、血清アルブミンなどの外来タンパク質やアミン含有バッファーなどの除去は必要ありません。他の動物種由来の抗体との交差反応性は、低くなっています。

Fab-抗体複合体の形成は5分未満で起こり、混合液中の一次抗体のほぼすべてが標識されます。この技術を利用して形成される複合体は、直接的に標識された一次抗体の蛍光強度や酵素活性と同様の活性を示します。加えて、抗体の標識の程度(プローブの蛍光強度または酵素活性など)は、加えるZenon標識試薬の量を変化させること、すなわち一次抗体に対する標識されたFabフラグメントのモル比を変化させることによって、調整することができます。

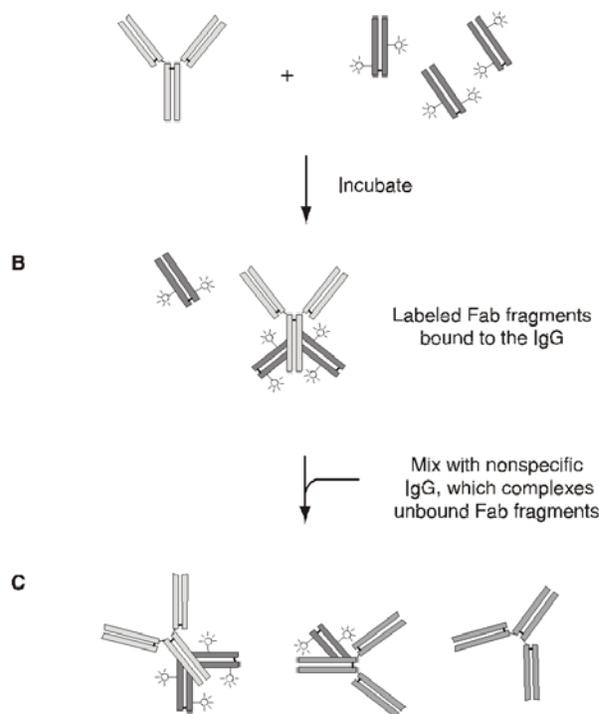


図1. Zenon標識スキーム。非標識IgGを、蛍光標識されたFabフラグメントを含むZenonラベリング試薬とインキュベートします(A)。標識FabフラグメントはIgG抗体のFc領域に結合し(B)、過剰なFabフラグメントは、非特異的IgGを加える事によって中和されます(C)。非特異的IgGの添加は、複数の同じタイプの一次抗体が存在する実験で、Fabフラグメントが二重に標識されるのを防ぎます。標識に使用されるFabフラグメントを蛍光分子に必ずしも結合しないが、かわりに酵素あるいはビオチンに結合する可能性があることにご注意ください。

Molecular Probes は、Zenonラベリング技術に特化したお問合わせ先(Zenon@probes.com)をご用意しております。これらの製品に関する技術的な質問またはご意見は、上記メールアドレス、またはテクニカルサポートまでお問い合わせください。

## 材料

ZenonウサギIgG標識キットは、各キットによって50回、25回または10回の標識用の十分な試薬を含んでいます(以下の「内容」欄をご参照ください)。1回の「標識」は、Fab:抗体のモル比率3:1で、アフィニティー精製されたインタクトなウサギIgG抗体1 µgを標識するのに必要なZenon標識試薬の量として定義されています(注釈A)。

表 1. Zenon ウサギ IgG 標識キット.

標識	最大励起波長/最大蛍光波長*	カタログ番号
<b>Alexa Fluor 色素</b>		
Alexa Fluor <sup>®</sup> 350	346/442	Z-25300
Alexa Fluor <sup>®</sup> 405	402/421	Z-25313
Alexa Fluor <sup>®</sup> 430	434/539	Z-25301
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	495/519	Z-25302
Alexa Fluor <sup>®</sup> 532	531/554	Z-25303
Alexa Fluor <sup>®</sup> 546	556/573	Z-25304
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555	555/565	Z-25305
Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	578/603	Z-25306
Alexa Fluor <sup>®</sup> 594	590/617	Z-25307
Alexa Fluor <sup>®</sup> 647	650/668	Z-25308
Alexa Fluor <sup>®</sup> 660	663/690	Z-25309
Alexa Fluor <sup>®</sup> 680	679/702	Z-25310
Alexa Fluor <sup>®</sup> 700	696/719	Z-25311
Alexa Fluor <sup>®</sup> 750	752/779	Z-25312
<b>一般的な蛍光色素とビオチン</b>		
Marina Blue <sup>®</sup>	365/460	Z-25340
Pacific Blue <sup>™</sup>	410/455	Z-25341
Fluorescein	494/518	Z-25342
Oregon Green <sup>®</sup> 488	496/524	Z-25343
Texas Red <sup>®</sup> -X	595/615	Z-25345
biotin-XX	NA	Z-25352
<b>R-phycoerythrin, allophycocyanin</b>		
R-phycoerythrin	496, 546, 565 †/578	Z-25355
Allophycocyanin	650/660	Z-25351
<b>酵素</b>		
Horseradish peroxidase	NA	Z-25354
Alkaline phosphatase	NA	Z-25350
<b>Tricolor Labeling Kits</b>		
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488, 555, 647 (Kit #1)	see above	Z-25360
Alexa Fluor <sup>®</sup> 350, 488, 594 (Kit #2)	see above	Z-25370

\* ナノメートル (nm) で示した概ねの最大励起波長および最大蛍光波長。†複数の吸収ピーク。NA=適用なし。

## 内容

低分子色素またはビオチンで標識するためのZenonウサギIgG標識キット。

- Zenon rabbit IgG labeling reagent (Component A), 250  $\mu$ L
- Zenon blocking reagent (rabbit IgG) (Component B), 250  $\mu$ L

50回分の標識に十分な試薬が含まれています。

R-phycoerythrin, allophycocyanin, または酵素で標識するためのZenonウサギIgG標識キット

- Zenon rabbit IgG labeling reagent (Component A), 125  $\mu$ L
- Zenon blocking reagent (rabbit IgG) (Component B), 125  $\mu$ L

25回分の標識に十分な試薬が含まれています。

## Zenon Tricolor ウサギIgG標識キット#1

- Zenon Alexa Fluor 488 rabbit IgG labeling reagent (Component A), 50  $\mu$ L
- Zenon Alexa Fluor 555 rabbit IgG labeling reagent (Component B), 50  $\mu$ L
- Zenon Alexa Fluor 647 rabbit IgG labeling reagent (Component C), 50  $\mu$ L
- Zenon blocking reagent (rabbit IgG) (Component D) (150  $\mu$ L)

それぞれの3種類の標識試薬が10回分の標識に十分な試薬が含まれています。

## Zenon TricolorウサギIgG標識キット#2

- Zenon Alexa Fluor 350 rabbit IgG labeling reagent (Component A), 50  $\mu$ L
- Zenon Alexa Fluor 488 rabbit IgG labeling reagent(Component B), 50  $\mu$ L
- Zenon Alexa Fluor 594 rabbit IgG labeling reagent (Component C), 50  $\mu$ L
- Zenon blocking reagent (rabbit IgG) (Component D), 150  $\mu$ L

それぞれの3種類の標識試薬が10回分の標識に十分な試薬が含まれています。

ZenonウサギIgG標識試薬は、ウサギIgG抗体のFcフラグメントに特異的に結合する標識されたヤギFabフラグメントです。低分子色素またはビオチンが結合したZenonウサギIgG標識試薬は、5 mMアジ化ナトリウムを含む、0.1Mのリン酸ナトリウム、0.1 M NaCl, pH 7.5の中に、200  $\mu$ gのFabフラグメント/mLの濃度で供給されています。R-phycoerythrin, allophycocyanin またはアルカリホスファターゼが結合したZenonウサギIgG標識試薬は、5 mM アジ化ナトリウムを含む、0.1Mのリン酸ナトリウム、0.1 M NaCl, pH 6.8の中に200 $\mu$ gのFabフラグメント/mLの濃度で供給される。西洋ワサビペルオキシダーゼが結合したZenonウサギIgG標識試薬は、0.02%チメロサルを含む、0.1Mのリン酸ナトリウム、0.1 M NaCl, pH 6.8の中に200  $\mu$ gのFabフラグメント/mLで供給されます。Zenonブロッキング試薬(ウサギIgG)は、5 mM アジ化ナトリウムを含んだ状態で、リン酸塩緩衝食塩水、pH 7.2の溶液中に5 mg/mlで供給されます。

## 保管およびハンドリング

受領時には、2~6°Cで全てのZenonウサギIgG標識キットを保管し、また蛍光成分を含む構成成分は光に当たらないように保管してください。長期保存する場合、低分子量の蛍光分子またはビオチンを含むZenonウサギIgG標識試薬およびZenonブロッキング試薬は1回分ごとに分注して、-20°C以下で凍結して保存できません。R-phycoerythrin, allophycocyanin、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ウサギIgG標識試薬は凍結しないでください。

## Zenon複合体形成

以下のプロトコルは、1  $\mu$ g の抗体にZenon ウサギIgG標識試薬を反応させ、モル比率を3:1になるようにするためのものです。このモル比はひとつの目安であり、大部分の用途で利用できる最小の割合です。十分なシグナルを得るために、個々の実験によっては、より高いモル比を必要とする場合があります(注記B)。より多くのまたは、より少ない量の抗体については、このプロトコルが定める試薬の量を抗体の量に従って調整することができます。

ZenonウサギIgG標識反応では抗体製剤に含まれる可能性がある牛血清アルブミン(BSA)またはその他安定化タンパク質の除去は必要ありません。血清内に含まれる抗体も直接標識することができ、標識の前後に抗体を精製する必要はありません。

**1.1** リン酸緩衝生理食塩水(PBS)などの適切な緩衝液に抗体1 $\mu$ gを準備します。溶液の量が20  $\mu$ L以下であれば、量は重要ではありません。濃度が特定されていない抗体を使用する場合、注釈Cを参照してください。アフィニティ精製されていない抗体を使用する場合、注釈Dを参照してください。

**1.2** 抗体溶液に5 $\mu$ LのZenon rabbit IgG labeling reagent (Component A)を加えます。(Zenon Tricolor キットを使用する場合、Component A、BまたはCのうち目的の標識試薬を使用してください。)

**1.3** 室温で5分間混合物をインキュベートします。

**1.4** 反応混合物にZenon Blocking reagent (Component B) Zenon Tricolor Kit を使用している場合は Component Dを5 $\mu$ L加えます。1種類の標識抗体のみを使用する場合、注釈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。

複合体の準備が整ったら約30分以内にご使用ください。30分以上保存する必要がある場合は、注釈Fを参照してください。

---

## 一般的なアプリケーションチップ

**複合体の汎用性。**Zenon技術を使用して標識されたウサギIgG抗体は、直接的に標識された抗体が使用できるすべてのアプリケーションにおいて適することが予想されます。また複数のZenon試薬で標識された複数のウサギIgG抗体は、逐次的な染色または混合しての染色でも、ひとつの実験の中で使用できる可能性があります。

**複合体の安定性。**一旦、複合体が形成されて過剰のFabがブロッキング試薬で取り除かれた場合、標識複合体は約30分以内に使用してください。

**使用濃度。**直接的に標識された一次抗体がよく使用されるアプリケーションについては、Zenon技術を用いて標識された抗体は、一般に同様の濃度または高濃度(1.5から3倍)で使用できます。

**低シグナルまたはシグナル無し。**一次抗体が標的分子に結合するが、Zenonを用いて標識された抗体でシグナルが観察されないことが適切なコントロールで検証されている場合は、Fab:抗体モル比率を高めるためにZenon標識試薬を追加することによって、または(または上記に加えて)一次抗体の最終濃度を上げることによって、シグナルが増強されることがあります。3:1のモル比が多くの場合で適していますが、モル比率は6:1まで高めることが可能です。モル比率をさらに高めても、シグナル強度の大幅な増加は期待できません。

**標識の解離または移動。**標識Fabフラグメントは一次抗体に共有結合していないため、時間の経過とともに標識Fabフラグメントが解離してしまう可能性があります。また、複数のウサギIgG一次抗体を利用するアプリケーションでは、Fabフラグメントが1つの一次

抗体から別の一次抗体にゆっくり移動する可能性があります。Fabの解離を抑制するために、サンプルを染色後にホルムアルデヒドで固定することをお勧めします(下記の「染色アプリケーション」を参照してください)。

---

## 染色アプリケーション

以下のプロトコールは、Molecular Probesで開発したZenonウサギIgG標識試薬で標識された一次抗体を用いた細胞や組織の染色方法です。プロトコールはすべての実験状況に適用されない可能性がありますので、お客様にはこのプロトコールをご要望に応じて条件検討いただけることをお勧めいたします。

### 免疫細胞化学

このプロトコールは、ウシ肺動脈内皮細胞(BPAE)、ホエジカおよびMadin-Darby イヌ腎細胞(MDCK)など、数多くの細胞株で染色に成功したプロトコールです。豊富なターゲットに対する一次抗体については、Zenon Labeling Reagent (Fab):抗体が3:1のモル比で形成されるZenon標識化複合体を使用することがふさわしく、より少ないターゲットについては、6:1のモル比率を推奨します。

**2.1** 適切な培地にて細胞を培養してください。接着細胞を用いた顕微鏡による観察を目的とする場合、直接スライドガラスまたはカバースリップ上での培養が適切かもしれません。染色中の全工程においてスライドまたはカバーガラスを乾燥させてはなりません。

**2.2** 4%ホルムアルデヒド - PBS溶液を用いて室温で15分間で細胞サンプルを固定します。またはかわりに、サンプルを5% CO<sub>2</sub>のもと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。後者の固定法では細胞骨格形態をよりよく保存することが観察されています。

**2.3** PBSで細胞サンプルを数回洗浄します。

**2.4** 常温で5分間、0.1% Triton X-100を含むPBS中の試料をインキュベートすることによって細胞を透過処理します。界面活性剤溶液を除去します。

**2.5** 10%正常ヤギ血清(NGS)を含むPBS中で30分間インキュベートし、細胞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複合体作製法によって調製した)Zenon標識複合体を10%NGSを含むPBS中で所望の使用濃度にまで希釈し、細胞試料が浸漬される十分な量を適用します。2種類以上のZenon標識複合体で着色する場合、すべての複合体はひとつの染色溶液中にまとめることができます。逐次染色は必要ではありません。二次検出試薬を使用した方法で一次抗体の濃度がすでに最適化されたシステムでは、Zenon染色法で標識された一次抗体を1.5から3倍高い濃度で使用してください。そのような情報がない場合は、適切な使用濃度を実験的に決定する必要があります。

**2.7** 30-60分間、細胞サンプルを室温でインキュベートしてください。蛍光が付加されたZenon標識試薬は、インキュベーションの間遮光してください。染色完了後、PBSで細胞標本を複数回洗浄します。

**2.8** 常温で15分間、PBSにおける4%ホルムアルデヒド溶液中で細胞サンプルの後固定を実行してください。固定完了時、PBSで細

胞標本を複数回洗浄します。この後固定工程がない場合、Zenon Fabフラグメントは一次抗体に共有結合していないため、経時的に解離する可能性があり、多色アプリケーションにおいては別の一次抗体に移動する可能性があります。単一の一次抗体を用いた実験の場合、この工程は必ずしも必要ありませんが、シグナル強度は総じて後固定の方が優れています。

**2.9** 必要に応じて、核酸染色(例えば、Hoechst 33342、DAPIまたはSYTOX Green 染色)あるいはその他標識試薬(例えば蛍光標識されたファロイジン)で細胞サンプルをカウンター染色し、PBSで洗浄してください。

**2.10** 必要であれば、細胞をスライドまたはカバースリップの上に沈着、もしくはフローチューブ中に移動します。顕微鏡で観察するサンプルについては、褪色防止封入剤(例えば、ProLong Antifade Kit; Cat. #P-7481)をマウントします。所望の方法でサンプルを分析、観察してください。

## 免疫組織化学

このプロトコールは、心臓灌流にて4%ホルムアルデヒドで固定した組織の厚さ10-12ミクロンの凍結切片用に設計されています。グルタルアルデヒドを含む固定剤を使用しないでください。グルタルアルデヒドの使用はサンプルの自家蛍光が増加し、タンパク質が過剰に架橋されるために、抗体のアクセスが妨げられたり、抗原が変性する可能性があります。可能であれば、組織へより確実に迅速に抗体を浸透させるために、なるべく薄い切片を使用してください。Zenon標識複合体はパラフィン包埋の切片についてテストや最適化は行っておりません。特定の低存在量の抗原は、従来の二次検出法を用いたときほど簡単にはZenon標識技術を使用しても検出されない可能性があります。またZenon法は組織標本中での非常に低存在量の標的分子用には推奨しておりませんのでご注意ください。

非特異的標識を評価するため、実験検体の標識と並行して、同一プロトコール中で一次抗体を使用せずに処理する陰性コントロールのサンプルも同時にとってください。Zenon標識法を用いて染色パターンの特異性を確認する予備試験の中に従来の二次検出法によって標識される陽性コントロールのサンプルを含めると良いです。

**3.1** 凍結組織切片を含んでいるスライドグラスを室温(通常15-30分)で融解します。必要であれば、PAPペンで切片の周りの長方形を描いてください。

**3.2** 室温で15分間PBS中で切片を親水化します。この染色手順以降のステップのいかなるポイントでも切片を乾燥させてはなりません。

**3.3** 室温で20分間、0.2%Triton X-100を含むPBS(PBT)中で切片の浸透化処理を行います。

**3.4** 室温で30分間、0.2%BSAおよび5%非働化正常ヤギ血清を含むPBTを用いて、非特異的結合部位をブロックします。代替の方法として、血清の代わりに1% BSAを用いることができます。インキュベーション完了後すぐに、ブロッキング緩衝液を除去してください。

**3.5** ZenonウサギIgG標識化複合体(前述の「Zenon複合体形成」によって作製されたもの)をPBT中で所望の使用濃度まで希釈します。スライドグラス染色用トレイ中では、切片を覆うために、使用溶液の100~250 µLを使用します。最初の実験において

は、異なる濃度の一次抗体や、Zenon標識試薬(Fab)と抗体との異なるモル比の範囲を検証します。6:1のモル比率は組織染色についての推奨される初期濃度であり、一般に、Zenon標識方法は標準の二次検出法で使用される場合より高い濃度の一次抗体を必要とします。抗体浸透を図るために、染色緩衝液へ界面活性剤の添加は重要です。緩衝液PBTは前述のように、0.2%Triton X-100を含みます。しかし、組織透過化と界面活性剤抽出に対する抗原への影響との間でバランスをとるために、界面活性剤の選択および濃度(一般に0.1から0.5%)は、最適化される必要がある場合があります。

**3.6** 常温で1~2時間、加湿チャンバー内に入れた状態で染色溶液につけた切片をインキュベートします。蛍光分子を含むZenon標識試薬は、インキュベーションの間遮光してください。二種類以上のZenon標識複合体で染色する場合、すべての複合体を一つの染色溶液にまとめて染色することができます。逐次染色の必要はありません。インキュベーション時間を延長しないでください。より長いインキュベーション時間によって、Zenon Fabフラグメントがもともと結合していた一次抗体から解離するため、多色染色アプリケーションでのS/N比の低下や他の一次抗体へ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、常温で10から15分間PBT中で切片を洗浄します。さらに2回の追加洗浄を行います。洗浄ステップは、Coplin直立染色びんで行ってください。

**3.8** 室温でPBS中で5分間、染色組織切片を洗浄します。もう一度繰り返します。

**3.9** 常温で15分間PBS中の4%ホルムアルデヒド溶液の中で組織切片の後固定を行います。固定完了時、PBSで切片を一回以上洗浄します。この後固定工程無しでは、ZenonFabフラグメントは、一次抗体に共有結合していないため、経時的に解離する可能性があり、多色アプリケーションでは別の一次抗体に移動することさえ有り得ます。

**3.10** 必要であれば、核酸染色(例えば、Hoechst 33342、DAPIまたはSYTOX Green染色など)あるいはその他標識試薬(例えば蛍光標識されたファロイジンなど)を用いて組織サンプルを対比染色します。いかなる種類の染色後もPBSで洗浄します。

**3.11** 切片を褪色防止封入剤(例えば、ProLong Antifade Kit ; Cat. #P-7481)を用いてマウントし、該当するフィルターを使用して蛍光を観察します。

## フローサイトメトリー

以下のプロトコールは、末梢血単核球細胞染色法として開発されたものですが、他の細胞株あるいは全血試料にでも容易に適用できる場合があります。豊富なターゲットに対する一次抗体については、Zenon標識試薬(Fab):抗体のモル比3:1でのZenon標識化複合体を形成するのが適当です。少ないターゲットについては、モル比率を高めてください。使用抗体をZenon技術で標識した場合はFcブロッキングのステップが必要ないことに注意してください。

**4.1** 推奨されているとおりに細胞懸濁液または血液試料を調製します。

**4.2** 100 µLの培養細胞( $1 \times 10^6$ 細胞/mL) または、100 µLの全血サンプルをフローサイトメトリーのチューブに加ええます。

**4.3** (任意)室温で15分間PBS中の4%ホルムアルデヒド溶液で細胞サンプルを固定します。PBSで細胞サンプルを洗浄し、遠心分離で細胞をペレットにし、上澄みを静かにデカントで移します。細胞を残留緩衝液中で再懸濁します。**注記:**細胞内のマーカーを検出する時のみ、このステップと以下のステップが必要です。同じ実験で細胞表面と細胞内マーカーに対する抗体を同じ実験で使用する場合は、まず細胞表面マーカーの染色を行い、それから細胞内マーカーを染色するためにこのステップおよび4.4から4.7のステップを実行します。

**4.4** (任意)常温で5分間、0.1% Triton X-100を含むPBS中で試料をインキュベートすることで細胞サンプルを透過化処理します。PBSで細胞サンプルを洗浄し、遠心分離で細胞サンプルをペレットにし、上清を静かにデカントで移します。細胞を残った緩衝液中で再懸濁します。

**4.5** 先述の「Zenon複合体形成」によって1 $\mu$ gの一次抗体を標識します。

**4.6** サンプルチューブにZenon標識化混合物全体(ステップ4.5で調製されている)を加えます。**注記:**全血サンプルを使用する場合、細胞染色(ステップ4.6-4.7)の前後どちらかに、赤血球の溶解を行うことができます。

**4.7** 30分間室温でサンプルをインキュベートします。蛍光分子を含むZenon標識複合体の場合は、インキュベーションの間遮光してください。インキュベーション終了後、いったんPBSで細胞洗浄し、遠心分離して細胞をペレットにし、上清を静かにデカントで移します。細胞を残った緩衝液中で再懸濁します。染色後の固定は画像処理アプリケーションには必要ですが、フローサイトメトリーのアプリケーションには必要ありません。

**4.8** 適切な装置パラメーターを用いてサンプルを分析します。

---

## 製品の注意事項

**[A]** 標識プロトコールに使用するZenonウサギ標識試薬の量を決定する時、Fab:抗体の比が最も重要な因子です。すべてのZenonウサギIgG標識キットで、Zenon標識試薬がFabフラグメントの分子量に基づいて200  $\mu$ g/mlの濃度で提供されています。無傷のIgGの~150 kDaと同様に、Fabフラグメントは、~50 kDaの分子量を有しています。したがって、ウサギIgG抗体の1  $\mu$ gと混合するZenon標識試薬の5  $\mu$ Lは、Fab:抗体モル比が3:1になっています。

**[B]** 標識する抗体の量あるいはFab:抗体のモル比率を調整する場合、Zenon labeling reagent およびZenon blocking reagent を常に等量で使用する事が重要です。たとえば、反応に使用するZenon labeling reagentの量を10  $\mu$ Lに増量した場合、Zenon blocking reagent 量もまた10  $\mu$ Lに増量します。また抗体1  $\mu$ gにZenon labeling reagent 10  $\mu$ Lを加える(結果として6:1のモル比率をに)ると、しばしばシグナル強度が50%程度増強される場合があります。しかし、モル比率をさらに増やしても、蛍光強度の増加は僅かにしか得られない傾向があります。

**[C]** ウサギIgGの濃度が指定されない場合、販売元に連絡し、少なくともおおよそのIgGの濃度情報を得てください。濃度がわからない場合、最適な標識条件を得るため、Zenon標識試薬による力価測定を行う必要があります。

**[D]** 販売されている抗体は、一般にアフィニティ精製した画分、IgG画分、または血清で提供されます。アフィニティ精製されていない一次抗体は、Zenon rabbit IgG labeling reagent を使用して標識できる可能性があり、また非特異的IgGまたは血清タンパク質の除去を必要としません。ステップ1.2で加えるZenon標識試薬の適切な量は標識される試料中の総IgG質量を用いることによって決定されます。すなわち、Zenon rabbit IgG labeling reagent 5  $\mu$ Lは、IgG 1  $\mu$ gごとに使用することを推奨しています。非特異的IgGも、特異的IgGと同様に標識されますが、標識された非特異的IgGは、目につくほどサンプルを染色することなく、染色のプロセス中に洗浄されてしまうと思われます。

**[E]** ウサギの細胞または組織を使用しない場合、またアプリケーションが単に単独の標識抗体を必要とする場合、標識プロトコールのステップ1.4および1.5 (blocking reagent の添加)は省略することができます。複合体を形成していないZenon標識試薬の濃度は、十分に低く、高いバックグラウンドレベルを生じることはないと思われま

**[F]** 標識複合体を長期間保存したい場合、プロトコールのステップ1.3で標識化処理を停止してください。この段階で、複合体は、保存剤として2 mM アジ化ナトリウムを添加することによって、4°Cで数週間保存することができます。複合体を用いる準備ができた時、実験試料に複合体を用いる前に、標識プロトコールのステップ1.4および1.5を完了してください。

---

**Product List** Current prices may be obtained from our Web site or from our Customer Service Department.

Cat #	Product Name	Unit Size
Z-25300	Zenon™ Alexa Fluor® 350 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25313	Zenon™ Alexa Fluor® 405 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25301	Zenon™ Alexa Fluor® 430 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25302	Zenon™ Alexa Fluor® 488 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25303	Zenon™ Alexa Fluor® 532 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25304	Zenon™ Alexa Fluor® 546 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25305	Zenon™ Alexa Fluor® 555 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25306	Zenon™ Alexa Fluor® 568 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25307	Zenon™ Alexa Fluor® 594 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25308	Zenon™ Alexa Fluor® 647 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25309	Zenon™ Alexa Fluor® 660 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25310	Zenon™ Alexa Fluor® 680 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25311	Zenon™ Alexa Fluor® 700 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25312	Zenon™ Alexa Fluor® 750 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25350	Zenon™ Alkaline Phosphatase Rabbit IgG Labeling Kit *25 labelings* .....	1 kit
Z-25351	Zenon™ Allophycocyanin Rabbit IgG Labeling Kit *25 labelings* .....	1 kit
Z-25352	Zenon™ Biotin-XX Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25342	Zenon™ Fluorescein Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25354	Zenon™ Horseradish Peroxidase Rabbit IgG Labeling Kit *25 labelings* .....	1 kit
Z-25340	Zenon™ Marina Blue® Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25343	Zenon™ Oregon Green® 488 Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25341	Zenon™ Pacific Blue™ Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25355	Zenon™ R-Phycoerythrin Rabbit IgG Labeling Kit *25 labelings* .....	1 kit
Z-25345	Zenon™ Texas Red® -X Rabbit IgG Labeling Kit *50 labelings* .....	1 kit
Z-25360	Zenon™ Tricolor Rabbit IgG Labeling Kit #1 *for green, orange and deep red fluorescence imaging* *3 x 10 labelings* ..	1 kit
Z-25370	Zenon™ Tricolor Rabbit IgG Labeling Kit #2 *for blue, green and red fluorescence imaging* *3 x 10 labelings* .....	1 kit

---

## Contact Information

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 Leiden, the Netherlands. All others should contact our Technical Assistance Department in Eugene, Oregon.

Please visit our Web site - [www.probes.com](http://www.probes.com) - for the most up-to-date information

Molecular Probes, Inc.  
29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402  
Phone: (541) 465-8300 • Fax: (541) 344-6504

Customer Service: 6:00 am to 4:30 pm (Pacific Time)  
Phone: (541) 465-8338 • Fax: (541) 344-6504 • [order@probes.com](mailto:order@probes.com)

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

Technical Assistance: 8:00 am to 4:00 pm (Pacific Time)  
Phone: (541) 465-8353 • Fax: (541) 465-4593 • [tech@probes.com](mailto:tech@probes.com)

Molecular Probes Europe BV  
PoortGebouw, Rijnsburgerweg 10  
2333 AA Leiden, The Netherlands  
Phone: +31-71-5233378 • Fax: +31-71-5233419

Customer Service: 9:00 to 16:30 (Central European Time)  
Phone: +31-71-5236850 • Fax: +31-71-5233419  
[eurorder@probes.nl](mailto:eurorder@probes.nl)

Technical Assistance: 9:00 to 16:30 (Central European Time)  
Phone: +31-71-5233431 • Fax: +31-71-5241883  
[eurotech@probes.nl](mailto:eurotech@probes.nl)

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.

Several of Molecular Probes' products and product applications are covered by U.S. and foreign patents and patents pending. Our products are not available for resale or other commercial uses without a specific agreement from Molecular Probes, Inc. We welcome inquiries about licensing the use of our dyes, trademarks or technologies. Please submit inquiries by e-mail to [busdev@probes.com](mailto:busdev@probes.com). All names containing the designation ® are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Copyright 2003, Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice.