

## アミノ化ヒアルロン酸ナトリウム (G2) の 5-Carboxylfluorescein N-Succinimidyl Ester による蛍光標識実施例

### 1. 留意事項

- 1) 標識剤としては、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルをお勧めします。
- 2) EDHA への標識効率は低いので、同程度の量の標識剤を必要とします。
- 3) 標識剤や使用目的に応じて、適宜、条件を変更してください。
- 4) 本実施例は予告なく変更される場合があります。

### 2. 試薬・試液

- 1) アミノ化ヒアルロン酸ナトリウム (G2) (以下、EDHA-G2)
- 2) 5-Carboxylfluorescein N-Succinimidyl Ester (以下、CF-NHS)
- 3) 50mmol/L の四ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH8.3) (以下、緩衝液)
- 4) 脱水済みジメチルスルホキシド (以下、DMSO)
- 5) エタノール (以下、EtOH)
- 6) 4mol/L の塩化ナトリウム水溶液 (以下、4M\_NaCl 液)
- 7) 生理食塩液
- 8) 1mol/L の水酸化ナトリウム水溶液 (以下、1N\_NaOH 液)
- 9) 3mol/L の酢酸水溶液 (以下、3M\_酢酸液)

### 3. 標識手順

#### 3-1. 準備

- 1) EDHA-G2 の 1 バイアルに、3mL の緩衝液を加え、乾燥物を溶解する。EDHA-G 液とする。
- 2) 約 1mg の CF-NHS を秤取りし、終濃度 20mg/mL になるように DMSO で溶解する。添加直前に調製する。CF-NHS 液とする。

#### 3-2. 反応

- 1) 1mL の EDHA-G 液を 15mL 容の遠心チューブに採取後、50  $\mu$ L の CF-NHS 液を添加し、直ちに攪拌混合する。
- 2) 37°C で 2 時間、放置する。

#### 3-3. EtOH 沈殿 (1 回目)、洗浄

- 1) 40  $\mu$ L の 4M\_NaCl 液を加え、混合する (沈殿を確実に生成させるために、塩化ナトリウムを加えます)。
- 2) 4mL の EtOH を加え、5-Carboxylfluorescein 標識ヒアルロン酸 (以下、CFHA) を沈殿させる。
- 3) 600  $\times$  g で 10 分間、遠心分離し、上清を除去する。

- 4) 2mLのEtOHを加え、Vortex等を用いて激しく攪拌し、沈殿を洗浄する。
- 5) 必要に応じて遠心分離し、上清を除去する。
- 6) 同様の洗浄操作をもう一度、繰り返す。

### 3-4. アルカリ処理\*、EtOH沈殿（2回目）、洗浄、乾燥

\*アルカリ処理は結合したCF以外の蛍光不純物を除くとともにナトリウム塩にするために実施します。

- 1) 1mLの生理食塩液を加え、Vortex等を用いて激しく攪拌し、沈殿を溶解する。溶解には時間を要する。
- 2) 100 $\mu$ Lの1N\_NaOH液を加え、直ちに、Vortex等を用いて激しく攪拌後、1分間放置する。長時間、アルカリ状態にさらされると低分子化するので、1分間は厳守してください。
- 3) 300 $\mu$ Lの1M\_酢酸液を加え、攪拌、混合することにより中和する。
- 4) 4mLのEtOHを加え、CFHAを沈殿させる。
- 5) 600 $\times$ gで10分間、遠心分離し、上清を除去する。
- 6) 2mLのEtOHを加え、Vortex等を用いて激しく攪拌し、沈殿を洗浄する。
- 7) 必要に応じて遠心分離し、上清を除去する。
- 8) 同様の洗浄操作をもう一度、繰り返す。
- 9) 通気性のある蓋をし、遮光して、真空デシケータ等を用いて、減圧、乾燥する。

### 4. 標識結果

\* EDHA-G2、Lot. : 25B940、約1mgをCF標識した結果です。

	Result
Appearance	yellow—orange amorphous substance
Yield	53.5%
Mw measured by GPC	1806 $\times$ 10 <sup>3</sup>
Degree of Substitution*	1.0%
Detection Limit on a Trans-Illuminator	$\leq$ 50ng/spot (The image below)
Maximum Wavelength of Excitation	487nm
Maximum Wavelength of Emission	524nm

\*二糖単位に結合したCF基のモル百分率。1%の場合、100個の二糖単位（分子量約40 $\times$ 10<sup>3</sup>）に1個の蛍光基が導入されている。



50ng/spot

100ng/spot

200ng/spot

400ng/spot