

アミノ化ヒアルロン酸ナトリウム (U2) 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) 実用的な蛍光標識体を調製するためには EDHA-U の約 1/10 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 (U2) (以下、EDHA-U2)
- 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) 精製水
- 6) PD-10 (Cytiva 社)

3. 標識手順 (1mg スケール)

3-1. 準備

- 1) EDHA-U2 の 1 バイアルに、3mL の緩衝液を加え、乾燥物を溶解する。EDHA-U 液とする。
- 2) 終濃度 5mg/mL になるように CF-NHS を DMSO で溶解する。20 μ L 以上を添加直前に調製する。CF-NHS 液とする。

3-2. 反応

- 1) 1mL の EDHA-U 液を 1.5mL 容の遠心チューブに採取後、20 μ L の CF-NHS 液を添加し、直ちに攪拌混合する。
- 2) 37°C で 1 時間、放置する。

3-3. PD-10 処理、凍結乾燥

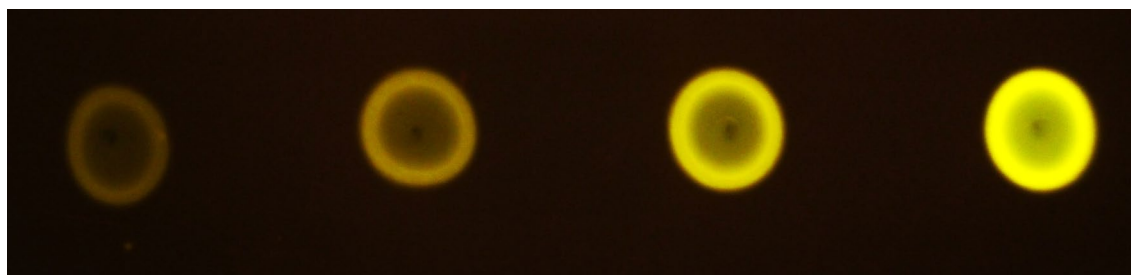
- 1) 反応液を PD-10 に負荷し、精製水で溶出することにより、EDHA と反応しなかった CF 及び塩類を除去する。
- 2) CF で標識された EDHA-U 画分を回収し、凍結乾燥する。

4. 標識結果

* EDHA-U2、Lot. : 25F968、約 1mg を CF 標識した結果です。

	Result
Appearance	yellow—orange amorphous substance
Yield	92.8%
Degree of Substitution*	3.4%
Detection Limit on a Trans-Illuminator	≤50ng/spot (The image below)
Maximum Wavelength of Excitation	488nm
Maximum Wavelength of Emission	525nm

* 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 40×10^3 ）に 1 個の蛍光基が導入されている。



50ng/spot

100ng/spot

200ng/spot

400ng/spot