

アミノ化ヒアルロン酸ナトリウム (3K2) 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-3K2 は pH8.5 以上の溶液中で不安定なので、標識時の溶媒の pH に留意してください。標識後はできるだけ速やかに溶液の pH を中性に調整してください。
- 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 (3K2) (以下、EDHA-3K2)
- 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-3K2 の 1 バイアルに、3mL の緩衝液を加え、乾燥物を溶解する。EDHA-3K 液とする。
- 2) 約 0.5mg の CF-NHS を終濃度 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-3K 液を 1.5mL 容の遠心チューブに採取後、17 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。

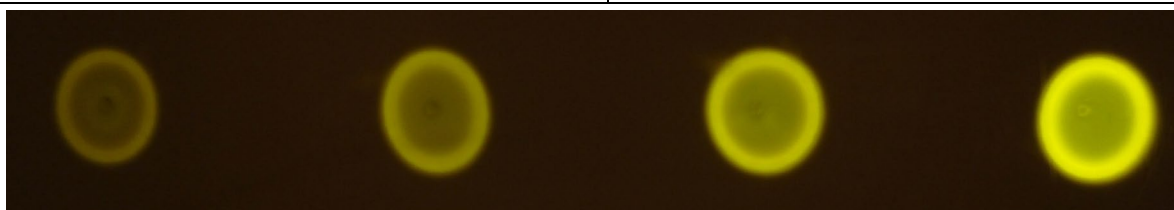
3-3. PD-10 処理、凍結乾燥

- 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-3K 画分を回収し、凍結乾燥する。

4. 標識結果

* EDHA-3K2、Lot. : 25F968、約 1mg を CF 標識した結果です。

	Result
Appearance	yellow—orange amorphous substance
Yield	92.7%
Mw measured by GPC	2.5×10^3
Introduction Rate of CF	0.6mol/HA mol
Detection Limit on a Trans-Illuminator	$\leq 5\text{ng/spot}$ (The image below)
Maximum Wavelength of Excitation	487nm
Maximum Wavelength of Emission	523nm
Fluorescent Purity on GPC	98.9%



5ng/spot

10ng/spot

20ng/spot

40ng/spot