

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、17μL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	≤5ng/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