

STELLA⁺ “Lysine Labeling Kit”

Introduction

The STELLA⁺ Lysine Labeling Kit is for selectively labeling lysine residue of protein (antibody), and localized lysine and/or other amino groups on cell surfaces.

Unlike the conventional labeling method with use of succinimidyl ester compound (NHS method), this kit is capable of rapid and efficient labeling at low concentrations by a newly developed ultra-high speed 6π-Azaelectrocyclization process of hexatriene-β-carbonyl compound.

Moreover, since it reacts only with the lysine residue on the protein surface and does not react with N-terminus amino group or lysine residue group, which is indispensable for interaction of receptors, it can perform labeling efficiently without inactivating the function of biomolecules or cells.

Caution Please do not use reagents containing amino groups or lysines while using the Labeling Kit.

Contents

- | | |
|--|--------------------------|
| 1. Lysine labeling unit..... | 3 peaces |
| 2. IBX- polystyrene..... | 3 peaces |
| 3. Filtration tube (0.45 μm) | 3 peaces |
| | *Uses by 12000G or less. |
| 4. Filtration tube (Molecular weight cut off 10,000) | 3 peaces |
| | *Uses by 14000G or less. |

Storage condition

Keep in cold storage. (0~5°C)

In addition to kit

Micro pipettes, Centrifuge for Micro tubes, Shaker (Mixer), Nitrogen-flow condenser or centrifugal condenser, Micro tube racks, Reagents: DMF, Methylene chloride(CH₂Cl₂), DMSO, Distilled water, Buffer solutions, etc.

Method of operation

This kit is conditioned so that the concentration of the labeling probe becomes 10⁻⁴M by adding 100μL of appropriate buffer solution or water in the Lysine labeling unit. For normal labeling, make preparation so that the concentration of the reagent is about 10 times that of the concentration of the sample.

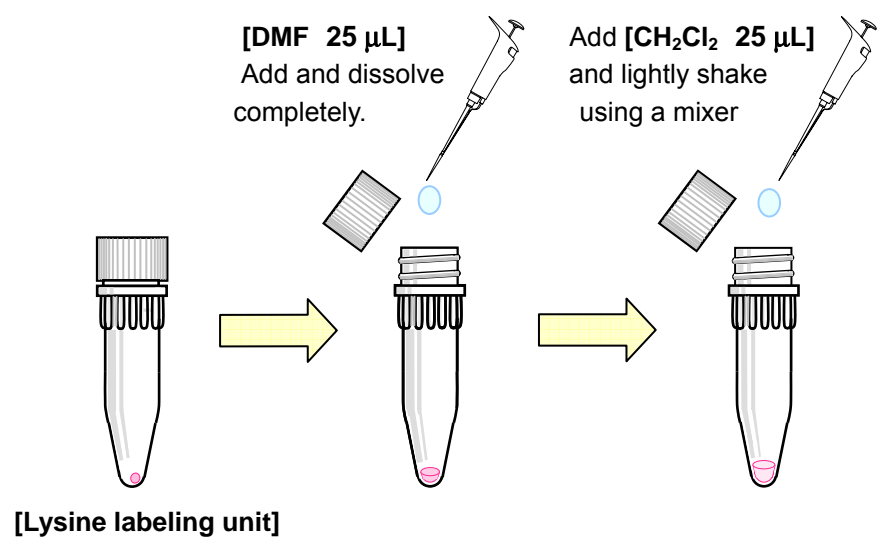
(i.e., Concentration of labeling sample:10⁻⁵M, concentration of reagent:10⁻⁴M; If the concentration of the reagent is used at about 10 times, the concentration of labeling sample can be lowered to about 10⁻⁶M; i.e., concentration of labeling sample: 10⁻⁶M, concentration of reagent:10⁻⁷M)

Caution Carry out operations under shielded light.

Occasional preparation: Use all conditioned reagent the same day.

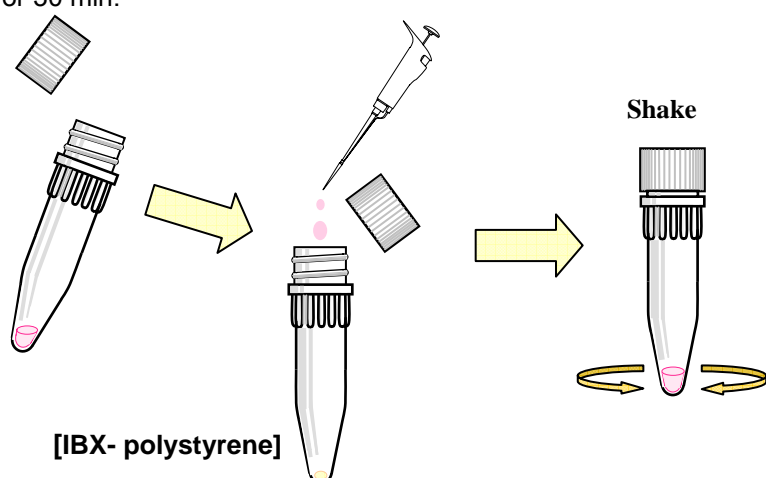
1. Dissolution of probe

Add 25μL of DMF and dissolve it completely, then add 25μL of CH₂Cl₂



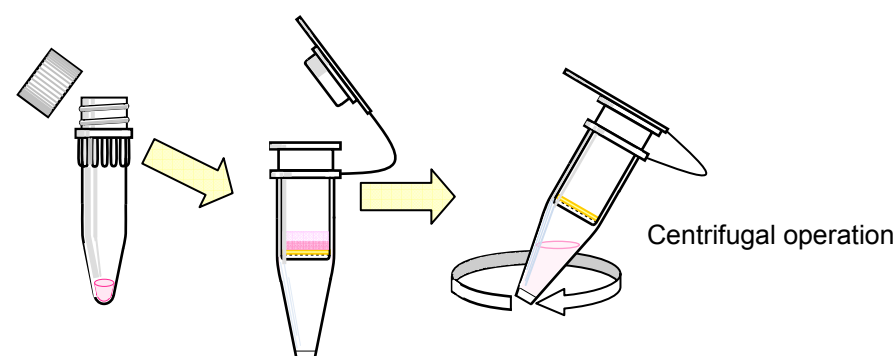
2. Activation of probe

React all the amount prepared above with IBX-polystyrene and shake it at room temperature (25°C) for 30 min.



3. Filtration

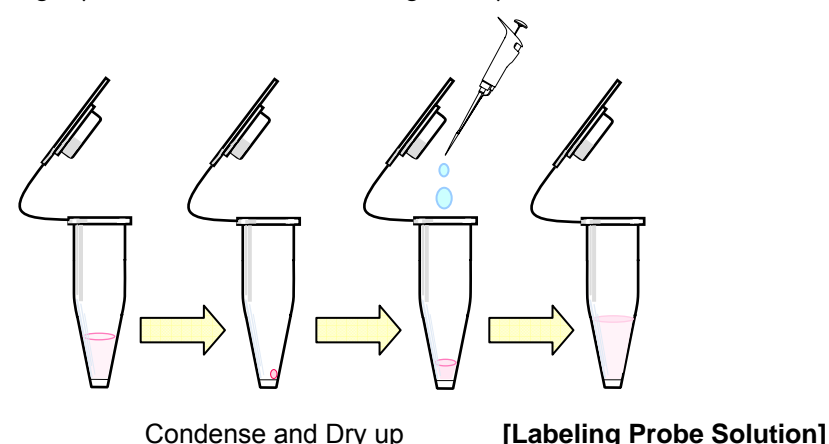
Filter out IBX- polystyrene by means of a filtration tube (0.45μm). Add 25μL of CH₂Cl₂ to the IBX-polystyrene remaining on the filter and subject it to centrifugal filtration to wash off adhering reagent. Repeat this operation twice. After washing off the reagent, pigment remains in IBX-polystyrene, but it does not affect labeling operation. Proceed with the operation as it is.



4. Condensating and drying the filtrate

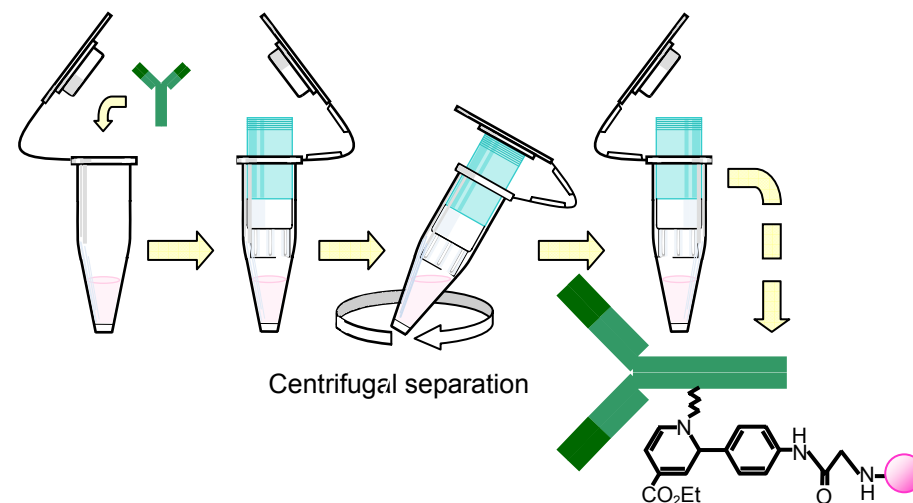
Condense and dry the filtrate at room temperature (25°C) by means of a centrifugal condenser or by nitrogen-flow condenser for 30min. ~ 60min. Dissolve the residue in 2μL of DMSO, add 98μL of buffer solution of pH 6~8 (not containing lysine residue or amino groups) or water, and prepare the labeling probe solution. (When 100μL of buffer solution or water is added, the concentration of the labeling probe becomes 10⁻⁴M.)

After adding 2 μL of DMSO and dissolving it, 98 μL of buffer or water is added



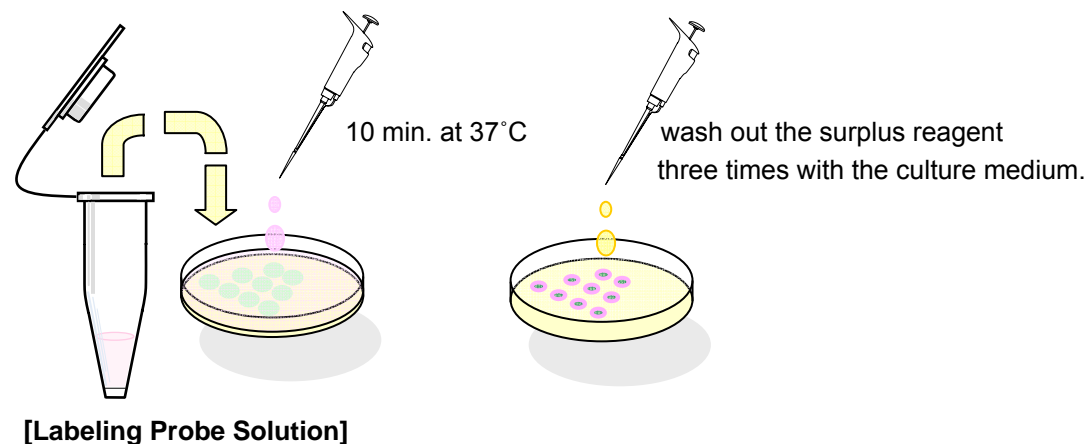
5. Labeling Procedure

To label proteins or antibodies, add the sample to the labeling probe solution and mix it by pipetting. After leaving the sample under the optimum temperature conditions (25°C ~ 45°C) for 30min, eliminate the low molecular reagents with a filtration tube (Molecular weight fraction 10,000) or gel filtration.



In the case of labeling cell surfaces, after reacting the PBS buffer solution of the labeling reagent at 37°C for 10 min with floating cells or cells coated on a dish. The buffer solution should contain no amino groups or lysine residues. Wash out the surplus reagent three times with the culture medium.

Caution Dispose the sample and the reagent in accordance with local ordinances and regulations.



Bibliograph: (1) Tanaka, K. & Katsumura, S. *J. Synth. Org. Chem. Japan.* **1999**, 55, 1657.
(2) Tanaka, K. & Katsumura, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9660.
(3) Tanaka, K. & Katsumura, S. *J. Synth. Org. Chem. Japan.* **2005**, 63, 696.
(4) Tanaka, K.; Masuyama, T.; Hasegawa, K.; Tahara, T.; Mizuma, H.; Wada, Y.; Watanabe, Y.; Fukase, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 102.

(5) Tanaka, K.; Fukase, K. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 815

Patent pending PCT / JP2008 / 051871 by Independent administrative agency Osaka University
Independent administrative agency Institute of Physical and Chemical Research (Riken)

Manufactured by KISHIDA

COSMO BIO Co., LTD.
Inspiration for Life Science
TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO, 135-0016, JAPAN
URL: <http://www.cosmobio.co.jp> e-mail: export@cosmobio.co.jp
[Outside Japan] Phone : +81-3-5632-9617 [国内連絡先] Phone : +81-3-5632-9610
FAX : +81-3-5632-9618 FAX : +81-3-5632-9619

STELLA⁺ “ Lysine Labeling Kit ”

はじめに

STELLA⁺ “ Lysine Labeling Kit ” は、タンパク質（抗体）のリジン残基、または細胞表面に存在するタンパク質のリジン残基やアミノ基を選択的に標識するための標識キットです。

これまでのスクシンイミジルエステル化合物等による標識法（NHS 法）とは異なり、新しく開発されたヘキサトリエン- α -カルボニル化合物の超高速 6- α ザ電子環状反応により、低濃度で迅速かつ収率良く標識することができます。さらに、タンパク質表面のリジン残基のみと反応し、N-末端アミノ基やレセプター相互作用などに必須である主鎖リジン残基とは反応しませんので、生体高分子の機能を損なうことなく効率的に標識することが可能です。

（注）・標識操作中は、リジン残基などのアミノ基を含む試薬は使用しないで下さい。

キット内容

- | | | |
|-----------------------------------|-----------------|-----|
| 1. Lysine labeling unit | | 3 本 |
| 2. IBX- polystyrene | | 3 本 |
| 3. Filtration tube (0.45 μ m) | | 3 本 |
| | * 12000 g 以下で使用 | |
| 4. Filtration tube (分画分子量 10,000) | | 3 本 |
| | * 14000 g 以下で使用 | |

保存条件

冷蔵（0~5℃）にて保存して下さい。

本キット以外に必要なもの

マイクロピペッター、マイクロチューブ用遠心分離機、振盪機（ミキサー）、窒素気流還流装置または遠心濃縮機、マイクロチューブスタンド、各種試薬：DMF、ジクロロメタン（CH₂Cl₂）、DMSO 水、各種 Buffer 類など

操作概要

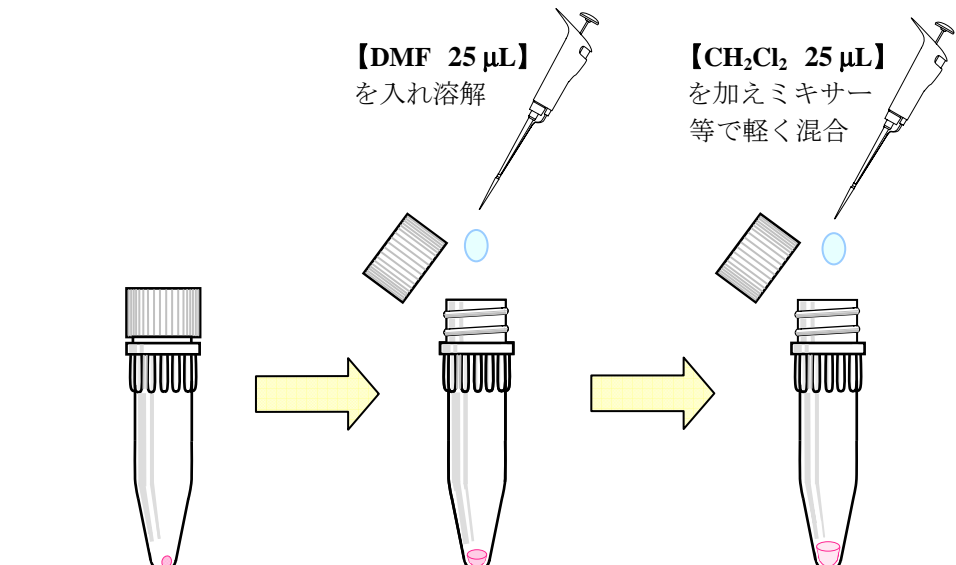
このキットは、Lysine labeling unit 中に適当な Buffer や水等を 100 μ L 加えることにより、標識プローブの濃度が 10⁻⁴ mol/L になるように調製されています。通常の標識時には、試薬濃度がサンプル濃度に対して約 10 倍になるように調製して下さい。（例-1：標識サンプル濃度；10⁻⁵ mol/L、試薬濃度；10⁻⁴ mol/L。試薬濃度を 10 倍程度用いた場合には、標識サンプル濃度を最大 10⁻⁸ mol/L 程度まで低下させることが可能です。例-2：標識サンプル濃度；10⁻⁸ mol/L、試薬濃度；10⁻⁷ mol/L。）

（注）・一連の操作は遮光条件下で行って下さい。

・用時調製：調製した試薬は当日内に使用下さい。

-1. プローブの溶解

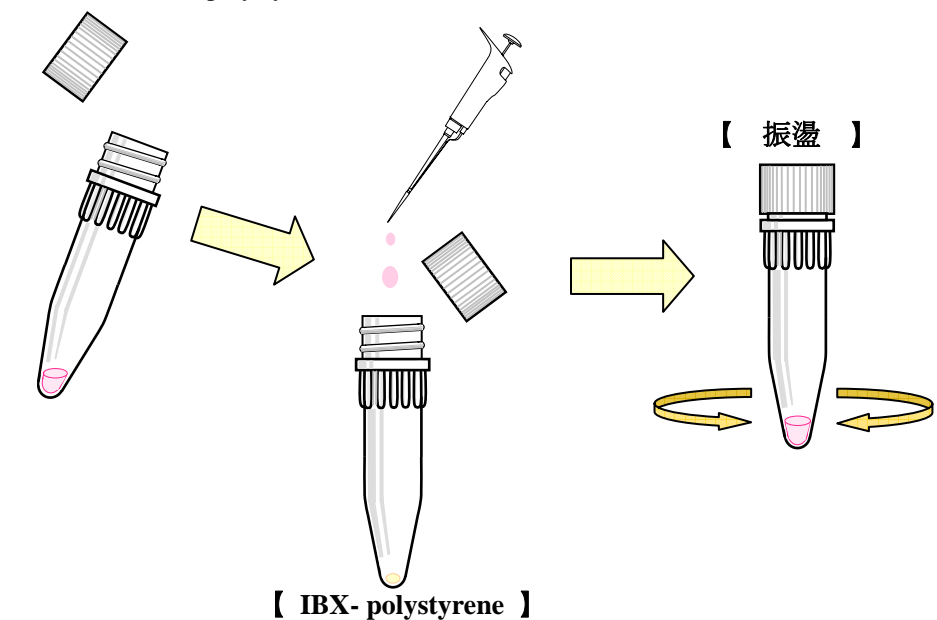
Lysine labeling unit に DMF 25 μ L を加え溶解させた後、CH₂Cl₂ 25 μ L を加える。



【 Lysine labeling unit 】

-2. プローブの活性化

全量を IBX- polystyrene に作用させ、室温（25℃）で 30 分間振盪する。



【 IBX- polystyrene 】

<参考文献>：

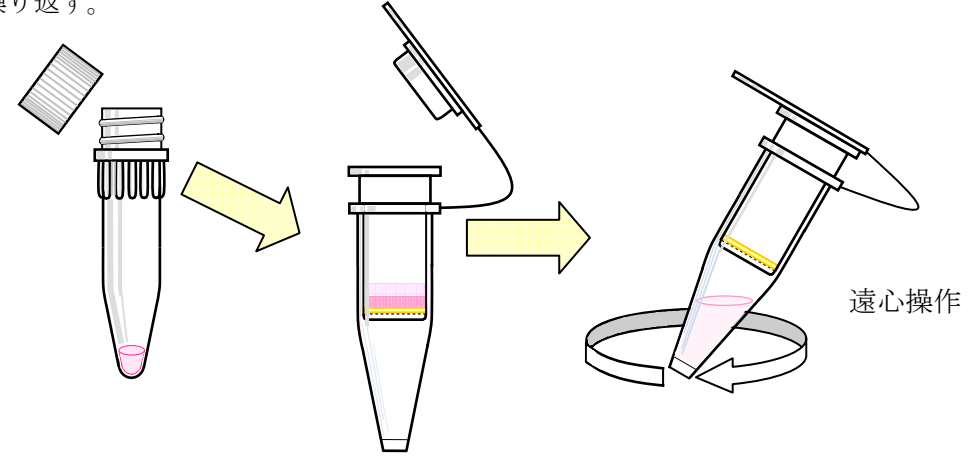
- (1) Tanaka, K.; Katsumura, S. *J. Synth. Org. Chem. Japan.* **1999**, *55*, 1657.
- (2) Tanaka, K.; Katsumura, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9660.
- (3) Tanaka, K.; Katsumura, S. *J. Synth. Org. Chem. Japan.* **2005**, *63*, 696.
- (4) Tanaka, K.; Masuyama, T.; Hasegawa, K.; Tahara, T.; Mizuma, H.; Wada, Y.; Watanabe, Y.; Fukase, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 102-105.
- (5) Tanaka, K.; Fukase, K. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 815-828.

大阪大学・独立行政法人理化学研究所 特許出願 PCT / JP2008 / 051871

<お問合せ> : http://www.kishida.co.jp/form/top_egy.html にてお受け致します。

-3. ろ過

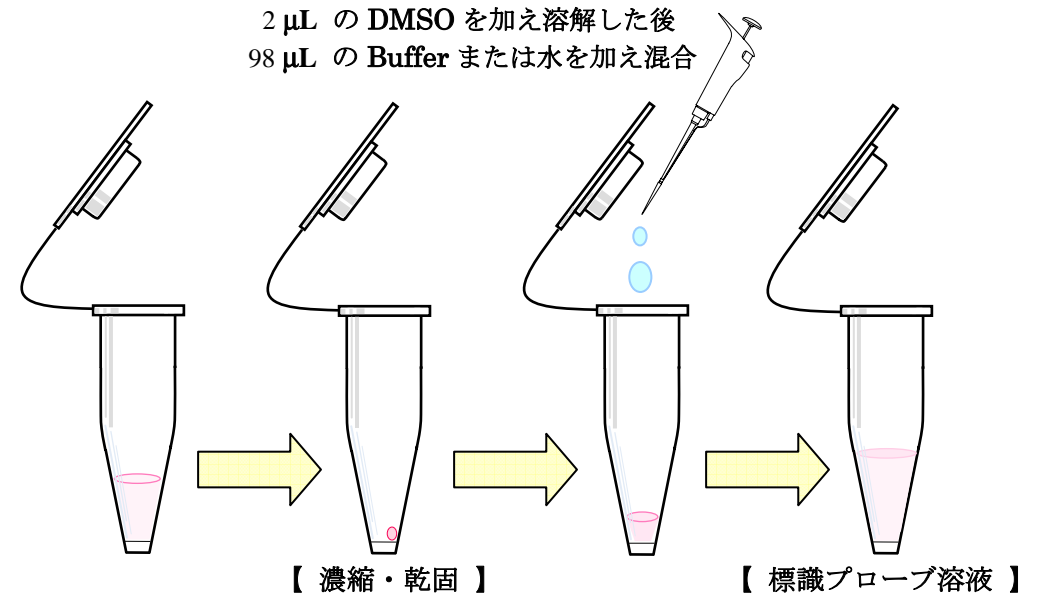
IBX- polystyrene を Filtration tube (0.45 μ m) 等により遠心ろ過して除去する。フィルターに残った IBX- polystyrene に CH₂Cl₂ 25 μ L を加えて遠心ろ過し、付着した試薬を洗い込む。この操作を 2 回繰り返す。



遠心操作

-4. ろ液の濃縮・乾固

ろ液を室温（25℃）で窒素気流下または遠心濃縮機にて 30 分~1 時間程度濃縮・乾固する。残渣を 2 μ L の DMSO で溶解し、pH 6~8 のリジン残基などのアミノ基を含まない Buffer または水等 98 μ L を加え標識プローブ溶液を調製する。（全量を 100 μ L とした場合には、標識プローブ濃度は 10⁻⁴ mol/L となります）

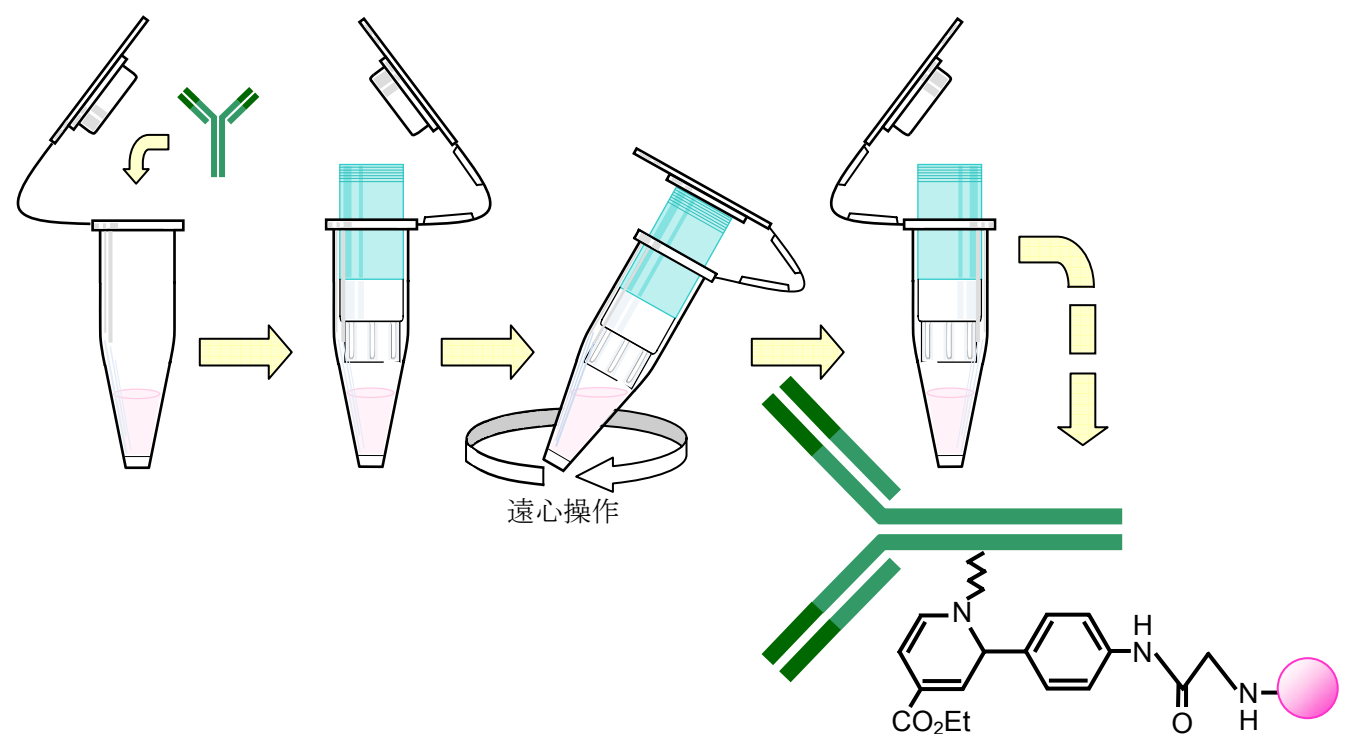


【 濃縮・乾固 】

【 標識プローブ溶液 】

-5. 標識手順

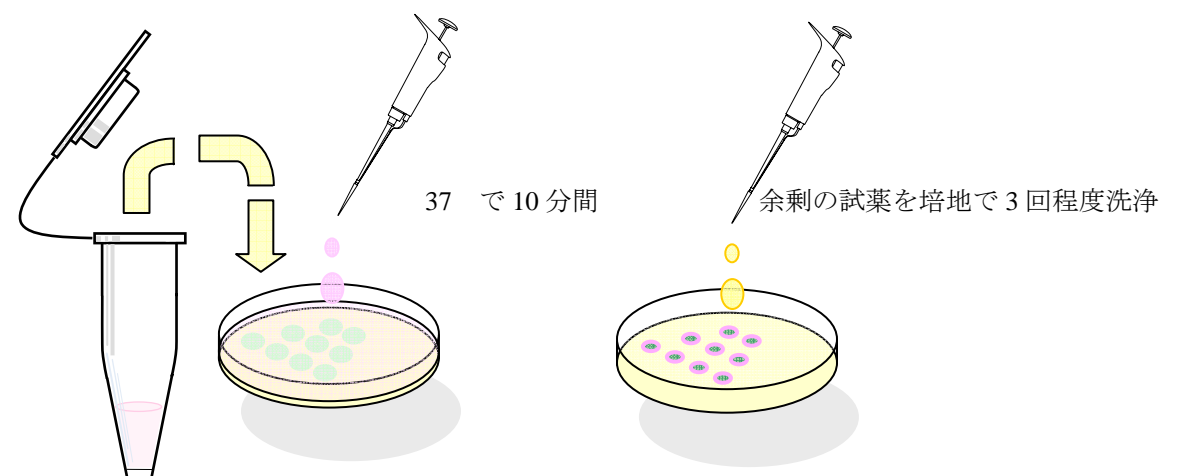
タンパク質および抗体を標識する場合には、標識プローブ溶液にサンプルを加えピペティングにより混和し、室温（25℃）~45℃ のサンプルに最適な温度条件下で 30 分間静置反応させた後、Filtration tube(分画分子量 10,000)またはゲルろ過等を用いて低分子試薬を除去する。



遠心操作

細胞表面の標識の場合には、浮遊状態の細胞、またはディッシュにコーティングした細胞に対して上記-4.で調製する標識プローブ溶液をリジン残基などのアミノ基を含まない Buffer 溶液中（培地を用いる事は好ましくない）37℃ で 10 分間作用させた後、余剰の試薬を培地で 3 回程度洗浄する。

（注）・サンプルならびに試薬の廃棄に関しては都道府県の条例に従い処理して下さい。



37℃ で 10 分間

余剰の試薬を培地で 3 回程度洗浄

【 Labeling Probe Solution 】