Lumiprobe
Life science solutions

抗體標記試劑盒 (Antibody Labeling Kits)

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

繁體中文: 抗體標記試劑盒 (Antibody Labeling Kits) 3-7

抗體標記試劑盒（Antibody Labeling Kits）

該試劑盒用於製備標記抗體，每個抗體具有2.5-3個標記。該試劑盒包含十個標記反應的所有試劑和材料，每個反應可標記100 ug 抗體。該染料是一種 NHS 酯，要控制使用量。它在弱鹼性 pH 條件下與抗體上的賴氨酸氨基基團發生反應。抗體的純化是通過使用矽膠離心柱來實現的。這些試劑盒包含磺化水溶性染料，最適合標記包括抗體在內的敏感蛋白。

套件組成

套件組成部分	數量						
	1321-10rxn 10 反應	3321-10rxn 10 反應	7321-10rxn 10 反應	5321-10rxn 10 反應	6321-10rxn 10 反應	1821-10rxn 10 反應	6821-10rxn 10 反應
N1320, sulfo-Cyanine3 NHS酯 (sulfo-Cyanine3 NHS ester), 1 rxn	10	—	—	—	—	—	—
N3320, 磺基-Cyanine5 NHS 酯 (sulfo-Cyanine5 NHS ester), 1 rxn	—	10	—	—	—	—	—
N7320, 磺基-Cyanine5.5 NHS酯 (sulfo-Cyanine5.5 NHS ester), 1 rxn	—	—	10	—	—	—	—
N5320, 磺基-Cyanine7 NHS 酯 (sulfo-Cyanine7 NHS ester), 1 rxn	—	—	—	10	—	—	—
N6320, 磺基-Cyanine7.5 NHS酯 (sulfo-Cyanine7.5 NHS ester), 1 rxn	—	—	—	—	10	—	—
N1820, AF 488 NHS 酯 (AF 488 NHS ester), 1 rxn	—	—	—	—	—	10	—
N2825, AF 594 NHS 酯 (AF 594 NHS ester), 1 rxn	—	—	—	—	—	—	10
A1115, Desalting spin column, PBS, 1 pcs	10	10	10	10	10	10	10
脫鹽容器瓶, 1.5mL	10	10	10	10	10	—	—
脫鹽廢液瓶，2 mL	10	10	10	10	10	—	—
PBS 錠，適用於 100 mL 緩衝液	1	1	1	1	1	—	—
15050, DMSO (dimethyl sulfoxide), labeling grade, 1 mL	1	1	1	1	1	1	1
1584-05mL, Sodium azide solution, 3%, 0.5 mL	1	1	1	1	1	1	1
1689-15mL, Sodium bicarbonate, 126 mg	1	1	1	1	1	1	1

16115, Desalting receptacle vial, 1.5 mL, 10 pcs	—	—	—	—	—	1	1
17115, Desalting waste vial, 2 mL, 10 pcs	—	—	—	—	—	1	1
11125, PBS tablet, for 100 mL of buffer, 1 pcs	—	—	—	—	—	1	1

保存期限 12 個月。

方法

1. 抗體製備

標記反應的最佳條件如下：抗體以1 mg/mL的濃度溶解在0.1 M碳酸氫鈉溶液中。疊氮化鈉與標記試劑兼容。如果抗體濃度低於1 mg/mL，則需濃縮。抗體製備應不含氨基酸、BSA 等蛋白質以及會使 pH 值處於（2-7.5 或 9-12）不利範圍的緩衝液成分。

2. 設置反應

2.1. 將含抗體的碳酸氫鈉溶液（100 ug/100 uL*）添加到熒光團中，渦旋，並在室溫下孵育 30 分鐘。

如果要標記的抗體量較少，則將凍干染料溶解在10 uL無水DMSO中，每10 ug抗體取1 uL溶液。染料溶於DMSO後，應儘快使用。

3. 標記抗體的純化

3.1.準備離心過濾柱。使用前，柱子應於室溫平衡。使用渦旋重新懸浮凝膠。將柱子放入適配的無蓋管中，以 1,000 g 離心 2 分鐘（必須仔細控制轉速對於標準 6 cm 轉子，1,000 g = 3,800 rpm）。柱子的凸出部分應朝外。

3.2. 用 400 uL的 1x PBS 緩衝液潤洗，以 1,000 g 離心 2 分鐘。

3.3.取出柱子。將其放入帶蓋的收集管中。將 100 uL 反應混合物上柱，孵

育 1 分鐘， 1,000 g 離心 2 分鐘洗脫抗體。添加 1/100體積的 100x 疊氮化鈉。抗體可以分裝以延長其保質期。現用抗體可以儲存在+4 °C，其餘的可以儲存在-20 °C。

4. 染料與抗體比值的測定

計算染料抗體比，測量偶聯物的吸收光譜，即在280 nm (AAB) 或染料最大吸收峰 (ADye) 處的吸收值。染料標記抗體的典型吸收光譜如下圖所示。根據染料的不同，最大吸收波長可能會有所不同。

標記抗體的吸收光譜包含染料峰（具有較長的波長）和抗體峰（280 nm 左右）。染料與抗體比使用以下公式計算：

其中 Dye/AB — 每個抗體分子的平均熒光團數，ADye — 樣品在染料最大吸收處的光密度，AAB — 280 nm 處的樣品光密度， ε AB — 280 nm 處抗體的摩爾消光係數（IgG 為 210,000）， ε Dye — 染料在最大吸收時的摩爾消光係數（見下表），CF280 — 染料的校正因子（見下表）。

計算示例

用sulfo-Cyanine5標記IgG抗體並純化後，得到吸收光譜如上圖。確定染料與蛋白質的比例。

由吸收光譜可得，染料最大吸收值（646 nm，見表）時的ADye = 0.184，IgG的 AAB = 0.066（280 nm）， ε AB = 210,000； ε 染料 = 271,000，CF280 = 0.04。

染料/AB — 每個抗體有 2.43 個熒光團分子。

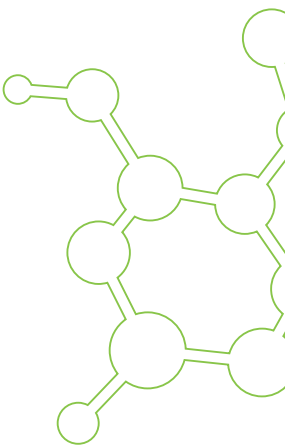
結果的判讀和抗體儲存

在大多數情況下，最佳染料與抗體比是每個抗體 2-3 個染料分子。由於熒光濃度猝滅，染料負載量增加到該值以上並不會改善熒光信號。當反應過程中附着的熒光團太少時，降低每次反應的抗體上樣量。使用過期的試劑盒也會導致這種結果。

我們建議檢測標記抗體與其抗原的結合。標記的抗體可保存在-20°C。當前

使用的試樣應儲存在 +4 ℃ 下，以避免凍融循環。偶聯物的穩定性由抗體本身決定，而不是由熒光團或化學鍵決定。標記的抗體不應長時間暴露在陽光直射下，但可耐受環境光照。

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com