

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

## **EnAb<sup>TM</sup>Fluor594 荧光素标记试剂盒**

产品货号：RE80013

产品规格：0.5 mg/1.25 mg/2.5 mg

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

Web: <https://www.enkilife.cn/>

E-mail: [customer@enkilife.cn](mailto:customer@enkilife.cn)

Tel: 027-87002838

## 产品简介

EnkiLife 荧光染料为活性荧光染料，该系列包括从紫外、可见光谱到近红外光谱常见荧光染料，用于标记生物分子，特别是蛋白质和抗体。其核心结构的创新性使得 EnkiLife 染料具有许多新颖特征因而优于其他商业染料，主要表现在标记效率更高，发光度更强。

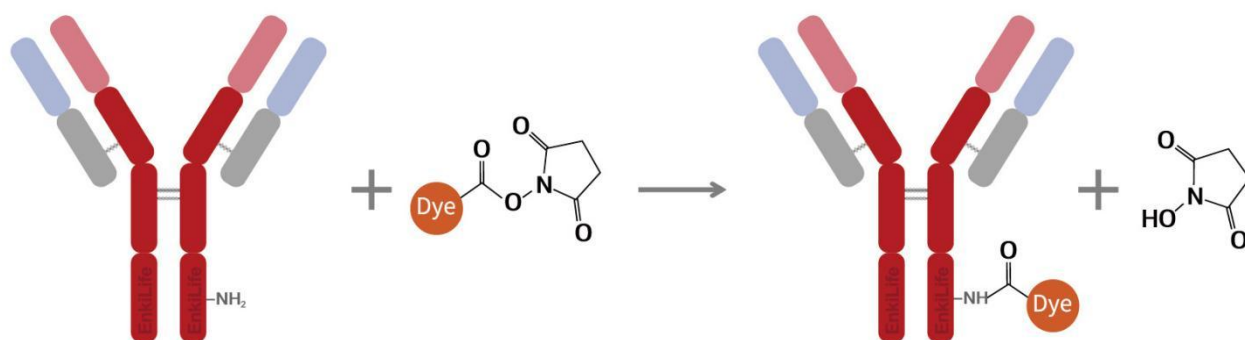
Fluor594 是一种荧光染料，其激发波长和发射波长分别为 587nm 和 603 nm(Ex558 nm & Em621nm)，它与抗体形成更特异的抗体荧光素结合物，背景更低。

## 产品特点

- ★ 本试剂盒常被用于抗体的直接标记，染料优化结构，标记效率更高。
- ★ 本试剂盒内超滤管为特殊处理的，可有效避免荧光淬灭和蛋白吸附损失。
- ★ 本试剂盒含基础通用保存液，从标记到存储过程一个试剂盒即可完成，无需额外配制和筛选保存液。
- ★ 60-90 分钟可以轻松完成标记。

## 标记原理

本试剂盒主要通过荧光素基团的活性键与生物分子的游离氨基共价结合，可以用于标记抗体、蛋白等其它含游离氨基生物分子。



## 产品组分

| 产品组分                    | 型号规格及其对应组分                |                            |                            |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                         | 0.5 mg                    | 1.25 mg                    | 2.5 mg                     |
| 活化 Fluor594 干粉          | 使用时加 DMSO<br>4 $\mu$ L 溶解 | 使用时加 DMSO<br>10 $\mu$ L 溶解 | 使用时加 DMSO<br>20 $\mu$ L 溶解 |
| DMSO                    | 40 $\mu$ L                | 100 $\mu$ L                | 200 $\mu$ L                |
| 标记缓冲液 (Labeling Buffer) | 10mL                      | 15mL                       | 30 mL                      |
| 标记物保存液                  | 2.0 mL                    | 2 mL*2                     | 10 mL                      |
| 纯化超滤管                   | 1 支                       | 1 支                        | 1 支                        |
| 推荐标记抗体量                 | 0.1 - 0.5 mg              | 0.25 - 1.25 mg             | 0.5 - 2.5 mg               |

\*超滤管使用说明:

若标记同一种生物分子, 超滤管膜未破裂前可重复使用数次。

若标记不同生物分子, 应更换不同超滤管, 避免生物分子交叉污染。

## 保存条件

试剂盒放在-20°C 可保存 6 个月。

## Fluor594 标记抗体使用量的计算

每个反应中染料的使用量取决于待标记蛋白的质量、浓度和分子量。此试剂盒针对抗体标记, Fluor594 和抗体的最佳分子比为 23:1。(Fluor594 和抗体分子比范围为 8:1~23:1)

**示例:** 标记 0.1 mg 的蛋白(浓度约 2 mg/mL), 使用 Fluor594 和蛋白(IgG, 150 KD)的分子比为 23:1 时, Fluor594 的摩尔浓度为 7.7 mM, 应加入 Fluor594 量的计算方法:

1. 计算需要的 Fluor594 的物质的量  $n$ :

$$\begin{aligned}n_{\text{Fluor594}} &= n \times 23 = 0.1 \text{ mg} \div 150000 \text{ mg/mmol} \times 23 \\&= 0.000015333 \text{ mmol}\end{aligned}$$

2. 计算需要的 Fluor594 的体积  $V$ :

$$V_{\text{Fluor594}} = n_{\text{Fluor594}} \div C_{\text{Fluor594}} = 0.000015333 \text{ mmol} \div 7.7 \text{ mM} = 2 \mu\text{L}$$

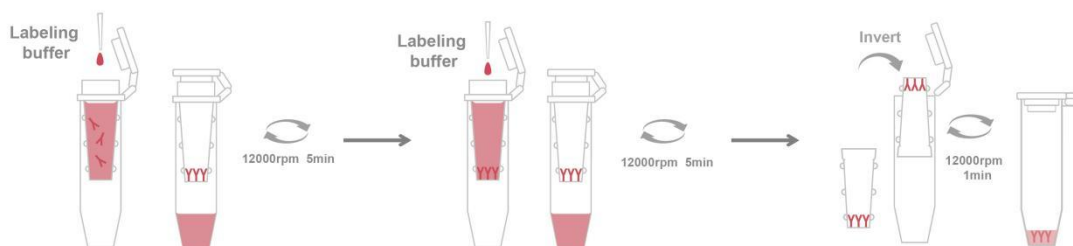
## 操作过程

### ·实验前准备

1. 仔细阅读使用说明书。
2. 试剂耗材准备：提前 20 min 从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温（注：不需要用到的试剂组分继续放置在冰箱中）。
3. 超滤管浸润：向干燥的超滤管滤芯中加入标记缓冲液，室温放置 10 min 备用，在加入待标记物之前弃去标记缓冲液即可（整个标记过程中超滤管滤芯都应该保持湿润）。
4. 溶解活化 Fluor594 干粉（以产品规格为 0.5 mg 为例）：用 4  $\mu$ L DMSO 溶解 Fluor594 干粉，静置 10 min，待其充分溶解，此时 Fluor594 的浓度为 7.7 mM，盖好管子备用。

### · 标记流程（以待标记抗体溶液置换成标记缓冲液为例）

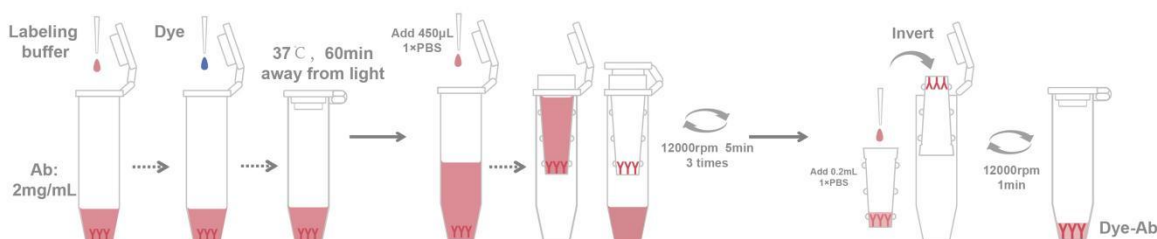
#### 1. Replace the antibody buffer



#### 2. Labeling reaction

#### 3. Ultrafilter

#### 4. Collect Dye-Ab



### · 标记步骤（以标记 100 $\mu$ g 抗体为例，2mg/mL）

#### 1. 置换抗体缓冲液

在管芯中加入抗体，再加入Labeling buffer至超滤管最大体积，12,000 rpm离心 5 min，重复上述操作再超滤一次。然后将管芯倒置于外套管内，12,000 rpm离心 1 min，回收换液后的蛋白。

## 2. 标记反应

向外管内补加Labeling buffer使抗体浓度为 2 mg/mL，取 2  $\mu$ L 7.7 mM Fluor594 溶液加入到上述步骤的抗体中，轻轻混匀，盖上盖子密封，37°C避光反应 1 小时。

## 3. 超滤

加入适量 1×PBS（约 450  $\mu$ L或至超滤管最大体积）至上述反应溶液中，轻轻混匀，4°C 12,000 rpm离心 5 min。重复离心超滤操作共 3 次。

## 4. 收集超滤管中的溶液

加 0.2 mL 1×PBS 至超滤管芯中，轻轻吹打。将超滤管倒置于另一个收集管（干净未参与反应的收集管）中，12,000 rpm 离心 1 min。收集管中得到的溶液，即为标记后的抗体。

## 标记抗体的保存

**定容：**根据实验需要调整到合适的浓度，可加入适量 BSA，甘油及防腐剂等，分装成小份-20°C 避光保存；也可以将试剂盒附带的标记物保存液与标记产物按照体积比 1:1 混匀后，分装保存。

**保存：**含有防腐剂标记产物，于 4°C 避光，可稳定保存 1 个月；于-20°C，可稳定保存 6 个月。

## 注意事项

A. 溶解后的 Fluor594 建议一次性使用完。

B. **超滤管规格选择：**本试剂盒默认配置 30 KD 超滤管，适合于标记抗体。如果需要标记其他分子量物质，建议按照待标记物质分子量大于超滤管截留分子量 2 倍以上的原则选择超滤管规格，请在下单前与我们联系。

C. **Fluor594 和抗体分子比选择：**本试剂盒所推荐的 Fluor594 和抗体分子比（23:1）仅供参考，实验者可结合实际需求进行摸索，Fluor594 和抗体分子比推荐范围：8:1~23:1。

D. **试剂盒适用范围：**本试剂盒也可标记其它含有游离氨基的蛋白，具体标记比例根据待标记物中可用氨基的数量确定或者设置不同摩尔比例进行标记。

E. **待标记抗体要求：**抗体标记最佳反应浓度为 2 mg/mL，如果浓度较低，需在实验之前浓

缩到 2 mg/mL。

## 常见问题及解决方案

**Q: 待标记分子经过浓缩浓度仍然达不到 2 mg/mL，再浓缩就产生沉淀了怎么办？**

**A:** 标记的时候尽可能达到这个浓度，如果实在达不到这个浓度，适当增加加入的活化的荧光素的量；最佳标记效果可以梯度增加荧光素用量试验测试来确定。

**Q: 待标记分子与荧光素的最佳摩尔比只能是 1:8 - 1:23 之间？**

**A:** 这个要根据不同生物分子性质确定，更准确的说与生物分子表面氨基个数有关系；最佳标记比例可根据梯度用量测试确定。

**Q: 如何选择标记试剂盒中的超滤管型号？**

**A:** 一般来说，待标记生物分子的分子量是超滤管截留分子量 2 倍以上最好；比如，标记抗体，抗体分子量为 150 Kd，选择分子截留 75 kD 以下的都可以，分子量截留越小，超滤越慢。如果分子量太小，标记完以后建议用更高精度的纯化方式，比如，10 kD 分子量建议用 HPLC 纯化。

**Q: 标记效率低**

**A: 有以下原因：**

1. 缓冲液中含有痕量伯胺成分，与染料反应降低了标记效率。如果蛋白已经溶于含氨基的缓冲液（如 Tris 或氨基乙酸），标记前用 PBS 透析。
2. 蛋白含量较低 ( $\leq 1$  mg/mL) 会影响标记效率。
3. 标记步骤中加入碳酸氢钠的作用是将反应混合物的 pH 升高至  $\sim 8$ ，因为在弱碱性环境中标记反应的效率最高。如果蛋白溶液的缓冲范围在低 pH，加入重碳酸盐也无法将 pH 调节至最适水平。要么加大重碳酸盐的量，要么将缓冲液换成 PBS，或用 0.1 M 碳酸氢钠透析等。
4. 研究显示 pH 升至 9.0 $\sim$ 9.4，标记效率和标记速度（只需 10 min）明显改善。
5. 不同抗体与荧光团的反应速率不同，染料标记后保留的生物活性程度也不同，因此标准步骤也不是总有最好的标记结果。为增加标记率，可以对同一样品进行再标记，或减少蛋白的量加大染料的质量重新标记。有研究者在室温孵育 1 小时后再 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，情况有所改善。