

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

## EnAb™ 别藻蓝蛋白(APC)抗体快速标记试剂盒

产品货号: RE80006p

产品规格: 40  $\mu$ g/200  $\mu$ g/1mg

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: [order@enkilife.cn](mailto:order@enkilife.cn)

Tel: 027-87002838

### 产品简介

EnkiLife 蛋白类荧光染料标记试剂盒提供了目前市面上多种常用的荧光染料类型，包括常见的藻红蛋白 R-PE，别藻蓝蛋白 APC，多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物 PerCP 荧光染料及三种荧光染料的多种串联染料类型，可满足多种应用需求，如流式细胞术、组织细胞成像、免疫荧光、ELISA 等。所有蛋白荧光染料标记试剂盒包含标记所需全部试剂，主要用于抗体的标记。

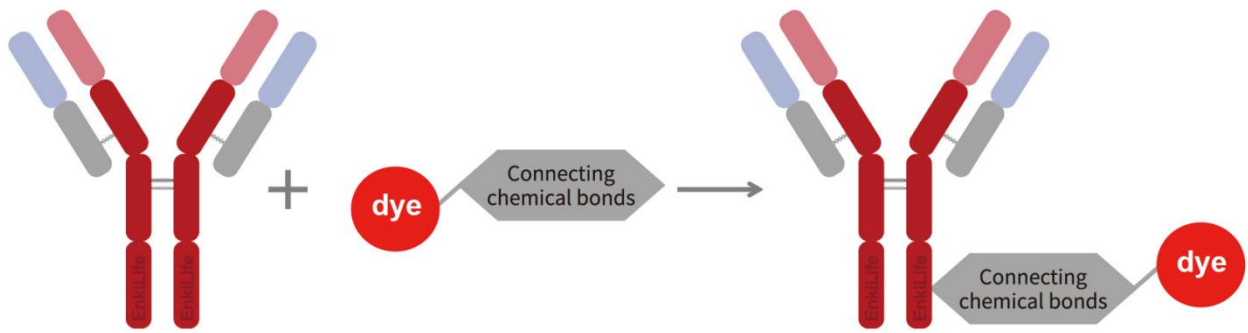
**染料特点：**别藻蓝蛋白(Allophycocyanin，简称为 APC)是从螺旋藻（一种蓝绿藻）中分离的藻胆蛋白，分子量 104 kDa，具有很高的量子产量。可被 594 nm、633 nm 激发发光，在 650 nm 处吸收峰最大，在 660 nm 处荧光发射峰最大。APC 比普通的化学发光强 100 倍，在普通应用中，其至少可以提高灵敏度 5-10 倍。

### 产品特点

- ◆ 试剂盒组分齐全，操作简单，只要按照操作步骤进行便可得到高品质偶联抗体。
- ◆ 本试剂盒所配置的染料为高纯度，高活性荧光蛋白，荧光发光效率更高。
- ◆ 本试剂采用定向偶联技术，荧光蛋白和抗体都不会发生自连，保证偶联物的特异性和均一性。
- ◆ 试剂盒所使用的交联剂增加了延长臂，确保不会因为蛋白质位阻而影响应用效果。

### 标记原理

本试剂盒利用抗体上半胱氨酸特性和染料上游离的氨基，采用定向对接偶联技术将抗体分子与染料共价偶联。



### 产品组分

| 产品组分         | 不同规格组分含量                               |                                          |                                          | 储存温度                 |
|--------------|----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------|
|              | 40 $\mu$ g 抗体                          | 200 $\mu$ g 抗体                           | 1mg 抗体                                   |                      |
| 活化的 APC      | 1 管                                    | 1 管                                      | 5 管                                      | -20°C, shading light |
| 标记缓冲液 L      | 2 mL                                   | 2 mL                                     | 2 mL                                     | 4°C, shading light   |
| 抗体修饰试剂       | 60 $\mu$ L                             | 60 $\mu$ L                               | 60 $\mu$ L                               | -20°C, shading light |
| 50 KD 超滤管*   | 1 set**                                | 1 set**                                  | 1 set**                                  | RT                   |
| 封闭试剂         | 300 $\mu$ g                            | 300 $\mu$ g                              | 300 $\mu$ g                              | -20°C, shading light |
| DMSO(溶解封闭试剂) | 50 $\mu$ L                             | 50 $\mu$ L                               | 50 $\mu$ L                               | -20°C, shading light |
| 标记蛋白保存液      | 200 $\mu$ L                            | 1mL                                      | 1 mL/管*5                                 | 2~8°C                |
| 建议标记抗体量      | 每管标记 20~40 $\mu$ g,<br>最佳标记 20 $\mu$ g | 每管标记 50~200 $\mu$ g,<br>最佳标记 100 $\mu$ g | 每管标记 50~200 $\mu$ g,<br>最佳标记 100 $\mu$ g |                      |

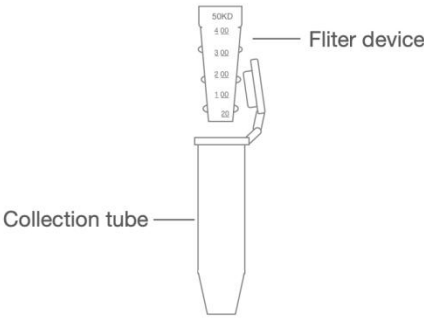
\*超滤管使用说明：

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。

\*\*50 KD 超滤管如需更多数量，请联系我们提供。

\*\*\*1 set 50 KD 超滤管(0.5 mL)包括 1 个滤芯（Filter device）和 2 个收集管（Collection tube）。



### 保存条件

未开封试剂盒可在-20℃保存1年，开封后按照储存温度存储，溶解后的染料或试剂应尽快使用，最长可在-20℃或-80℃保存一周。

### 操作过程

#### 实验前准备

1. 仔细阅读使用说明书。
2. 提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒，使试剂盒各组分平衡至室温。（注：不需要用到的试剂组分继续放置在冰箱中）。
3. DMSO 在 -20℃可能冻结，需要室温放置 10 分钟左右融化；
4. 超滤管浸润（用于抗体超滤浓缩换液）：向干燥的超滤管滤芯中加入 450  $\mu$ L 标记缓冲液 L，室温放置 10 分钟备用，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）。
5. 抗体准备：待标记抗体纯化除杂，浓度含量测定，请确保抗体样本符合下表标准

| 组分                                                                                | 试剂盒标记兼容性                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 叠氮钠<0.1%，甘油<50%，Tris<50mM，甘氨酸<50mM，Proclin <0.5%，EDTA<10mM，海藻糖<5%，蔗糖<5%，或其他小分子添加物 | 是，执行 <b>抗体样本超滤浓缩换液</b> ，即标记步骤 1.                       |
| 腹水、血清、细胞培养上清中的抗体                                                                  | 否，执行纯化步骤后再使用本试剂盒                                       |
| 含 BSA>0.1%                                                                        | 否，使用 BSA 去除试剂盒（如 RE80028: BSA Removal Kit）纯化抗体后再使用本试剂盒 |
| 抗体浓度低于 2mg/mL                                                                     | 是，执行 <b>抗体样本超滤浓缩换液</b> ，即标记步骤 1.                       |
| 抗体浓度 $\geq$ 2mg/mL，且不含 BSA（<0.1%），明胶（<0.1%）及小分子添加物等                               | 是，不需要超滤浓缩换液，直接使用标记缓冲液 L 稀释至 1mg/mL                     |

#### 标记步骤（适用于标记 250 $\mu$ g~1mg 抗体）

1. **抗体样本超滤浓缩换液**：取待标记抗体如 500  $\mu$ g（纯度>90%），于超滤管滤芯中，并加入不超过超滤管滤芯最大体积的标记缓冲液，14000  $\times$  g 离心 5 分钟，弃去滤液；根据抗体中含有添加物情况可以重复此步骤 1 次，最后一次超滤完成得到 50~100  $\mu$ L，将超滤管滤芯倒置于收集管中，14000  $\times$  g 离心 1 分钟，收集得到的抗体溶液，根据抗体总量适当补足标记缓冲液至抗体浓度为 4mg/ml 左右。同时再将滤芯中补加适量 1 $\times$ PBS，保持湿润。

注：若待标记的抗体浓度大于 6mg/mL，且不含杂质成分时（如抗体缓冲液为 PBS），直接使用标记缓冲液稀释抗体至 4mg/mL；

2. **抗体修饰**: 按照 500  $\mu\text{g}$  抗体加入 10  $\mu\text{L}$  **抗体修饰试剂** 比例修饰抗体, 轻轻混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 60 分钟。
3. **染料和抗体偶联**: 将 5 管活化的染料 (每管标记 50  $\mu\text{g}$ ~200  $\mu\text{g}$  抗体) 中每管加入 50  $\mu\text{L}$  标记缓冲液, 涡旋混匀溶解后混合一共 250  $\mu\text{L}$  直接加入至修饰后的抗体溶液中, 37 $^{\circ}\text{C}$  避光反应 1.5 小时或 4 $^{\circ}\text{C}$  避光反应过夜。
4. **封闭保存**: 在 300  $\mu\text{g}$  封闭试剂管中加入 30  $\mu\text{L}$  DMSO 混匀溶解, 后按照 500  $\mu\text{g}$  抗体加 15  $\mu\text{L}$  封闭试剂, 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$  避光反应 30 分钟, 封闭未反应完的活性基团。此时反应完成, 根据后续应用需求选择性添加抗体保存液至合适浓度 (一般要求抗体浓度不小于 0.2mg/mL, 4 $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 请勿冻存, 一般可稳定保存半年以上)。

### 标记步骤 (适用于标记 50 $\mu\text{g}$ ~200 $\mu\text{g}$ 抗体)

1. **抗体样本超滤浓缩换液**: 取待标记抗体如 100  $\mu\text{g}$  (纯度>90%), 于超滤管滤芯中, 并加入不超过超滤管滤芯最大体积的标记缓冲液, 14000  $\times g$  离心 5 分钟, 弃去滤液; 根据抗体中含有添加物情况可以重复此步骤 1 次, 最后一次超滤完成得到 30~50  $\mu\text{L}$ , 将超滤管滤芯倒置于收集管中, 14000  $\times g$  离心 1 分钟, 收集得到的抗体溶液, 根据抗体总量适当补足标记缓冲液至抗体浓度为 1mg/ml。同时再将滤芯中补加适量 1 $\times$ PBS, 保持湿润。  
注: 若待标记的抗体浓度大于 2mg/mL, 且不含杂质成分时 (如抗体缓冲液为 PBS), 直接使用标记缓冲液稀释抗体至 1mg/mL;
2. **抗体修饰**: 按照 100  $\mu\text{g}$  抗体加入 2  $\mu\text{L}$  **抗体修饰试剂** 比例修饰抗体, 轻轻混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 60 分钟。
3. **染料和抗体偶联**: 将 1 管活化的染料 (每管标记 50  $\mu\text{g}$ ~200  $\mu\text{g}$  抗体) 加入 50  $\mu\text{L}$  标记缓冲液, 涡旋混匀溶解后直接加入至修饰后的抗体溶液中, 37 $^{\circ}\text{C}$  避光反应 1.5h 或 4 $^{\circ}\text{C}$  避光过夜反应。
4. **封闭保存**: 在 300  $\mu\text{g}$  封闭试剂管中加入 30  $\mu\text{L}$  DMSO 混匀溶解, 后按照 100  $\mu\text{g}$  抗体加 3  $\mu\text{L}$  封闭试剂, 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$  避光反应 30 分钟, 封闭未反应完的活性基团。此时反应完成, 根据后续应用需求选择性添加抗体保存液至合适浓度 (一般要求抗体浓度不小于 0.2mg/mL, 4 $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 请勿冻存, 一般可稳定保存半年以上)。

### 标记步骤 (适用于标记 20 $\mu\text{g}$ ~40 $\mu\text{g}$ 抗体)

1. **抗体样本超滤浓缩换液**: 取待标记抗体如 20  $\mu\text{g}$  (纯度>90%), 于超滤管滤芯中, 并加入不超过超滤管滤芯最大体积的标记缓冲液, 14000  $\times g$  离心 5 分钟, 弃去滤液; 根据抗体中含有添加物情况可以重复此步骤 1 次, 最后一次超滤完成得到 20~30  $\mu\text{L}$ , 将超滤管滤芯倒置于收集管中, 14000  $\times g$  离心 1 分钟, 收集得到的抗体溶液, 根据抗体总量适当补足标记缓冲液至抗体浓度为 1mg/ml。同时再将滤芯中补加适量 1 $\times$ PBS, 保持湿润。  
注: 若待标记的抗体浓度大于 2mg/mL, 且不含杂质成分时 (如抗体缓冲液为 PBS), 直接使用标记缓冲液稀释抗体至 1mg/mL;
2. **抗体修饰**: 按照 20  $\mu\text{g}$  抗体加入 0.5  $\mu\text{L}$  **抗体修饰试剂** 比例修饰抗体, 轻轻混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 60 分钟。
3. **染料和抗体偶联**: 将 1 管活化的染料 (每管标记 20  $\mu\text{g}$ ~40  $\mu\text{g}$  抗体) 加入 10  $\mu\text{L}$  标记缓冲液, 移液器吸打或者涡旋混匀溶解后直接加入至修饰后的抗体溶液中, 37 $^{\circ}\text{C}$  避光反应 1.5h 或 4 $^{\circ}\text{C}$  避光过夜反应。
4. **封闭保存**: 在 300  $\mu\text{g}$  封闭试剂管中加入 30  $\mu\text{L}$  DMSO 混匀溶解, 后按照 20  $\mu\text{g}$  抗体加 0.6  $\mu\text{L}$  封闭试剂, 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$  避光反应 30 分钟, 封闭未反应完的活性基团。此时反应完成, 根据后续应用需求选择性添加抗体保存液至合适浓度 (一般要求抗体浓度不小于 0.2mg/mL, 4 $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 请勿冻存, 一般可稳定保存半年以上)。

### 注意事项

1. 本试剂盒最适合用于标记常规 IgG 类抗体 (150kDa), IgM, IgA, IgE, IgY 等抗体也可标记, 但按

照本试剂盒步骤得到的偶联抗体可能不具有最佳使用效果，标记效率未知。各种重组抗体、抗体片段或纳米抗体等未使用此标记试剂盒进行过测试。

2. 本试剂盒中的活化染料是经真空冷冻干燥处理的，一旦复溶请一次性使用完，溶解后未立即使用的随时间延长效能下降。
3. 封闭剂需现用现配，干粉溶解后不能长期保存。
4. 试剂盒组份在运输过程中可能造成颠倒，会使液体或干粉试剂粘到管壁或瓶盖上。使用前请离心处理，以使附着管壁或瓶盖的液体或干粉试剂沉积到管底。
5. 不同种类的标记试剂盒中的组分请勿混用。
6. 部分化学试剂有轻微毒性，请戴手套操作。

## 附录 1 超滤管使用说明

1. 本试剂盒配备的 50kDa 超滤管，滤芯最大容积 500  $\mu$  L，其上有刻度标识，用户如初次使用，可提前加入一定体积标记缓冲液，查看判断刻度和体积的对应关系，增减调整超滤离心时间。
2. 超滤离心时间和蛋白样本或偶联物特性有关，某些抗体的离心浓缩时间需要根据实际情况进行调整，例如超滤浓缩 20 $\mu$ g 抗体至 20~30  $\mu$  L 时，可适当延长离心时间，使抗体浓度尽量接近 1mg/mL。
3. 超滤膜是超滤管的关键部件，吹打、混匀蛋白液时，注意不要碰到超滤膜。

## 附录 2 各蛋白荧光染料技术参数

| 染料名称 | 标记试剂盒货号  | Ex-Max/Em-Max |
|------|----------|---------------|
| APC  | RE80006p | 651nm/660nm   |