

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

EnAb™ Cy5.5 荧光素标记试剂盒

产品货号: RE80020

产品规格: 40 μ g/200 μ g/2mg

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

Tel: 027-87002838

产品简介

EnkiLife 小分子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，包括常用的 Cy 花菁染料系列，及 Cy 系列的升级染料及 Alexa Fluor 系列类似染料等，包括从紫外光谱、可见光谱到近红外光谱的多种常见荧光染料类型，所有小分子荧光染料标记试剂盒包含标记所需全部试剂，用于含有伯氨基（NH₂-）的蛋白、抗体的标记。

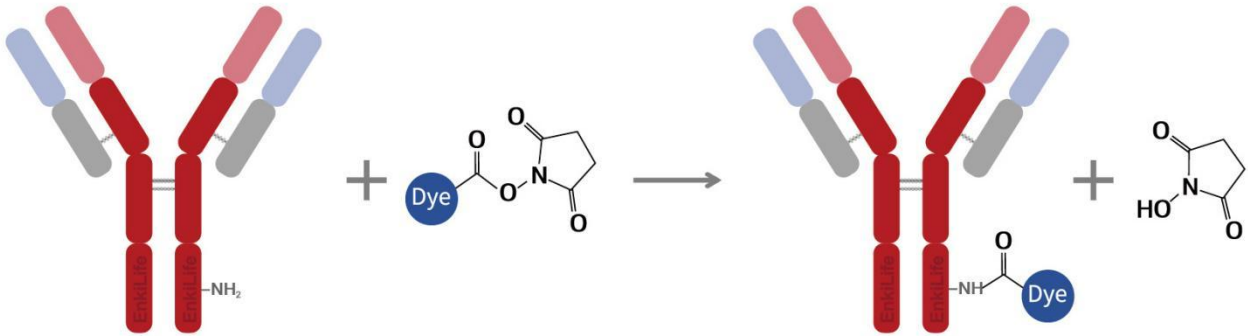
EnkiLife 小分子荧光染料标记试剂盒中所用的多种染料经过核心结构优化，荧光亮度更亮，和细胞或组织的非特异性结合降低，且荧光性质稳定，不易发生荧光漂白或荧光淬灭。试剂盒所使用的标记工艺方法成熟可靠，标记位点具有一定选择性。标记的抗体或蛋白能够满足多种科研需求，如胞内靶标标记，动物/细胞荧光成像，多色免疫荧光，流式细胞术，WB，ELISA 等。

产品特点

- ◆ **快速：**标记时间仅需约 30 分钟。
- ◆ **简便：**每只染料试剂已经优化设计好对应的抗体量，无需繁琐计算，固体染料形式批次稳定，按照步骤进行操作可得到较好效果。
- ◆ **标记效果突出：**优化了的标记缓冲液，染料标记位点相对固定，增强了标记后抗体的同质性。
- ◆ **染料特点：**经典花菁类染料，一般用于多色免疫荧光，小动物活体成像，流式，或串联染料。

标记原理

在一定 pH 范围内，荧光染料活化基团专一性与抗体蛋白上的伯氨基反应，形成稳定的酰胺键，从而实现与抗体蛋白的偶联。



产品组分

产品组分	不同规格组分含量			储存温度
	40 μg 抗体	200 μg 抗体	2mg 抗体	
活化的 Cyanine5.5	1 管	5 管	5 管	-20°C after unsealing, shading light
50 KD 超滤管*	1 set**	1 set**	1 set**	RT
标记缓冲液 S	10 mL	10 mL	10 mL	2~8°C
1×PBS (pH 7.4)	10 mL	10 mL	10 mL	2~8°C
DMF	100 μL	100 μL	100 μL	2~8°C, shading light
标记蛋白保存液	200 μL	1mL	5mL	2~8°C
建议标记抗体量	每管染料可标记 20~40μg 抗体 推荐标记 20μg 抗体	每管染料可标记 20~40μg 抗体 推荐标记 20μg 抗体	每管染料可标记 100~400μg 抗体，推荐 标记 200μg 抗体	

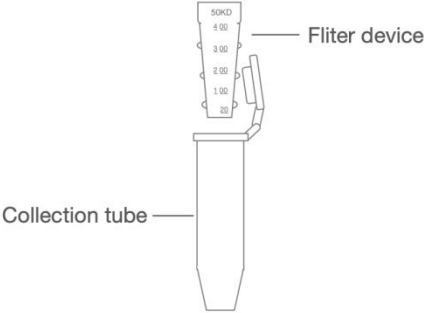
***超滤管使用说明:**

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

各组分按照储存温度存储，可稳定保存一年以上，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

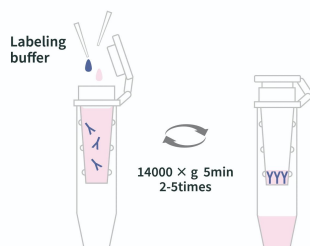
实验前准备

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. 超滤管浸润：向干燥的超滤管滤芯中加入 500 μ L 标记缓冲液，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）。
4. 溶解 Cyanine5.5：每管标记 20 μ g 抗体的染料用 1 μ L DMF 溶解，每管标记 200 μ g 抗体的染料用 10 μ L DMF 溶解，涡旋混匀或移液器吸打使其完全溶解，备用。
5. 抗体准备：请确保抗体样本符合下表标准

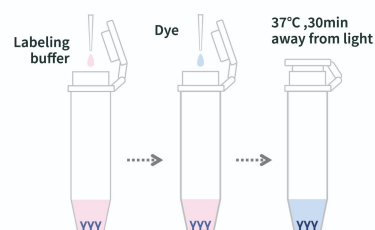
抗体组分	试剂盒标记兼容性
叠氮钠<0.1%，甘油<50%，Tris<50mM，甘氨酸<50mM，Proclin <0.5%，EDTA<10mM，海藻糖<5%，蔗糖<5%，或其他小分子添加物	是，执行 抗体样本超滤浓缩换液步骤 ，即标记步骤 1.
腹水、血清、细胞培养上清中的抗体	否，执行纯化步骤后再使用本试剂盒
含 BSA	否，使用 BSA 去除试剂盒（如 RE80028: BSA Removal Kit）纯化抗体后再使用本试剂盒
抗体浓度远低于 1mg/mL	是，执行 抗体样本超滤浓缩换液步骤 ，即标记步骤 1.

标记流程

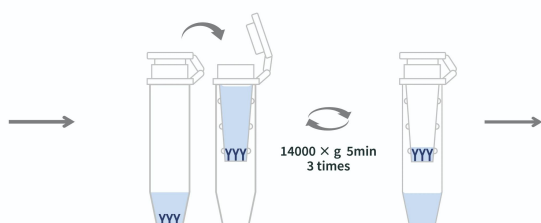
1. Replace the antibody buffer



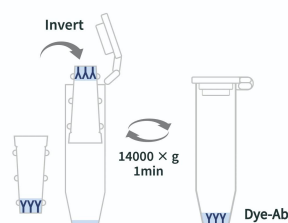
2. Labeling reaction



3. Ultrafilter



4. Collect Dye-Ab



标记步骤（适用于标记 500 μ g~2mg 抗体）

- 抗体样本超滤浓缩换液步骤：**取 500 μ g~2mg 待标记抗体于超滤管滤芯中，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 3~5 分钟，弃去滤液；可以重复此步骤 3 次，最后一次超滤完成得到 50~100 μ 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，补加标记缓冲液至总体积为 450 μ L。同时再将滤芯中补加适量 1 $\times$ PBS，保持湿润。
- 将 5 管溶解后的 Cyanine5.5 混合在一起共 50 μ L 再混合上述 450 μ L 抗体溶液（此时总体积约 500 μ L），轻轻快速吹打混匀。盖好盖子，放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中避光温育 30 分钟。
- 弃去滤芯中缓冲液，将 500 μ L 标记混合物转移至滤芯中，14000 $\times$ g 离心 3~5 分钟，弃去滤液，后更换使用 1 $\times$ PBS 缓冲液重复此步骤 3~5 次至收集管中滤液几乎透明。
- 加 200 μ L 1 $\times$ PBS 至超滤管中，轻轻吹打。将超滤管滤芯倒置于另一个收集管中，14000 $\times$ g 离心 1 分钟。收集管中得到的溶液，即为 Cyanine5.5 标记的抗体。（注：如需进行标记效果的 DOL 计算评估，请参阅附录说明，且在加入标记蛋白保存液之前进行）
- （可选）向标记后的抗体中加入适量**标记蛋白保存液**，4 $^{\circ}$ C 保存或分装后-20 $^{\circ}$ C 保存（也可不加蛋白保存液使用低吸附管子分装后-20 $^{\circ}$ C 保存），避免反复冻融，可稳定保存 6 个月以上。

标记步骤（适用于标记 100 μ g~200 μ g 抗体）

- 抗体样本超滤浓缩换液步骤：**取 100 μ g~200 μ g 待标记抗体于超滤管滤芯中，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 3~5 分钟，弃去滤液；可以重复此步骤 3 次，最后一次超滤完成得到约 30~40 μ 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，补加标记缓冲液至总体积为 95 μ L。同时再将滤芯中补加适量 1 $\times$ PBS，保持湿润。
- 将 5 管溶解后的 Cyanine5.5 混合在一起共 5 μ L 混合上述 95 μ L 抗体溶液（此时总体积约 100 μ L），轻轻快速吹打混匀。盖好盖子，放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中避光温育 30 分钟。
- 弃去滤芯中缓冲液，将 100 μ L 标记混合物转移至滤芯中，补足 1 $\times$ PBS 至 500 μ L，14000 $\times$ g 离心 3~5 分钟，弃去滤液，重复此步骤 3~5 次至收集管中滤液几乎透明。
- 取适量 1 $\times$ PBS（例如 100 μ L）至超滤管中，轻轻吹打。将超滤管滤芯倒置于另一个收集管中，14000 $\times$ g 离心 1 分钟。收集管中得到的溶液，即为 Cyanine5.5 标记的抗体。（注：如需进行标记效果的 DOL 计

算评估，请参阅附录说明，且在加入标记蛋白保存液之前进行）

5. （可选）向标记后的抗体中加入适量**标记蛋白保存液**，4℃保存或分装后-20℃保存（也可不加蛋白保存液使用低吸附管子分装后-20℃保存），避免反复冻融，可稳定保存6个月以上。

标记步骤（适用于标记 20 μg~40 μg 抗体）

1. **抗体样本超滤浓缩换液步骤：**取 20 μg~40 μg 待标记抗体于超滤管滤芯中，并加入不超过超滤管滤芯最大体积的标记缓冲液，14000 × g 离心 3~5 分钟，弃去滤液；可以重复此步骤 3 次，最后一次超滤完成得到 20~30 μL，将超滤管滤芯倒置于收集管中，14000 × g 离心 1 分钟，收集得到 20~30 μL 抗体溶液。将滤芯中补加适量 1×PBS，保持湿润。
2. 将溶解后的 Cyanine5.5 1 μL 全部加至上述 20~30 μL 抗体溶液中或将抗体溶液加入至溶解的染料中，轻轻快速吹打混匀。密封盖好盖子，放入 37℃恒温箱中避光温育 30 分钟。
3. 弃去滤芯中缓冲液，将标记混合物再转入滤芯中，补足 1×PBS 至 500 μL，14000 × g 离心 3~5 分钟，弃去滤液，重复此步骤 3~5 次至收集管中滤液几乎透明。
4. 将超滤管滤芯倒置于另一个收集管中，14000 × g 离心 1 分钟。收集管中得到的溶液，即为 Cyanine5.5 标记的抗体。（注：如需进行标记效果的 DOL 计算评估，请参阅附录说明，且在加入标记蛋白保存液之前进行）。
5. （可选）向标记后的抗体中加入适量**标记蛋白保存液**，4℃保存或分装后-20℃保存（也可不加蛋白保存液使用低吸附管子分装后-20℃保存），避免反复冻融，可稳定保存6个月以上。

注意事项

1. 本标记试剂盒设计是针对抗体(150 KD)的标记，如需要标记其他蛋白，请联系我们针对性选择相关试剂耗材或开展标记技术服务。
2. 染料易受潮水解失效，实验前将其移至室温平衡后再开封。
3. 本试剂盒中设计的染料用量和抗体用量相对固定，是基于标记多种抗体得出的经验比例，能保证得到较好效果。某些抗体或蛋白可能因特殊结构或定量差别较大，用户可根据实际情况选择合适规格的试剂盒增减染料用量进行标记比例优化。
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。

声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 本试剂盒也可用于标记除 IgG 抗体外的其他蛋白，但应认识到不同蛋白的多种性状的变化，如蛋白在不同缓冲液中的溶解度，pH 稳定性，温度稳定性，蛋白纯度，标记位点的可及性等都和 IgG 有较大区别，因此本标记试剂盒不对标记除 IgG 之外的蛋白做质量保证。

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 μL，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 μg 抗体至 20~30 μL 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 标记效果的 DOL 计算说明

1. 将少量纯化的蛋白偶联物稀释至 PBS 或其他适用缓冲液中，并在 1cm 光程的比色皿中测量 280nm 波长下的吸光度(A_{280})以及相应染料的最大吸光度 (A_{dye})。如果使用 NanoDrop 或微量酶标板可能提供更短的光程，请参阅仪器使用说明进行计算修改。比如某微量酶标板测量的光程是 0.5mm，测量 $A_{280}=0.1$ ，则换算成 1cm(=10mm)光程 $A_{280}=0.1*10/0.5=2$

2. 标记抗体浓度计算

抗体浓度 (mg/mL) = $(A_{280} - \text{CF280}_{\text{dye}} \times A_{\text{dye}}) \times 150000 \times \text{稀释因子} / 203000$

抗体浓度 (mol/L) = $(A_{280} - \text{CF280}_{\text{dye}} \times A_{\text{dye}}) \times \text{稀释因子} / 203000$

3. 抗体标记度 (DOL) 计算

$\text{DOL} = (A_{\text{dye}} \times 203000) / (E_{\text{dye}} \times (A_{280} - \text{CF280}_{\text{dye}} \times A_{\text{dye}}))$

附录 3 各小分子荧光染料技术参数

染料名称	标记试剂盒货号	Ex-Max/Em-Max	$E_{\text{dye}}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	$\text{CF280}_{\text{dye}}$
Cyanine5.5	RE80020	675nm/694nm	195000	0.09