

AF488抗体标记试剂盒

货号: R43295

储存条件: 2-8℃避光; RT; -20℃

有效期: 12个月

产品简介:

AF488 抗体标记试剂盒提供了抗体标记所需的所有试剂, 包括 AF488 NHS Ester、缓冲液和脱盐柱。试剂盒中的活性染料可与抗体或蛋白质中的赖氨酸残基高效结合, 生成共价连接的稳定产物。配套的离心式纯化柱可快速去除过量未反应的染料, 回收率可达 70%-95%。试剂盒内提供 5 管活性染料, 每管活性染料可实现 100μg 抗体的标记反应。

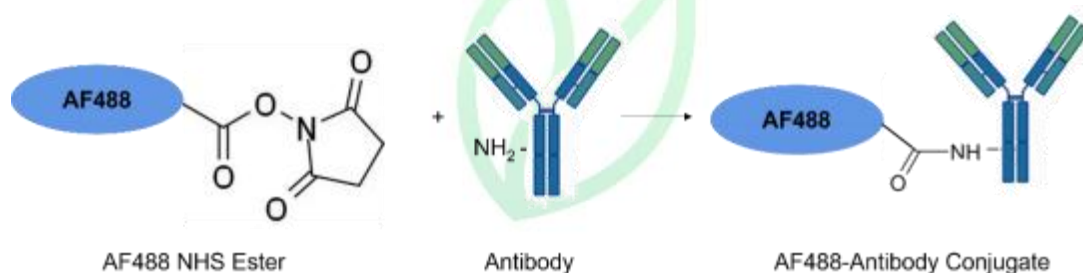


图 1 AF488 抗体标记试剂盒标记原理图

组分表:

R43295	Component	5 reactions	Storage	Quantity Per reaction
R43295-A	AF488 NHS Ester	5 vials	-20℃ . Store in the dark.	1 vial for labeling 100 μg of antibody
R43295-B	NaHCO ₃	100 mg	RT.	Prepare according to instructions
R43295-C	Spin Desalting Column	5 EA	2-8℃ . Do not freeze.	1 EA for 1 reaction
R43295-D	Collection Tubes	10 EA	RT.	2 EA for 1 reaction

其他所需试剂:

1. 离心机。
2. 用于标记的所需抗体 (不含 BSA 或任何载体蛋白)。
3. PBS 缓冲液 (pH 7.2-7.4)。



注意事项:

1. 纯化的抗体缓冲液中不得含有铵离子或者伯胺组分, 例如 Tris、甘氨酸、乙醇胺、三乙胺、谷胱甘肽或咪唑, 所有这些物质都会显著抑制蛋白质标记。
2. 用于标记的抗体需经过纯化, 不含有 BSA 或明胶等稳定剂。
3. 抗体浓度 1-2mg/mL 最佳, 浓度低于 1mg/mL, 标记效率可能会降低, 浓度过高, 抗体体积会过少, 不利于纯化回收。
4. 脱盐柱建议一次性使用。
5. 试剂盒使用之前, 需将所有组分恢复至室温。
6. 荧光染料均存在淬灭问题, 标记过程中请注意避光, 以减缓荧光的淬灭。

使用说明:

1. 缓冲液配制:

(1) 1M NaHCO₃的配制。根据待标记抗体量配制适量的 1M NaHCO₃溶液, 如称取 42mg NaHCO₃, 加入 0.5mL 超纯水即得 1M NaHCO₃溶液。NaHCO₃可维持标记反应体系的pH 在 7-9 之间, 提高标记效率。

注意: NaHCO₃溶液须现用现配。

2. 抗体标记:

(1) 如果待标记的抗体浓度 $\geq$ 1mg/mL, 并且在适当的缓冲液中, 则将其稀释至 1mg/mL, 并加入 10%抗体体积的 1M NaHCO₃缓冲液。如果抗体是从适当的缓冲液中冻干的粉末, 通过向抗体中加入适量的 0.1M NaHCO₃缓冲液来制备 1mg/mL 的抗体溶液。用去离子水将 1M NaHCO₃溶液稀释 10 倍, 制备 0.1M NaHCO₃缓冲液。

(2) 将 100 μ L 抗体溶液转移到活性染料管中。盖上管盖, 轻轻翻转几次, 使染料完全溶解。

注意: 为确保染料完全溶解, 请将标签从活性染料管上撕下。



(3) 将反应管室温避光反应 1h。反应可以在振荡器或混合器上进行, 建议上下翻转速度为25rpm。如果在反应过程中不使用混合仪器, 则应每 10 分钟将反应溶液倒置混合一次。

(4) 注意: 反应进行期间, 可提前进行步骤 3 的操作, 完成脱盐柱的平衡。

3. 脱盐柱预平衡:

(1) 松开脱盐柱盖子, 折断柱子下端堵头, 将脱盐柱置于配套的 2mL 收集管中。1000×g 离心 2 分钟, 丢弃离心下来的保存溶液, 并将脱盐柱放回收集管中。注意: 使用非水平转头的情况下, 由于离心会使树脂压实形成一个向上的斜面, 该斜面的方向宜在后续步骤中保持, 所以在脱盐柱外壳上的斜面向上位置做标记, 在随后的离心步骤中需要调整好离心管的放入方向, 确保离心后斜面的方向和位置不会改变。

(2) 向脱盐柱树脂顶部加入 500μL PBS, 轻轻拧上脱盐柱上盖, 1000×g 离心 2 分钟, 丢弃收集管中液体, 重复此步骤 3 次。

4. 荧光标记抗体纯化:

(1) 将平衡后的脱盐柱转移至新的收集管中。小心的将反应管中的反应液加入脱盐柱中, 盖上脱盐柱盖子, 注意盖子轻轻拧上即可。

(2) 脱盐柱 1000×g 离心 2 分钟, 收集管中的流出即为所需收集的抗体偶联物。

5. 测定蛋白质浓度和 DOL (可选)

(1) 使用吸收光扫描设备检测纯化后标记物的吸收光谱, 记录 280 和 490nm 处的吸光度值 (1cm 光程)。

(2) 计算偶联物中抗体浓度:

$$\text{抗体浓度 (mg/mL)} = (A_{280} - CF_{280} \times A_{490}) \times 150000 / \epsilon_{\text{IgG}}$$

(3) 计算 DOL:

$$\text{DOL} = (A_{490} / \epsilon_{\text{AF488}}) / [(A_{280} - CF_{280} \times A_{490}) / 210,000]$$



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

参数	含义	数值
DOL	表示偶联产物中荧光染料与目标分子（如抗体或蛋白质）的摩尔比	-
A ₄₉₀	AF488 在 490nm 波长处的吸光度值	见测值
ε _{AF488}	AF488 的摩尔消光系数 (M ⁻¹ cm ⁻¹)	76000
A ₂₈₀	AF488 标记的抗体在 280nm 波长处的吸光度值	见测值
CF ₂₈₀	AF488 在 280nm 处吸光度值的校正系数	0.1
ε _{IgG}	IgG 抗体在 280nm 处的摩尔消光系数 (M ⁻¹ cm ⁻¹)	210000

6. 保存与使用

向标记后的蛋白中加入 0.05~0.2 % Proclin 300 或 0.05 %叠氮化钠，及蛋白稳定剂(如 0.1 % BSA)，于 2~8℃ 避光保存，可稳定保存半年。或加入等体积甘油于-20℃ 存储，可稳定保存半年。



源叶