

蛋白荧光标记指南

■ 标记原理

将荧光染料与蛋白，抗体及其他生物分子偶联主要基于 NHS 酯反应化学，NHS 酯活化的荧光染料和待标记化合物在生理至弱碱性条件下（pH 7至 9）与伯胺反应，形成稳定的酰胺键，反应释放出 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）。从而实现与蛋白，抗体的偶联。

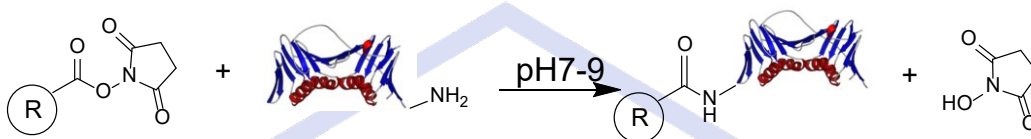


图 1：NHS 酯化学偶联到伯胺的反应图式。（R）表示具有 NHS 酯反应基团的荧光团；（P）表示含有伯胺的蛋白质，抗体或其他生物分子

■ 标记前准备

- 1，实验物品准备：移液枪及一次性吸头（0.5-10 μ L、2-20 μ L、20-200 μ L），恒温孵育震荡器，合适离心机。
- 2，使用试剂盒前请仔细阅读说明书，选择合适的规格，Nor 和 Plus 分别对应一次标记 0.1 mg 和 1 mg 蛋白量（试剂盒均为 5 kits），I4 和 I10 则分别对应蛋白伯胺含量较少和较多的情况。
- 3，超滤管 Ultra-0.5 tube 使用前仔细请参看 Milipore 官网指南。配置的超滤管为兼容较低分子量的蛋白，截留分子量为 10KDa。

[Amicon Ultra-0.5 mL 离心式过滤器，用于 DNA 和蛋白的纯化及浓缩 - Sample Prep Centrifugal Filter Units \(merckmillipore.com\)](https://www.merckmillipore.com/Prep-Centrifugal-Filter-Units)

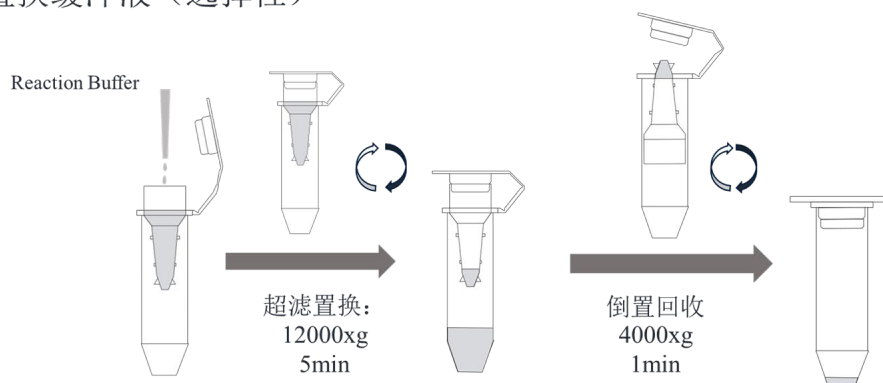
■ 标记步骤

1，置换缓冲液（选择性操作）

若您的抗体浓度较低，或储备在含有游离氨基的溶液中（Tris，氨基酸等含伯胺的物质），标记前请用配备的标记缓冲液（（Reaction Buffer））在 Ultra-0.5 tube 中超滤置换。



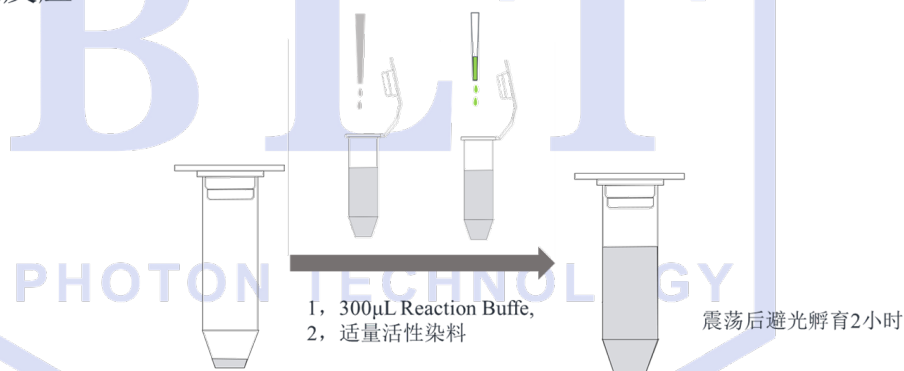
置换缓冲液（选择性）



2, 标记反应（对于 0.1mg 的抗体标记）

蛋白溶液置于300 μL 的反应体系，染料恢复至室温后，以10000 g 离心20 秒，排出卡在小瓶螺纹里的溶液，立即取出2 μL （每种规格的染料浓度已换算好，可以规格下的1/5 作为一次标记），加入上述300 μL 的反应体系中，然后震荡混匀，于37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2小时。

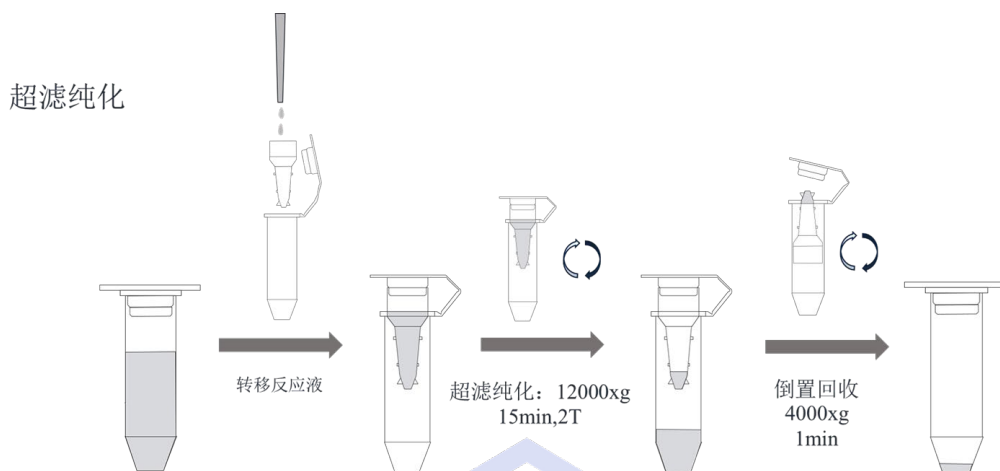
标记反应



3, 超滤纯化

转移反应液后以 12000 g 离心 15 min，去除游离的染料，然后使用标记缓冲液超滤，轻轻混匀溶液，避免触碰到膜，至少操作超滤 2 次至滤液无色，最后一次倒置内管超滤（4000 g，1 min），使浓缩后的样本从超滤内管转移到收集内管中，得到标记好的抗体即可使用，或置于适量的 Storage Buffer 内避光保存。





注：最佳标记比例可能根据蛋白的差异而不同，用户可根据实际情况优化。

■ 标记比及浓度计算

- 1, 使用紫外分光光度计扫描一定稀释程度的样本在 230 nm~900 nm 的吸收光谱，记录 A280 的吸光度及染料最大吸收处的吸光度。
- 2, 实验过程请注意调整两个吸光度值的大小范围，使蛋白的 280nm 的吸光度尽量处于 0.1-1 范围。
3. 结合相关数据计算公式如下：

标记比总公式：

$$\frac{\text{Dye}}{\text{Antibody}} = \frac{A_{(\lambda_{\max})} / \epsilon_{\text{dye}}}{(A_{280} - CF * A_{(\lambda_{\max})}) / \epsilon_{\text{Antibody}}}$$

- A280 是抗体在 280 nm 的吸光度；
- A λ max 是染料在最大吸收处的吸光度；
- CF 是染料对 280 nm 处的吸光度的影响的校正因子，一般取 0.03-0.07，参见染料信息；
- ε dye 和 ε Antibody 是染料和抗体的摩尔消光系数，IgG 抗体 ε Antibody 一般 210000 cm-1M-1，ε dye 参见染料信息；

蛋白浓度公式：

$$C_{\text{mg/mL}} = \frac{A_{280} - CF * A_{(\lambda_{\max})}}{\epsilon_{\text{Antibody}}} \times 150000$$





以 BLT800 标记抗体为例标记比则为：

$$\frac{Dye}{Antibody} = \frac{A780/240000}{(A280-0.03 \cdot A780)/210000}$$

■ 标记常见问题及解决方案

常见问题	原因分析	改善方案
超滤纯化过程蛋白出现聚沉	蛋白不兼容 pH	调整 pH 在适合范围
	超滤过程蛋白浓度变化太大	注意一次标记的蛋白浓度
超滤纯化过程较慢	转速不合适，超滤管截留分子量选择不当	转速单位调为 xg 单位，若为 150KDa 的抗体，可更换超滤管 100KDa
	活性染料储存使用不当，NHS 活性酯遇水活性键在几分钟或几小时完全失活，使得无法标记	活性染料注意防潮，平衡室温再打开
蛋白标记比较低	标记过程操作细节不当	请按照说明书调整，注意细节
	蛋白缓冲液含有干扰组分如过量铵离子或含氨基物质	标记蛋白前正确置换缓冲液
	光谱测定方法不准确	请按照正确的吸收光谱方法测定
较低蛋白回收率	超滤膜破损（转速过高破损）或过多装液体漏液	检查超滤膜及管芯不要装过多液体
	回收蛋白不当	采取倒置离心回收蛋白
	标记过程或超滤过程，蛋白发生聚沉	超滤过程每管降低蛋白浓度，或加入少量氯化铵（20mM）及时终止反应





■ 博鹭腾相关产品

产品名称	产品编号
BLTDye 800 标记试剂盒	ALW01/ ALW02/ ALW03/ ALW04
吖啶菁绿 标记试剂盒	ALG01/ ALG02/ ALG03/ ALG04

注：本司荧光标记试剂盒暂时提供近红外二区荧光染料标记的全套试剂盒，对于其他波长范围的荧光标记，我们有荧光染料 NHS 活性酯产品，对标记过程稍加修改也可做此类标记。

