

产品说明书

产品名称：AF 532 SE 微量抗体标记试剂盒 (AF 532 SE Microscale Antibody Labeling Kit)

产品货号：AFK0004

产品规格：1 个反应

产品组分：

组分	浓度	体积	规格
AF 532 SE 工作液	11.0 nmol/ μ L	2 μ L	1 管, 棕色管, 棕色盖
2 \times AF 532 SE 反应缓冲液	2 \times	100 μ L	1 管, 透明管, 蓝色盖
1 \times 稀释缓冲液	1 \times	500 μ L	1 管, 透明管, 白色盖
10 \times 终止缓冲液	10 \times	50 μ L	1 管, 透明管, 红色盖
DMSO	/	25 μ L	1 管, 棕色管, 锥底
10K, 500 μ L 超滤管	/	/	1 个

储存条件：-20 $^{\circ}$ C 避光保存, 有效期见外包装。

产品介绍

AF 532 SE 是一种氨基反应染料, 可与几乎任何蛋白质、抗体、胺修饰的寡核苷酸上的伯胺 (R-NH₂) 偶联。AF 532 SE 微量抗体标记试剂盒提供了一种使用 AF 532 SE 快速标记微量 (20~100 μ g) 抗体的方法。抗体标记通常可在 2 小时之内完成, 手动操作时间约 30 分钟。标记抗体可通过超滤膜快速进行脱盐纯化, 回收率通常为 60%~90%。AF 532 SE 微量抗体标记试剂盒可兼容低浓度的甘油、Tris 和硫柳汞, 但标记前必须去除样品中的稳定蛋白。

一个标准的 AF 532 SE 标记步骤中的染料与抗体分子的摩尔比已经过优化, 可用于标记 50 μ g IgG 抗体, 使其 DOL 在 2~6 范围内。因此在进行标记前, 需确认需标记 IgG 的 μ g 数量。在本试剂盒的标准反应体系中, IgG 的终浓度应不低于 1 mg/mL。若您需要更高的 DOL, 您可能需要调整反应体系中染料与抗体分子的摩尔比。

本试剂盒中配备的 2 \times AF 532 SE 反应缓冲液已根据 AF 532 SE 的特性进行了优化, 因此不建议与同系列的其他活化酯微量抗体标记试剂盒混用, 可能会导致最终的 DOL 与预期不符。

产品参数

名称	分子量	激发波长 Ex (nm)	发射波长 Em (nm)	消光系数 [L/(cm \times mol)]	校正系数 (A280/Amax)	荧光颜色
AF 532 SE	757.83	532	554	32,000	0.32	黄绿色

抗体预处理

AF 532 SE 微量抗体标记试剂盒不受硫柳汞的影响, 可以兼容低浓度的甘油 (终浓度<10%) 和 Tris (终浓度<20mM), 但不兼容甘氨酸和稳定蛋白。如需对商品化抗体进行标记, 建议联系供应商以确认抗体溶液的浓度, 以及是否含有稳定剂等信息。

蛋白性稳定剂可能会影响抗体最终的 DOL 值, 建议先进行纯化, 除去蛋白性稳定剂后再进行抗体标记。如果有必要, 应确保加入标准反应体系中的总蛋白质终浓度不低于 1mg/mL。

如需除去抗体溶液中的非蛋白性稳定剂 (如甘油、Tris、甘氨酸), 可使用试剂盒中的超滤管和 1 \times 稀释缓冲液进行抗体溶液置换。操作步骤如下:

- 1、将适量抗体溶液加至超滤管中, 注意移液枪头不要触碰超滤膜。最大速率 (14,000~16,000 \times g) 离心 2 min, 使液体全部流入收集管, 去除收集管中的液体。
- 2、将等体积的 1 \times 稀释缓冲液加至超滤管中, 注意移液枪头不要触碰超滤膜。最大速率 (14,000~16,000 \times g) 离心 2 min, 使液体全部流入收集管, 去除收集管中的液体。重复清洗 2~3 次。
- 3、添加适当体积的 1 \times 稀释缓冲液至超滤管中, 使最终的抗体浓度不少于 1 mg/mL。小心吹吸缓冲液以重悬抗体, 注意移液枪头不要触碰超滤膜。
- 4、将上述超滤管倒放至新的离心管中, 12,000 \times g 离心 2 min, 收集离心管中的液体, 将其转移至干净的

EP 管中待用。

局限性：

- ①10K 超滤膜的截留分子量约为 10kDa，因此适用于对分子量大于 10kDa 的生物分子进行脱盐纯化，不能用于对小于此分子量的生物分子进行脱盐纯化。
- ②抗体在反应体系中的终浓度高于 1 mg/mL 时，标记效率较高。因此如进行标记前，抗体的初始浓度较低时，也可使用超滤管进行浓缩，使其初始浓度高于 2 mg/mL。
- ③当反应体系的 pH 为弱碱性时，标记效率较高。因此进行标记前，抗体溶液的 pH 呈酸性或强碱性时，可先使用试剂盒中的超滤管和 1×稀释缓冲液对抗体溶液进行置换。
- ④试剂盒中的超滤管可一次性容纳的最大样本体积为 500 μ L，可浓缩的最小体积为 20 μ L，膜上的滞留体积小于 5 μ L。使用时应避免移液枪头触碰超滤膜，以免撕裂或穿刺超滤膜，导致抗体损失。

标准标记步骤

以下步骤适用于标记体内成像的 IgG（最适 DOL 为 2~6），一个标准标记反应体系中的抗体总量为 50 μ g：

- 1、从 -20℃ 取出试剂盒中的所有组分，恢复至室温后，短暂离心，使液体集中在离心管底部。
- 2、依据抗体的初始浓度计算需加入反应体系的体积，依据下表将反应体系中的各组分进行混合（50 μ L 反应体系）：

组分	体积 (μ L)
AF 532 SE 工作液	3.5
2× AF 532 SE 反应缓冲液	25
抗体 (50 μ g)	X
ddH ₂ O	补足至 50

- 3、在室温避光摇晃反应 1 h 后，向反应体系中加入 1/10 体积的 10× 终止缓冲液，室温避光孵育 30 min，以终止反应。
- 4、将上步的反应液全部转移至超滤管中，最大速率（14,000~16,000×g）离心 2 min，使液体全部流入收集管，去除收集管中的液体。
- 5、向上步的超滤管中加入 100 μ L 1×稀释缓冲液，小心重悬抗体后，最大速率（14,000~16,000×g）离心 2 min，使液体全部流入收集管，去除收集管中的液体。重复洗涤 2~3 次，直至残余的未结合染料完全洗脱。
- 6、向上步的超滤管中加入适量的 1× 稀释缓冲液，使最终的抗体浓度不少于 1 mg/mL。小心吹吸缓冲液以重悬抗体，注意移液枪头不要触碰超滤膜。
- 7、将上步的超滤管倒置在新的收集管中，12,000×g 离心 2 min，收集离心管中的液体，将其转移至干净的 EP 管中。
- 8、标记好的抗体可直接使用，如需长期保存，则需另加入适量的稳定剂后，存放于 -20℃。

注意事项

- 1、荧光染料在光照下可能发生猝灭，使用时应注意避光，以减缓荧光猝灭。
- 2、AF 532 SE 微量抗体标记试剂盒中说明书所述的标记步骤仅适用于标记用以进行体内成像的 IgG 类抗体。标记不同的抗体，适用于不同应用场景的抗体，所需的染料与抗体标记比例可能不同。
- 3、AF 532 SE 微量抗体标记试剂盒针对抗体标记进行了优化，如用于其他蛋白质的标记，可能无法达到最佳 DOL 值。
- 4、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。