BF488高效蛋白标记试剂盒

Protein Labeling Kit For BF488

本产品冰袋运输；反应性 BF488 需 -20°C避光保存，其余组分 4°C保存，纯化柱严禁冷冻，保质期 12 个月。

货号规格

货号	规格
JQ101	10次(每次可标记0.3 nmol蛋白)

产品内容

组分名称	数量或体积	保存条件
反应性 BF488	1支	-20°C；避光；防潮
碳酸氢钠	84 mg	4°C；防潮
无水溶剂	30 μL	4°C
超纯水	1 mL	4°C
纯化柱及收集管	10套	4°C，严禁冷冻

产品简介

本试剂盒可以将蛋白高效共价标记 BF488 荧光染料（ Ex/Em：494/517 nm，与 Alexa Fluor® 488 光谱等效)。反应性 BF488 荧光染料带有琥珀酰亚胺酯(NHS ester)，可与蛋白质的伯胺 (R-NH_2) 高效反应，形成稳定的染料 - 蛋白偶联物。

试剂盒所配纯化柱预装即用型树脂，专为高效去除未偶联荧光染料而优化，兼顾出色的蛋白回收性能。

产品特点

高效便捷 — 2 h 内完成标记，操作简便，标记效率高，可有效保证生物大分子的活性；

纯化省心 — 配备纯化柱，可轻松去除未偶联染料及盐离子，无需透析。

注意事项

1. 实验操作过程中须避免强光直射；
2. 待标记蛋白须置于无铵离子和伯胺 (R-NH_2) 的缓冲液中；
3. 叠氮钠和硫柳汞可能干扰偶联反应，建议通过透析或脱盐柱预先去除，以获得最佳标记效果；
4. 反应性 BF488 荧光染料遇潮易水解失活；碳酸氢钠粉末易吸湿。二者均须干燥密封保存。
5. 纯化柱为一次性耗材，不可重复使用；柱内残留染料易引发样品交叉污染；
6. 若待标记蛋白浓度低于 1 mg/mL，建议浓缩至 2 mg/mL 后再进行标记，否则会降低标记效率，增加样品的损耗；
7. 本试剂盒配备 10 套纯化柱及收集管；如需额外纯化柱，可另行购买(货号：YJ109)；
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
9. 本产品仅限科研使用。

操作步骤

试剂准备

- 向反应性 BF488 荧光染料管中加入 15 μL 无水溶剂，涡旋至完全溶解，即得到 10 mM 染料溶液。分装后于 -20°C避光保存，两个月内有效；
  注意：无水溶剂 4°C 保存时为固态，请置于室温（25°C）完全融化后再使用。
- 向碳酸氢钠管中加入 1 mL 超纯水，涡旋至完全溶解，即得到 1 M 碳酸氢钠溶液（pH 8.3）。4°C可保存两周，或冷冻长期保存。

蛋白准备

- 为获得最佳标记效率，纯化蛋白须置于不含铵离子或伯胺的缓冲液中；若蛋白处于含 Tris 或甘氨酸等的缓冲液中，应通过脱盐柱或透析将缓冲液更换为 PBS 或 0.1 M 碳酸氢钠溶液；若使用碳酸氢钠溶液，可省略标记步骤 1 中添加 1/10 体积碳酸氢钠溶液的操作；
- 用 PBS 或 0.1 M 碳酸氢钠合适缓冲液将蛋白浓度调至 2 mg/mL 以上，低于 2 mg/mL 可能会影响荧光标记效率；
- 不纯蛋白（如粗血清中的抗体）标记效果不佳。

蛋白标记 <以50 μg抗体(150 kda)为例>

1. 向 25 μL 的 2 mg/mL 蛋白溶液中加入 2.5 μL 预先配制的 1 M 碳酸氢钠溶液；
2. 按下列公式计算反应性 BF488 荧光染料用量，其中 MR 为染料 : 蛋白摩尔比，推荐值为 4~10：

$$\text{反应性BF488荧光染料用量}(\mu L)=\frac{\dfrac{\text{蛋白质量}(\mu g)}{\text{蛋白摩尔质量}(g/mol)}\times 1{,}000\times MR}{\text{染料浓度}(10\ mM)}$$

例如：标记 50 μg IgG（分子量 150,000），MR 取 10，反应性 BF488 荧光染料用量如下：

$$\frac{\dfrac{50\ \mu g}{150{,}000\ g/mol}\times 1{,}000\times 10}{10\ mM}\approx 0.3\ \mu L$$

3. 向蛋白溶液中加入 0.3 μL 预先配制的反应性 BF488 荧光染料，混匀后室温反应 1 h（推荐在翘板摇床上进行）。

蛋白纯化

4. 拧下纯化柱底部密封塞，拧松顶部盖子（勿取下）；
5. 将纯化柱置于收集管中，离心（2,000×*g*，2 min），弃去流出液，以去除储存缓冲液；
6. 在纯化柱树脂倾斜面较高侧的柱壁做标记；后续所有离心步骤中，均保持标记侧朝向离心机转子外侧；
   注意：纯化柱方向放置错误可能导致染料去除效果不佳。
7. （可选）向纯化柱中加入 400~500 μL PBS，离心（2,000×*g*，2 min），弃去流出液；
8. 将预处理后的纯化柱放入新的 1.5 mL 离心管，取下顶部盖子，将 100 μL BF488 标记蛋白样品（提前用 PBS 补足至 100 μL）缓慢滴加至树脂中心；
9. 离心（2,000×*g*，2 min），弃去纯化柱，离心管中收集的液体即为纯化后的蛋白样品。可测定 A_{280} 和 A_{494} 以计算蛋白浓度与标记度（DOL）。
   注意：标记后的蛋白于 4°C避光保存；长期保存建议添加 0.1% BSA 和 2 mM 叠氮钠。

标记度(DOL)计算方法

1. 计算蛋白摩尔浓度

$$C_{protein} = \frac{A_{280校正} \times 蛋白稀释倍数}{\varepsilon_{protein}} = \frac{[A_{280} - A_{494} \times 0.11] \times 蛋白稀释倍数}{\varepsilon_{protein}}$$

注意：0.11 为 BF488 荧光染料对 280 nm 吸光度的校正因子(CF)。

2. 计算染料摩尔浓度

$$C_{dye} = \frac{A_{494} \times 染料稀释倍数}{\varepsilon_{dye}}$$

注意：BF488 荧光染料消光系数ε_{dye} 等于 71,000 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$。

3. 计算标记度 (DOL)

$$DOL = \frac{C_{dye}}{C_{protein}} = \frac{A_{494} \times 染料稀释倍数 \times \varepsilon_{protein}}{[A_{280} - A_{494} \times 0.11] \times 蛋白稀释倍数 \times \varepsilon_{dye}}$$

例如：用 BF488 标记 IgG，染料和蛋白的稀释倍数均为 1，测得 A_{280}=0.6，A_{494}=0.7，IgG 消光系数 $\varepsilon_{protein}$=210,000，计算如下：

$$DOL = \frac{0.7 \times 1 \times 210{,}000}{(0.6 - 0.7 \times 0.11) \times 1 \times 71{,}000} \approx 3.96$$