

燐速標® PhoProLab®

# 橘燐光鎔螯合物蛋白標記套組使用說明

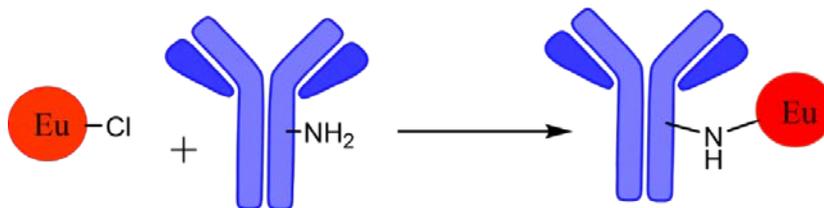
## Protein-NH<sub>2</sub> Labeling Kit-Orange Eu Product Information

### 快速使用指引

1. 存放條件：在 4 °C 冷藏下避光存放。正常存放條件下，本產品可存放逾一年。
2. 試劑 A 開封後，請在 -20 °C 下，密封避光冷凍保存。
3. 反應溫度與時間：37 °C / 2 小時。
4. 鎔螯合物須以 335 nm 光源激發，觀察 620 nm 燐光放光。

### 一、產品簡介

本套組將鎔金屬燐光螯合物活化後，可直接與目標抗體蛋白的氨殘基，或其他含一級胺（伯胺）基的大分子形成共價鍵，作為免疫染色或是細胞蛋白質之標記應用。本套組包含離心透析管，以去除未反應的鎔金屬燐光螯合物。樣品中如含有一級胺之小分子，例如 Tris、Glycine，這些分子會干擾檢測或標記反應，亦可使用此離心透析管，在標記反應前加以去除。標記過程非常簡單：將活化後的鎔金屬燐光螯合物溶液，加入位於離心透析管濾膜上方的蛋白質溶液中，並在 37 °C 下孵育 2 小時。過量的未反應之鎔金屬燐光化合物可透過離心透析管去除。標記後的蛋白，其最大激發波長和放光波長分別為 335 nm 和 620 nm。兩光譜有高達 285 nm 的 Stokes shift，吸收與放光光譜完全分離，有助於發光穩定性，在 335 nm 的 UV 光源連續照射一小時，放光強度幾乎維持相同。此外，本產品之鎔金屬螯合物，屬於燐光材料，光子生命期長達 1.0 ms，可利用時間解析 (time resolution) 之光譜設備，有效區別樣品之內源性螢光訊號。此試劑組包含標記所需的必要所有試劑，包括用於保存標記後的蛋白保存液。



圖一、活化後鎔金屬發光螯合物標記抗體示意圖。

### 二、產品內容、運送與儲存：

名稱	說明	3 tests	運送&儲存
試劑 A	活化鎔螯合物	綠標半透明塑膠管 X3	4 °C 冷藏 避光
試劑 B	沖洗緩衝液	5 mL · 紅標藍蓋半透明塑膠管 X1	
試劑 C	反應緩衝液	5 mL · 黃標白蓋半透明塑膠管 X1	
試劑 D	蛋白保存液	1 mL · 紫標綠蓋半透明塑膠管 X1	
離心透析管		X3	

※本產品每一反應可標記分子量大於 50,000 之蛋白，重量約為 50-200 μg。

※收到本產品後，請取出試劑 A，在 -20 °C 密封避光冷凍保存。其餘試劑在 4 °C 下保存即可。

※請勿以試劑 D 重懸浮蛋白，計算鎔螯合物與蛋白標記比例 (步驟 2.2.5)，試劑 D 會影響計算結果。請先使用試劑 B 重懸浮蛋白，計算出標記比例後，再進行步驟 2.2.6。

### 三、 產品使用步驟：

#### 1. 未提供實驗材料：

- 1.1 體積可調式單管移液槍。(200  $\mu\text{L}$ )
- 1.2 細胞培養之培養箱。
- 1.3 微量離心管。
- 1.4 微量離心機。(8000  $\times g$ )

#### 2. 開始實驗：

##### 2.1 實驗前注意事項：

- 2.1.1 若欲標記的蛋白溶液中含有分子量超過 10,000 之雜質蛋白，如血清蛋白(serum albumin)、膠原蛋白(gelatin)...等，請務必純化此蛋白溶液，否則該雜質蛋白會影響標記反應進行。
- 2.1.2 假如欲標記之蛋白溶液含有不溶的物質，請離心後取上清液，進行標記。
- 2.1.3 從冷藏環境中取出本產品時，在本產品所附之離心透析管管壁，偶爾會出現凝結水珠，此為正常現象，並不會影響標記效果。

##### 2.2 進行實驗：

###### 2.2.1 置換蛋白溶液中的緩衝液：

欲標記之蛋白溶液中，其所使用之緩衝液，可能含有 Tris 等含氨基干擾物質，請移除。將 100  $\mu\text{L}$  的沖洗緩衝液(試劑 B)加入套組所附之離心透析管中，添加欲標記之蛋白溶液 25~100  $\mu\text{L}$ (蛋白濃度勿超過 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，使欲標記之蛋白總量控制在 50-200  $\mu\text{g}$ )。反覆抽吸數次，均勻混合兩溶液。在 8000  $\times g$  下離心 10 分鐘。再次添加 200  $\mu\text{L}$  的沖洗緩衝液(試劑 B)，反覆抽吸數次，重新懸浮蛋白。在 8000  $\times g$  下離心 10 分鐘，以完全去除干擾物質。

註 1：使用離心機時請記得保持轉子左右重量平衡，以確保離心機運行穩定。若離心後仍有溶液停留在透析膜上方，可再延長離心 5 分鐘。

註 2：若欲標記蛋白溶液的濃度過低，可重複此步驟，收集足夠(50-200  $\mu\text{g}$ )之蛋白。

註 3：離心透析管下方的空間約為 400  $\mu\text{L}$ 。請在下方液體液面快觸及內套管管底前，適時移除下方液體。

###### 2.2.2 配置活化鎔螯合物工作液：

取出本套組，在室溫下靜置 30 分鐘以上。吸取 1 mL 反應緩衝液(試劑 C)，加入活化鎔螯合物(試劑 A)管中，反覆抽吸和 vortex 數次，直到染劑粉末完全溶解。活化鎔螯合物對水相當敏感，請立即進行以下標記反應步驟。未使用完之工作液請棄置，以隔夜或長時間未使用之工作液進行標記反應，可能會導致標記失敗。

###### 2.2.3 進行標記反應：

將步驟 2.2.2 之工作液 200  $\mu\text{L}$  加入步驟 2.2.1 之離心透析管中，反覆抽吸數次，均勻混合。在 37 度培養箱中，孵育 2 小時。

註 1：若欲標記之蛋白總量接近 200  $\mu\text{g}$ ，可添加 200  $\mu\text{L}$  工作液。視欲標記之蛋白總量，調整工作液添加的體積，用反應緩衝液(試劑 C)將總反應體積維持在 200  $\mu\text{L}$ 。舉例來說，若只使用 50  $\mu\text{L}$  工作液，可再添加 150  $\mu\text{L}$  的反應緩衝液(試劑 C)。

###### 2.2.4 去除未反應之鎔螯合物：

將 100  $\mu\text{L}$  的沖洗緩衝液(試劑 B)加入離心透析管中，反覆抽吸數次，均勻混合兩溶液，在 8000  $\times g$  下離心 10 分鐘。再次添加 200  $\mu\text{L}$  的沖洗緩衝液(試劑 B)，反覆抽吸數次，重新懸浮蛋白。此清洗步驟可反覆 3-4 次，確保未反應之鎔螯合物，完全去除。

### 2.2.5 計算鎔螯合物與蛋白標定比例：

添加 200  $\mu\text{L}$  沖洗緩衝液(試劑 B)，反覆抽吸十次以上，確保已標記之蛋白完全重懸浮，轉移此溶液到凍存管中(產品未提供)。測量此溶液在 280 nm 和 335 nm 的吸收度，以下列公式計算：

$$\text{每蛋白分子標定鎔螯合物分子比例} = \frac{A_{335}/31,000}{(A_{280} - A_{335} \times 0.725)/\epsilon \text{ of protein}}$$

$A_{335}$ ：鎔螯合物在 335 nm 的吸光度。

$A_{280}$ ：在 280 nm 的吸光度。

$\epsilon$ ：蛋白質在 280 的消光係數。若此蛋白為 IgG，此數值為 216,000。

**註 1**：請勿在此步驟使用蛋白保存液(試劑 D)重懸浮已標記蛋白，請改用沖洗緩衝液(試劑 B)。

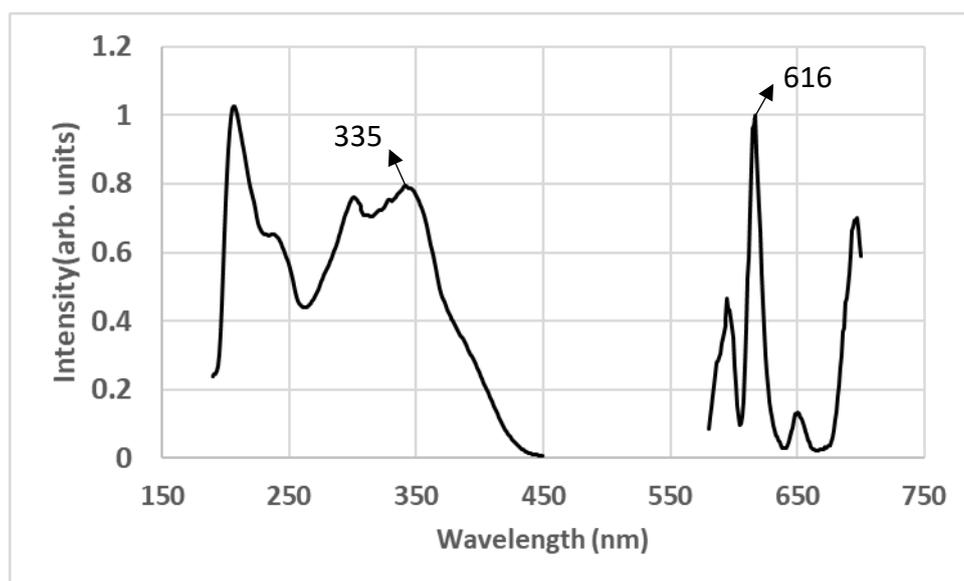
### 2.2.6 回收已標記之蛋白：

在離心後，透析膜上方無液體的狀態下，添加 200  $\mu\text{L}$  蛋白保存液(試劑 D)，反覆抽吸十次以上，確保已標記之蛋白完全溶解與懸浮，轉移此溶液到凍存管中(產品未提供)。

**註 1**：本套組提供之蛋白保存液(試劑 D)含有高濃度甘油(不含  $\text{NaN}_3$ )，可在  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  下保存蛋白長達一年。若在  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  可存放更久。

**註 2**：您可以在此步驟使用您實驗室常用的蛋白保存劑與保存方法，或是，將此標記蛋白分裝，以避免日後使用時，反覆凍融。

## 四、光譜圖：



圖二、鎔金屬磷光螯合物未接枝蛋白前之 UV-Vis 與磷光放光光譜圖。

---

聚創新材料股份有限公司

**IMT FORMOSA New Materials Co., Ltd.**

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: [polycreatives@outlook.com](mailto:polycreatives@outlook.com)

聯絡人 Contact: Peter Hsu

