

NHS 活性酯荧光标记通用型指南

■ 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。

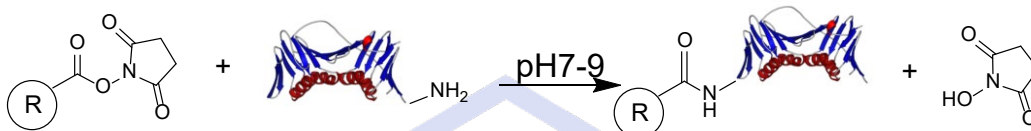


图 1: NHS 酯化学偶联到伯胺的反应图式。(R) 表示具有 NHS 酯反应基团的荧光团；(P) 表示含有伯胺的蛋白质，抗体或其他生物分子

■ 标记前准备

- 1, 实验物品准备:** 移液枪及一次性吸头 (0.5-10 μL 、2-20 μL 、20-200 μL)，恒温孵育震荡器，合适离心机。
- 2, 准备活性染料酯母液:** 粉末一般使用DMSO溶解，根据试剂的溶解性而定。母液应分装低于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存，避免反复冻存和受潮。
- 3, 标记缓冲液配制:** 标记实验请自行准备合适缓冲液，缓冲液应具有适宜的 pH 和成分，例如：10-50 mM的硼酸钠溶液，PBS或碳酸氢钠溶液 (pH 7.5- 8.5)，应不包括 Tris，氨基酸等含伯胺的物质。
- 4, 纯化方式选择:** 纯化方式试实验要求可选择多种方式，实验前请自行选择纯化方法。纯化装置包括Zeba脱盐离心柱纯化，Sephadex G-25凝胶过滤柱纯化，超滤管纯化等
注：推荐选择超滤管纯化，本司试剂盒产品配置有超滤管，超滤管使用前仔细请参看 Milipore 官网指南。

[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 \(merckmillipore.com\)](#)



以超滤管纯化方式的标记步骤

■ 标记步骤

1, 置换缓冲液（选择性操作）

若您的抗体或蛋白浓度较低，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），标记前请用标记缓冲液超滤置换抗体溶液。

2, 标记反应量计算

每种染料标记比选择取决于染料类型，蛋白类型和实验目的，例如 cy 系列和蛋白最佳标记摩尔比在 1:4——1:20。为了获得最佳的摩尔比例，可以要通过预实验进行摸索。每个标记反应染料的使用量取决于代标记蛋白的质量，浓度和分子量。在确定好大概摩尔标记比的情况下，使用以下公式进行计算染料投量：

$$n(\text{染料}) = \frac{m(\text{染料})}{M(\text{染料})} = \frac{a * m(\text{Ab})}{M(\text{Ab})}$$

- $n(\text{染料})$ 是标记抗体 Ab 或蛋白计算所用的染料**摩尔量**；单位 mmol
- $m(\text{染料})$ 是标记抗体 Ab 或蛋白计算所用的染料质量,单位 mg;
- a 是投料摩尔标记比（抗体：染料=1： n ）；
- $m(\text{Ab})$ 是待标记抗体 Ab 或蛋白的总质量，单位 mg；
- $M(\text{Ab})$ 是抗体或蛋白的分子量 单位 Da；
- $M(\text{染料})$ 是所用染料的分子量 单位 g/mol；

计算好染料的**摩尔使用量**，换算为母液取用量，一般染料母液取用量不超过反应体系的 10%。

$$V(\text{取母液体积}) = \frac{n(\text{染料})}{c(\text{母液浓度})} * 10^6$$

- $V(\text{取母液体积})$ 是所取染料的体积，单位 μL ；
- $c(\text{母液浓度})$,是存储母液浓度，单位 mM

3, 以投料比 1:5（蛋白与染料的摩尔比）的标记实验

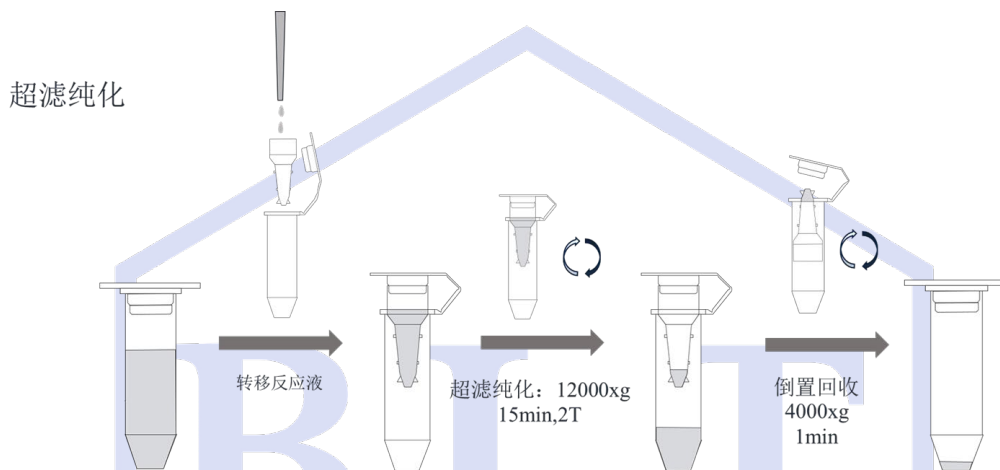
取出储存的 2 mM 染料母液，染料恢复至室温，抗体或蛋白溶液置于 300 μL 的标记缓冲液反应体系，对于标记 0.1 mg 的 IgG 抗体（150 KDa），立即取 $V = 5 * 0.1 * 10^6 /$



(2*150000) μL =6.7 μL ，加入到体系内，震荡均匀，染料可分多次加入震荡，然后在室温避光条件孵育2小时。

4, 超滤纯化 (若使用超滤管)

标记反应完成后，转移反应液后以 12000 g 离心超滤 15 min，去除游离的染料，超滤过程轻轻混匀溶液，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 1%BSA 储存液避光保存。



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。超滤过程存在膜吸附，不影响后续使用。

■ 标记比及浓度计算

- 1, 每种染料的偶联率在 50%--90%，真实标记比需借助紫外分光光度计测试计算。
- 2, 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。
- 3, 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。
4. 结合相关数据计算公式如下：

实际标记比总公式：

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

- 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：

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

以 BLT800 标记抗体为例标记比则为：

$$\frac{\text{Dye}}{\text{Antibody}} = \frac{A_{780} / 240000}{(A_{280} - 0.03 * A_{780}) / 210000}$$

■ 标记常见问题及解决方案

常见问题	原因分析	改善方案
	蛋白与染料的投料摩尔比过高 (蛋白浓度过高，染料浓度过高)	首先降低投料摩尔比，若仍出现，降低反应体系投料蛋白量和相应的染料量
标记过程中蛋白出现带颜色沉淀	反应体系存在使待标记物质聚沉的物质，可能是蛋白不耐受 pH、盐浓度，被标记后在体系聚沉	改变相应条件尝试
	染料分子结构特性的水溶性不高	选择水溶性更高的染料，例如磺化的染料，但 cy 的波长碳链越长越高，水溶性越差，就算磺化后也会出现一点聚沉，只能通过其他方式减少聚沉
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
	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
较低蛋白回收率	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
Cy 系列染料	FD-CY××××
AF 系列染料	FD-AF××××
ATTO 系列染料	FD-AT××××

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。



