# 底纹-01-01**产 品 说 明 书**

Tanda® Microscale Protein Labeling Kit

产品货号：TDLK23006S, TDLK23006M, TDLK23006L

产品规格：S, M, L

产品内容：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **组分** | **TDLK23006S (5-20 μg)** | **TDLK23006M (20-50 μg)** | **TDLK23006L (50-100 μg)** |
| **A: Reactive dye vial**2–6℃ or ≤–20℃, if desiredProtect from lightProtect from moisture• Protect from moisture | 1 vial | 1 vial | 1 vial |
| **B: Sodium bicarbonate**(MW = 84) 10 ×~84mg，Protect from moisture | 84mg | 84mg | 84mg |
| **C:Purification columns**Store at room temperature | 1column | 1column | 1column |
| **D：Purification resin** 2–6℃ only; DO NOT FREEZE | ~5mL | ~5mL | ~5mL |
| **E：Ultrafiltration vial** (MWCO=10K) | 1 each | 1 each | 1 each |

染料信息

|  |  |
| --- | --- |
| Tanda® Microscale Protein Labeling Kit | **货号** |
| **Label Dye** | **Ex (nm)** | **Em (nm)** | **1 × (5-20 μg)** | **1 × (20-50 μg)** | **1 × (50-100 μg)** |
| Biotin | N/A | N/A | TDLK23001S | TDLK23001M | TDLK23001L |
| FITC | 494 | 518 | TDLK23002S | TDLK23002M | TDLK23002L |
| Tanda®350 SE | 347 | 448 | TDLK23003S | TDLK23003M | TDLK23003L |
| Tanda®405S SE | 404 | 431 | TDLK23004S | TDLK23004M | TDLK23004L |
| Tanda®405 SE | 408 | 452 | TDLK23005S | TDLK23005M | TDLK23005L |
| Tanda®488(6)-2 SE | 490 | 515 | TDLK23006S | TDLK23006M | TDLK23006L |
| Tanda®532 SE | 527 | 558 | TDLK23007S | TDLK23007M | TDLK23007L |
| Tanda®555 SE | 555 | 565 | TDLK23008S | TDLK23008M | TDLK23008L |
| Tanda®568 SE | 562 | 583 | TDLK23009S | TDLK23009M | TDLK23009L |
| Tanda®594 SE | 590 | 617 | TDLK23010S | TDLK23010M | TDLK23010L |
| Tanda®640 SE | 642 | 662 | TDLK23011S | TDLK23011M | TDLK23011L |
| Tanda®647A SE | 650 | 665 | TDLK23012S | TDLK23012M | TDLK23012L |
| Tanda®660 SE | 663 | 682 | TDLK23013S | TDLK23013M | TDLK23013L |
| Tanda®750 SE | 750 | 777 | TDLK23014S | TDLK23014M | TDLK23014L |

**储存条件**

4℃保存，有效期见外包装。

Tanda® 标记试剂盒包含您需要的利用本公司 Tanda® 染料或生物素（Biotin）迅速标记抗体的所有组分。标记过程只需将抗体和染料简单混合于试剂盒内提供的反应缓冲溶液中，进行短时间的孵育即可。标记 后，约 4-6 分子染料与 1 分子抗体共价结合。Tanda® 是共价标记，所以用它标记的抗体可以用于多色荧光染色， 而不会发生抗体间的染料转移现象。

Tanda® 标记可以兼容 NaN3、低浓度的甘油、Tris 和甘氨酸。试剂盒里提供的微型超滤离心管可以在标记前快 速去除不兼容的小分子抗体稳定剂。

标准 Tanda® 标记步骤可以用于多于 IgG (μg) 4 倍的 BSA 或明胶样品。根据您希望标记的 IgG 量来选择试 剂盒大小。优化标记步骤适用于稳定蛋白质过剩或腹水的 IgG 样品。在这种情况下，根据需要标记抗体样本的蛋白质总量（IgG +稳定剂，或腹水中总蛋白量）来选择试剂盒大小。优化步骤也可用于标记 IgG 量低于最低范围的样品，通 过添加稳定剂蛋白使总蛋白量达到试剂盒的标记范围。优化 步骤不建议用于标记天然抗血清或杂交瘤细胞株培养上清， 因为这些样本的抗体含量相对于总蛋白非常低。

当用荧光标记抗体直接进行免疫荧光时，您可能需要使用更高浓度的抗体来实现类似间接免疫荧光法检测（一抗加 标记二抗）染色的强度。在我们的内部测试中发现，间接免 疫荧光染色结果是直接免疫荧光染色信号的三倍左右。

标记二抗仍可以连接到使用 Tanda® 试剂盒标记 的一抗上，因此如果多个来自同一物种的抗体用于多色免疫 荧光染色法，二抗无法区分同一物种来源的未标记的一抗和 使用 Tanda® 试剂盒标记的一抗。Tanda®标记 抗体可以用作传统间接免疫荧光法检测后的三级染色。我们还提供生物素 Tanda® 标记试剂盒、酶标记和荧光蛋白标记的 Tanda®试剂盒。

# 准备工作

Tanda® 抗体标记试剂盒适合标记 IgG等蛋白。如果标记其他蛋白质，可能标记的 DOL（degree of labeling）要根据不同蛋白来计算所需染料量。Tanda® 标记可能导致 IgM抗体变性。

检查你的抗体与抗体兼容性指南。如果你的一抗是商业产品，请联系供应商以获取抗体浓度和配方。Tanda® 标记不能用于标记天然抗血清或杂交瘤细胞株培养上清液，需要进行抗体纯化后再进行标记。

***不含稳定剂的抗体溶液可以得到较好的标记结果***，而标准的标记步骤可以兼容低浓度甘油， 标记液不受 NaN3 的影响。对于标准的标记步骤（B），根 据需要标记的 IgG 的 ug 数量选择试剂盒的规格。

Tanda® 的优化步骤（C）是基于标记蛋白质总量而不是 IgG 标记量来设计的。优化步骤应用于含有过多稳定蛋白质的抗体标记，溶液中的抗体标记也适用于优化步骤， 但您必须在标记前确定溶液中总蛋白的浓度（通过测量 280 nm 吸光度估计蛋白质浓度）。试剂盒规格的选择根据您标 记抗体样本的总蛋白量来确定。优化步骤也可用于标记 IgG量低于试剂盒最低范围的样品，通过添加稳定蛋白使总蛋 白量在试剂盒的标记范围之内。

含有低浓度 BSA 和明胶的标记抗体可能染色背景略强 于不含这些稳定剂的抗体。如果抗体标记在含有 BSA 或明 胶存在的情况下进行，使用包含 1% BSA 或明胶的阻断和清 洗剂将大大降低染色背景。此情况应尽量避免。

去除非蛋白成分如 Tris、甘氨酸或甘油，可以用试剂盒中提供的超滤管来纯化您的抗体，步骤如下（A）。

标记效率较高的抗体浓度为 1-5 mg/mL。超滤管可用于浓缩抗体（注意：稳定蛋白质也将集中于超滤瓶）。为定 量未知浓度的抗体，如果不需要去除或浓缩抗体，则按照标准步骤（B）或优化步骤（C）进行实验。

表 1. Tanda® 抗体兼容性和标记步骤选择指南

|  |  |
| --- | --- |
| **组分** | **兼容性** |
| NaN3 | 兼容 |
| 甘油 | ≤10%：标准步骤（部分 B）＞10%：执行超滤（部分 A） |
| Tirs | ≤20 mM：标准步骤（部分 B）＞20 mM：执行超滤（部分 A） |
| 甘氨酸 | 执行超滤（部分 A） |
| BSA 或明胶 | ≤4 倍 IgG μg 数：标准步骤（部分 B）＞4 倍 IgG μg 数：不兼容，重新取样 |
| 腹水 | 优化步骤（部分 C） |
| 血清 | 不兼容：纯化 IgG |
| 杂交瘤细胞株培养上清液 | 不兼容：纯化 IgG |



**A. 超滤步骤**

重要：在您开始之前，对照表 1（Tanda® 抗体兼容性和标记步骤选择指南）确定您的抗体在标记前是否需 要超滤。如果有必要，联系抗体厂家了解 IgG 和抗体稳定剂 的浓度。如果您的抗体不需要超滤，根据表 1 选择合适的标记步骤。超滤膜截留的分子量为 10 KD，因此，小于 10 kDa 将可以通过膜，和分子大于 10 kDa 的，包括 IgG，将保留在膜上（图 1）。注意不要用吸管触碰膜，这会撕裂或穿刺膜，导致抗体损失。***蛋白最小分子量必须≥20KD才能超滤。***

## 超滤管性能

最大样本体积：500 μL 滤液接收器体积：500 μL

最终浓缩体积：15 μL 滞留体积（膜/支持）：< 5 μL

1. 添加适量的抗体至超滤管膜中，小心不要触碰膜。

8000 g 微型离心机离心 1 min，检查有多少液体过滤至滤液收集管（下方）。重复以上操作直到所有液体全部收集到过 滤收集管。去除收集管中的液体。

2. 对于浓缩抗体，进行第 3 步。对于纯化，加入等体积 1×PBS 至超滤管膜中。8000 g 微型离心机离心直至液体过滤进入滤液接收管。

3. 添加适当体积的 PBS 至超滤管膜使得最终的抗体浓度为1-5 mg/mL，在膜表面小心上下抽吸 PBS 以重悬抗体。

4. 转移回收的抗体溶液至新离心管中。

5. 如果您使用优化标记步骤，保存超滤管来浓缩您标记后的抗体。

图1. 超滤管组成



**B.标准的 Tanda® 标记步骤**

重要：在您开始之前，对照表 1（Tanda® 抗体 兼容性和标记步骤选择指南）确定您的抗体组成和浓度是否 适用 Tanda® 标记，以及哪种标记步骤适合您选择。 如果有必要，联系抗体厂家了解您的抗体 IgG 和抗体稳定剂的浓度。

1. 抗体浓度 1-5 mg/mL 是较合适的标记浓度。如果抗体是冻干粉形式或浓度更浓，用 PBS溶解或稀释抗体。将需要标 记的抗体转移到干净的管子里。确保 IgG 的μg 数匹配试剂盒的标记范围。

2. 将组分B用1mL蒸馏水充分溶解，使成为10 × 反应缓冲液。

3. 以 1:10 混合 10 × 碳酸氢钠反应缓冲溶液与抗体，使抗体溶液最终形成 1×反应缓冲液（例如 9 μL 的抗体加 1 μL 10×反应缓冲液）。移液器上下吹吸混合。

4. 将上步的溶液全部转移至 Tanda® 染料瓶中，这里不需要检测瓶中染料的含量，涡旋几秒钟。

5. 室温避光孵育 30 min，最好每10min涡旋1次。

6.反应过程中组装纯化柱，如下图所示。将纯化填料混匀吸入柱腔中，放出保护液，直至柱床体积在1mL左右。并用目标缓冲液清洗填料至少3个柱体积。



7.将反应后的标记共轭物靠重力流经纯化柱，收集流穿液（大概40μL每滴）。根据自己加入共轭物的体积决定收集量。

8.染料-蛋白共轭物浓度的确定可通过以下公式计算：

**C(mg/mL) = {[A280 -(Amax× Cf)]/1.4} × 稀释因子**

1. C 是指染料-蛋白共轭物浓度；
2. 稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数；

c. A280 和 Amax 分别是指在 280 nm 处的吸光度以及在染料吸收波长处的吸光度；

d. Cf 是校正因子；

注：过柱洗脱的蛋白溶液直接用于吸光度检测可能浓度过大，因此需要稀释至约0.1 mg/mL。稀释倍数需要从起初抗体量以及蛋白液洗脱的总体积来进行预估。

9. 将标记蛋白储存在2-8℃避光。如果纯化蛋白偶联物的最终浓度小于1 mg/mL，则加入适量BSA或其他稳定蛋白。在2 mM叠氮化钠的存在下，共轭物应在2-8℃下稳定几个月。为了更长的存储，将共轭物分成小等分，在≤-20℃冷冻。避免反复冻融，避光保存。

**C. Tanda®优化标记步骤**

重要：在您开始之前，对照表 1（Tanda® 抗体兼容 性和标记步骤选择指南）确定您的抗体组成和浓度是否适用 Tanda® 标记，以及哪种标记步骤适合您选择。如果有必要，联系抗体厂家了解您的抗体 IgG 和抗体稳定剂的浓度。***此过程必须知道标记物分子量且在20KD以上***。

1. 蛋白（IgG 和稳定剂蛋白）浓度 1-5 mg/mL 是较合适的标记浓度，如果需要，用 PBS溶解或稀释。确保蛋白的μg 总量匹配试剂盒的标记范围，如果待标记的 IgG 少于试剂盒 的最低标记量，加入 BSA 使 BSA 和 IgG 的蛋白总量适配试剂盒。

2.将组分B用1mL蒸馏水充分溶解，使成为10 × 反应缓冲液。

3. 以 1:10 混合 10×碳酸氢钠反应缓冲溶液与抗体，使抗体溶液最终形成 1×反应缓冲液（例如 9 μL 的抗体加 1 μL 10×反应缓冲液）。移液器上下吹吸混合。

4. 将上步的溶液全部转移至 Tanda 染料瓶中，这里不需要检 测瓶中染料的含量，涡旋几秒钟。

5. 室温避光孵育 30 min，最好每10min涡旋1次，使染料和蛋白充分接触反应。

6.反应过程中组装纯化柱，如图所示。将纯化填料混匀吸入柱腔中，放出保护液，直至柱床体积在1mL左右。



7.将反应后的标记共轭物靠重力流经纯化柱，收集流穿液（大概40μL每滴）。根据自己加入共轭物的体积来决定收集量。可以适当多收集流穿液做后续超滤。

8.***如果标记物分子量在20KD以上***，则可以选择用之前的超滤管浓缩共轭物。

9.染料-蛋白共轭物浓度的确定可通过以下公式计算：

**C(mg/mL) = {[A280 -(Amax× Cf)]/1.4} × 稀释因子**

1. C 是指染料-蛋白共轭物浓度；
2. 稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数；

c. A280 和 Amax 分别是指在 280 nm 处的吸光度以及在吸收波长处的吸光度；

d. Cf 是校正因子；

10. 将标记蛋白储存在2-8℃避光。如果纯化蛋白偶联物的最终浓度小于1 mg/mL，则加入适量BSA或其他稳定蛋白。在2 mM叠氮化钠的存在下，共轭物应在2-8℃下稳定几个月。为了更长的存储，将共轭物分成小等分，在≤-20℃冷冻。避免反复冻融，避光保存。

