

## 产 品 说 明 书

### Tanda® 405 SE Labeling Kit

产品货号: TDLK23005S, TDLK23005M, TDLK23005L

产品规格: S, M, L

产品内容:

| 组分                                                                               | TDLK23005S (5-20 µg) | TDLK23005M (20-50 µg) | TDLK23005L (50-100 µg) |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| <b>A: Reactive dye vial</b><br>2-6°C or ≤-20°C, if desired<br>Protect from light | 1 vial               | 1 vial                | 1 vial                 |
| <b>B: Sodium bicarbonate</b><br>(MW = 84) 10 ×                                   | 84mg                 | 84mg                  | 84mg                   |
| <b>C: Purification columns</b><br>Store at room temperature                      | 1 column             | 1 column              | 1 column               |
| <b>D: Purification resin</b><br>2-6°C only; DO NOT FREEZE                        | ~5mL                 | ~5mL                  | ~5mL                   |
| <b>E: Ultrafiltration vial</b><br>MWCO=10K                                       | 1 each               | 1 each                | 1 each                 |

### 储存条件

各组分按标签温度保存, 有效期见外包装。

### 产品介绍

Tanda® 标记试剂盒包含您需要的利用本公司染料或生物素 (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®标记试剂盒是共价标记, 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® 标记试剂盒可以兼容 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、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。

Tanda® 标记试剂盒适合标记 IgG 等蛋白。如果标记其他非 IgG 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® 标记试剂盒可能导致IgM 抗体变性。

商品化标记二抗仍可以识别出使用 Tanda® 试剂盒标记的一抗, 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®标记试剂盒标记的抗体也可以用作传统间接免疫

荧光法检测后的三级染色。

## 准备工作

- 1.检查您的抗体与抗体兼容性指南（表1）：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缓冲液配方。Tanda® 标记试剂盒不能用于标记天然抗血清或杂交瘤细胞培养上清液，需要进行抗体纯化后再进行标记。
2. **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  $\text{NaN}_3$  的影响。对于标准的标记步骤（B），根据需要标记的IgG 的（ $\mu\text{g}$ ）量选择试剂盒的规格。
- 3.Tanda® 标记试剂盒的优化步骤（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和总量（通过测量280 nm 吸光度估计蛋白质浓度）。优化步骤也可用于标记IgG 量低于试剂盒最低范围的样品，可以通过添加稳定蛋白使总蛋白量在试剂盒的标记范围之内。
4. 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（上述情况应尽量避免使用）。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）。
5. 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，如果不需要去除杂蛋白或浓缩抗体，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                                                                                 |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| $\text{NaN}_3$ | 兼容                                                                                  |
| 甘油             | $\leq 10\%$ : 标准步骤（部分B）<br>$> 10\%$ : 执行超滤（部分A）                                     |
| Tris           | $\leq 20 \text{ mM}$ : 标准步骤（部分B）<br>$> 20 \text{ mM}$ : 执行超滤（部分A）                   |
| 甘氨酸            | 执行超滤（部分A）                                                                           |
| BSA 或明胶        | $\leq 4$ 倍 IgG $\mu\text{g}$ 数: 标准步骤（部分B）<br>$> 4$ 倍 IgG $\mu\text{g}$ 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                                                                          |
| 杂交瘤细胞培养<br>上清液 | 不兼容: 纯化IgG                                                                          |

## A. 样品处理

**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。如有需要，联系抗体厂家了解蛋白稳定剂的浓度。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（此截留量可以提前告知我们以便发货适配您蛋白大小的超滤管），因此，分子量小于10 kDa 的杂蛋白将可以通过膜，而分子大于 10 kDa 的蛋白，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中，小心不要触碰膜。

8000 g 恒温离心机离心 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。

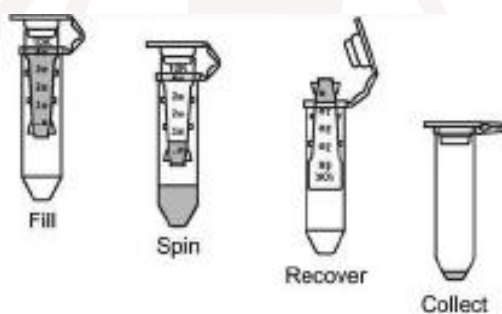
2. 对于浓缩抗体，直接进行第 3 步。对于纯化抗体，加入等体积的1×PBS 至超滤管中。8000 g 离心直至液体过滤进入滤液接收管。

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液体以重悬抗体。

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. Tanda® 标准标记步骤

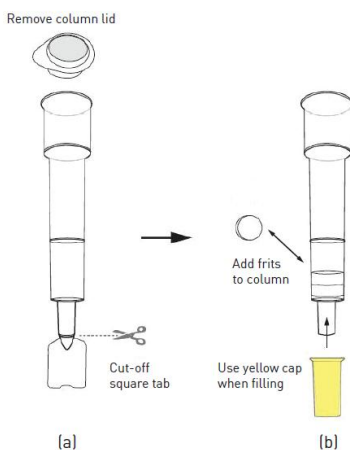
**重要：**在您开始之前，对照表 1（Tanda® 抗体兼容性和标记步骤选择指南）确定您的抗体组成和浓度是否适用Tanda® 标记，以及哪种标记步骤适合您选择。如果有必要，联系抗体厂家了解您的抗体IgG 和抗体稳定剂的浓度。**此过程必须知道标记物分子量且在20KD 以上。**

电话：027-87561633 手机：189-8623-2100

QQ客服：121545059 网址：<http://www.itiande-neuron.com>

公司地址：武汉东湖新技术开发区高新大道666号光谷生物城生物创新园B1栋b274-9室

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 $\mu\text{g}$ 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  $10 \times$  反应缓冲液。
3. 以1:10 混合 $10\times$ 反应缓冲溶液与抗体，使抗体溶液最终形成 $1\times$ 反应缓冲液（例如9  $\mu\text{L}$  的抗体加1  $\mu\text{L}$   $10\times$ 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，涡旋几秒钟溶解染料。
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 40  $\mu\text{L}$  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：

$$C(\text{mg/mL}) = \{[A_{280} - (A_{\text{max}} \times C_f)] / 1.4\} \times \text{稀释因子}$$

- a. C 是指染料-蛋白共轭物浓度；
- b. 稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数；
- c.  $A_{280}$  和  $A_{\text{max}}$  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.  $C_f$  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。

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。

### 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® 标记试剂盒以及哪种标记步骤适合您。如果有必要，联系抗体厂家了解您的抗体/ IgG 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 EP 管内。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 × 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）。用移液器上下吹吸混合。
4. 将步骤 3 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，涡旋几秒钟溶解染料。
5. 室温避光孵育 30 min，最好每 10min 涡旋混匀 1 次。
6. 反应过程中清洗超滤管。将标记完成的蛋白溶液转入处理好的超滤管内，8000g 离心约 10 分钟，丢弃滤出液，再向滤芯内加入 1XPBS，反复离心至少四次后便可得到纯的染料-抗体共轭物。
7. 向超滤后的共轭物加入符合自己需求的缓冲液进行后续实验。
8. 染料-蛋白共轭物浓度的确定可通过以下公式计算：

$$C(\text{mg/mL}) = \{[A_{280} - (A_{\text{max}} \times C_f)] / 1.4\} \times \text{稀释因子}$$

- a. C 是指染料-蛋白共轭物浓度；
- b. 稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数；
- c. A<sub>280</sub> 和 A<sub>max</sub> 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. C<sub>f</sub> 是校正因子；

9. 将标记蛋白储存在 2-8℃、避光环境中。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℃ 冷冻保存。期间避免反复冻融，避光保存。

**备注：**我们可以根据客户的实验需求提供不同的纯化方式和材料，需要客户提前告知。

相关产品:

| Tanda® Microscale Protein Labeling |         |         | 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      |