

赫利森化学发光标记试剂盒 (Chemiluminescent Labeling Kit)

HS-12000002 HS-12000002A HS-12000002B

一. 背景:

吖啶盐和相关化合物已被广泛证明为非常有用的化学发光标记物，其稳定性、标记特异性和检测灵敏度都超越放射性同位素。吖啶-NHS 酯（本试剂盒所提供）能与蛋白质的一级氨基发生反应（见图 1）。在碱性条件下，NHS 作为离去基团被取代，蛋白质与吖啶酯形成稳定的酰胺键。反应完成后，多余的吖啶盐通过脱盐柱除去。在碱性过氧化氢存在下，吖啶标记的蛋白不需要酶催化就可自行发光。因此，激发液的加入导致反应体系立即释放约 430 nm 的光子，通过使用标准光度计（luminometer）计数光子数量就可检测蛋白质的浓度。因为此发光过程是十分短暂（整个过程在 2 秒钟内完成），样品必须直接放在光度计内部光子探测器前面。蛋白质、多肽、抗体、核酸都可以用吖啶酯标记。标记化合物在碱性过氧化氢的激发下快速发光，通过收集光子可以检测到标记化合物。

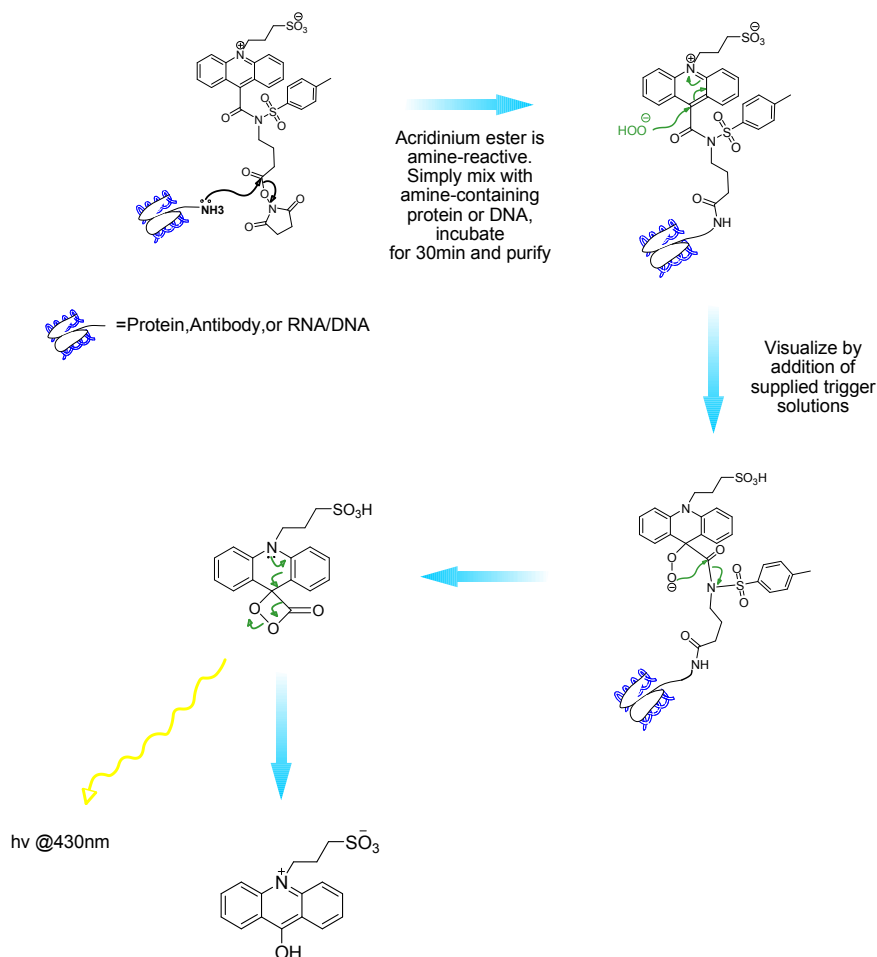


图 1. 吖啶酯标记化学及其化学发光。

二. 试剂:

Acridinium NHS ester	吖啶酯
Acridinium purification buffer (10x)	吖啶酯纯化缓冲液 (10x)
Acridinium quench solution	吖啶酯淬灭液
Acridinium labeling buffer	吖啶酯标记缓冲液
Acridinium trigger solution I	吖啶激发液 I
Acridinium trigger solution II	吖啶激发液 II

三. 未能提供的所需材料

1. 光度计 (Luminometer)
2. 分光光度计 (UV-Vis)
3. 可调的移液枪和多通道移液枪 (Pipetman & Multichannel Pipetman)
4. 蒸馏水或去离子水 (deionized water)
5. N,N-二甲基甲酰胺 (无水) (DMF)
6. 吖啶酯脱盐柱
7. 96 微孔板 (黑色) (96-well strip plate (black))

四. 试剂的制备

1. 吖啶琥珀酰亚胺酯

小瓶中含有 X 毫克 (HS-12000002, X = 1 mg; HS-12000002A, X = 5 mg; HS-12000002B, X = 50 mg) 的吖啶-NHS 酯. 用 361 μL 无水 DMF 溶解每 mg 吖啶酯. 配置浓度为 5 mM. (吖啶溶液 I).
注意: 使用的 DMF 必须严格无水, 防止吖啶酯水解. 不使用时, 干燥密封-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

2. 吖啶纯化缓冲液 (10x)

缓冲液用超纯水稀释, 稀释比为 1 : 10 (例: 50 mL 浓缓冲液稀释至总体积 500 毫升). 不使用时, 干燥密封 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

3. 吖啶淬灭液

该淬灭液可直接使用. 不使用时, 干燥密封 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

4. 吖啶标记缓冲液

该溶液可直接使用. 不使用时, 干燥密封 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

5. 吖啶触发液 I

小瓶含 0.2M NaOH. 该溶液可直接使用.

6. 吖啶触发液 II

小瓶含有 0.06% H_2O_2 . 不使用时, 干燥密封 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

五. 抗体/蛋白质标记

本说明书是针对标记抗体抗体的分子量为 180kd 对应 15 倍的吖啶酯. 如果你的样品被标记有不同的分子量, 按表 1 改变试剂的配比.

1. 取 10 μL 稀释吖啶溶液 I 加入 90 μL 无水 DMF 稀释, 配置吖啶溶液 II.
2. 稀释 50 μg 的抗体为 300 μL 吖啶标记液. 加入 10 μL (按表 1) 的吖啶稀释液 II
3. 在室温下搅拌 10 分钟.
4. 淬灭反应, 加入 100 μL 吖啶淬灭液.

5. 室温搅拌 30 分钟。
6. 取 8-10 根小试管置于试管架备用，将标记后的蛋白溶液注入吡啶脱盐柱的顶部，收集第一管洗脱液，取 1 mL 稀释过的吡啶净化缓冲液洗脱，收集第二管，重复以上操作洗脱，收集 8 管以上，确保蛋白全都洗脱下来，脱盐柱用 20 mL 净化缓冲液洗脱再生，加入 1 mL 的净化液以防填料干燥，4℃ 保存备用。
7. 检测标记的蛋白，每等分 10 μL 加入 96 孔板。注意：如果你的光度计是不兼容的 96 孔板，标记的蛋白可以在试管中测试。使用前将吡啶触发液各取 1 mL 1 : 1 混合均匀，调整光度计向每个微孔注入 50 μL 激发液，检测时间 5 秒。
8. 根据相对发光单位（发光强度）和对应的峰值绘图。
9. 标记的蛋白 4℃ 存储，可以稳定 6 个月；如果在这样的条件下仍不稳定，请等分置 -20℃ 或者 -80℃ 保存。

表 1 吡啶用量对照表

蛋白分子量	吡啶标记液
10kDa-50kDa	1-3 μL
50kDa-100kDa	3-7 μL
100kDa-150kDa	7-10 μL
150kDa-200kDa	10-13 μL
200kDa-250kDa	13-17 μL
250kDa-300kDa	17-20 μL
300kDa-350kDa	20-23 μL
350kDa-400kDa	23-27 μL

六. 注意事项

实验之前请仔细阅读说明；试剂盒仅用于实验研究，不能用于人体或诊断使用。

七. 储存和稳定性

试剂盒请按上述说明储存在 4℃ 或 -20℃，有效日期显示在盒子的外面

赫利森（厦门）生物科技有限公司
Heliosense Biotechnologies, Inc.
地址：厦门火炬高新区创业园伟业楼 S506
电话：0592-5667290 传真：0592-5667261
手机：18906031651 QQ: 1950696531
网址：www.heliosense.com
邮箱：info@heliosense.com