

一. 概述

荧光法和比色法相比，有以下特点：1) 检测灵敏度高、2) 能够在宽泛的范围内动态定量，普遍应用于生化上。特别适用于荧光标记抗体特异染色部位的显微镜观察、流式细胞仪的细胞信息分析。用于标记的荧光素大致有 FITC、Sulforhodamine 101 acid chloride、Cy dye及Alexa Fluor等化学合成品和Phycoerythrin (PE)、Allophycocyanin (APC) 等荧光蛋白。前者属于化学合成品、分子量小，价格较便宜，标记后纯化比较简单。后者(荧光蛋白)的荧光强度由于比化学合成品高几十倍，所以在抗原量少时也能够定量。

标记时如果荧光素浓度过大，会出现荧光淬灭的情况，所以需要摸索最佳的标记条件。Fluorescein Labeling Kit-NH₂，HiLyte Fluor™ 555 Labeling Kit-NH₂，HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit-NH₂，HiLyte Fluor™ 750 Labeling Kit-NH₂，ICG Labeling Kit-NH₂，Phycoerythrin Labeling Kit及Allophycocyanin Labeling Kit是适合在IgG等少量蛋白上标记荧光基团的试剂盒，标记条件已经最佳化，在本章介绍这些试剂盒的标记方法。

二. 用Fluorescein Labeling Kit-NH₂、HiLyte Fluor™ Labeling Kit-NH₂ (555, 647, 750) 在氨基上标记 (货号：LK01, LK14-16)

试剂盒内含

NH₂-Reactive Fluorescein Dye
WS Buffer
Reaction Buffer
过滤管

所需的设备和材料

微型离心机，10 μl和100-200 μl移液器，37 培养箱，微量管，DMSO

储存条件

在0-5 保存。由于NH₂-Reactive Fluorescent Dye的包装袋中充氮，如开封使用后需重新充氮密封，在-20 保存。

注意事项

1. 用该试剂盒标记的蛋白质的分子量要>50,000。
2. 在标记过程中，IgG或者Fluorescein-IgG标记物始终存在于过滤管的滤膜上。
3. 如果IgG溶液中含有分子量>10,000的其他蛋白质，如BSA或明胶时，在使用该试剂盒标记前，先要纯化IgG溶液。IgG溶液能够用IgG Purification Kits (不包含于本试剂盒中) 来纯化。
4. 如果IgG溶液含有小的不溶物，离心后取上清液来进行标记。

标记机理

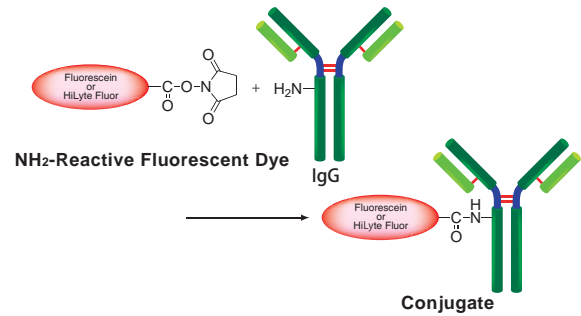


图1. IgG的荧光标记

操作步骤



1 将100 μl WS Buffer和含有100 μg IgG的样品溶液加入到过滤管中。^{a)}



2 在8,000-10,000 × g离心10 min。^{b)}



3 将10 μl DMSO加入到NH₂-Reactive Fluorescein Dye中并用移液器吹打使其溶解。^{c)}



4 将100 μl Reaction Buffer以及8 μl NH₂-Reactive Fluorescein Dye溶液加入到过滤管中，吹打使其混合。^{d)}



5 将过滤管放入培养箱中，在37 培养10 min。



6 将100 μl WS Buffer加入到过滤管中，在8,000-10,000 × g离心10 min，^{b)}除去滤液。



7 将200 μl WS Buffer加入到过滤管中，在8,000-10,000 × g 离心10 min，^{b)}重复该步骤一次。



8 将200 μl WS Buffer加入到过滤管中吹打10-15次来回收标记产物。^{e)}将该溶液转移到微量管中，在0-5 °C下保存。

- a) 样品溶液的体积不应超过100 μl。如果抗体浓度低于1 mg/ml，重复步骤1和2直至总的IgG聚积量达到100 μg。如果聚积过程中滤液的体积超过400 μl，则在后续离心操作前应除去滤液。
- b) 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- c) NH₂-Reactive Fluorescein Dye在管子的底部，向管底加入10 μl DMSO，吹打数次使其溶解，如果没有DMSO的话，可以用乙醇来替代。
- d) 如果IgG的量为200 μg，在步骤4时加入所有的NH₂-Reactive Fluorescein Dye溶液。
- e) 并不一定要使用WS Buffer来回收标记产物，可以选择任何适合于该实验的缓冲液来替代。

. 计算标记率

1分子蛋白质上结合的荧光素的数量(标记率)的计算方法：将标记的蛋白质溶液用5倍的中性缓冲液稀释，分别测定在280 nm和各个荧光染料的最大吸收波长处的吸光度，采用以下公式计算。

* 如果是IgG，ε=216,000。

* 荧光染料在WS缓冲液中的ε参见表1，各种荧光染料的激发、发射光谱图请见图2

$$\text{Fluorescein/蛋白质的标记率} = \frac{A_{500}/60,000}{(A_{280} - A_{500} \times 0.22)/\epsilon}$$

A₅₀₀：在500 nm的吸光度

A₂₈₀：在280 nm的吸光度

ε：蛋白质在280 nm的摩尔吸光系数

$$\text{HiLyte Fluor™ 555/蛋白质的标记率} = \frac{A_{555}/150,000}{(A_{280} - A_{555} \times 0.1)/\epsilon}$$

A₅₅₅：在555 nm的吸光度

A₂₈₀：在280 nm的吸光度

ε：蛋白质在280 nm的摩尔吸光系数

$$\text{HiLyte Fluor™ 647/蛋白质的标记率} = \frac{A_{655}/250,000}{(A_{280} - A_{655} \times 0.05)/\epsilon}$$

A₆₅₅：在655 nm的吸光度

A₂₈₀：在280 nm的吸光度

ε：蛋白质在280 nm的摩尔吸光系数

$$\text{HiLyte Fluor™ 750/蛋白质的标记率} = \frac{A_{760}/270,000}{(A_{280} - A_{760} \times 0.05)/\epsilon}$$

A₇₆₀：在760 nm的吸光度

A₂₈₀：在280 nm的吸光度

ε：蛋白质在280 nm的摩尔吸光系数

	最大吸收 (nm)	摩尔吸光系数(ε)
Fluorescein	500	60,000
HiLyte Fluor™ 555	555	150,000
HiLyte Fluor™ 647	655	250,000
HiLyte Fluor™ 750	760	270,000

表1. 荧光染料的特点

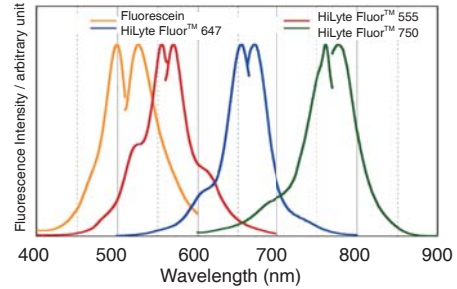


图2. 各种荧光染料的激发、发射光谱图

三. 用ICG Labeling Kit -NH₂在氨基标记 (货号：LK31)

. 试剂盒内含

- NH₂-Reactive ICG
- WS Buffer
- Reaction Buffer
- 过滤管

. 所需的设备和材料

10 μl 和 200 μl可调式移液器，37 °C 培养箱，微量管 (保存标记体用)，离心机 (微量管用)，DMSO

. 储存条件

NH₂-Reactive ICG在铝箔袋中保存，开封铝箔袋后，未使用NH₂-Reactive ICG仍放在铝箔袋中，密封后，在-20 °C 保存。除了NH₂-Reactive ICG以外，放在0-5 °C 保存。

. 注意事项

如果样品中含有分子量>10,000的物质(多肽、其它蛋白等)，有阻碍标记反应的可能性。在标记前需要先纯化，如果样品是抗体，可用 IgG Purification Kit (AP01, AP02) 纯化，如果样品中有小的不溶物质，离心后取上清液来标记。

. 标记机理

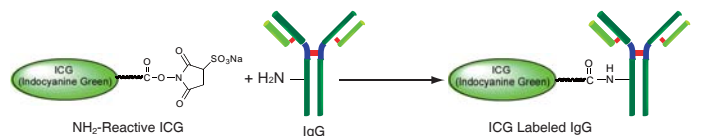


图3. IgG的ICG标记

P-35 如何用荧光素标记抗体

操作步骤



1 将100 μ l WS Buffer以及含有50-200 μ g蛋白溶液加入到过滤管中，轻轻混合。^{a)}



2 用移液器吹打几次混匀，在8,000 \times g离心10 min。^{b)}



3 将10 μ l DMSO加入到NH₂-Reactive ICG中并用移液器吹打直至完全溶解。^{c)}



4 将100 μ l Reaction Buffer以及8 μ l NH₂-Reactive ICG溶液加入到过滤管中，用移液器混匀。^{d)}



5 将过滤管放入培养箱中，在37 $^{\circ}$ C培养10 min。



6 将100 μ l WS Buffer加入到过滤管中，在8,000 \times g离心15 min^{b)}，丢弃滤液。



7 将200 μ l WS Buffer加入到过滤管中，在8,000 \times g离心15 min^{b)}，重复此步骤一次。



8 将200 μ l PBS加入到过滤管中吹打10次来回收标记产物^{e)}。将该溶液转移到微量管中，在0-5 $^{\circ}$ C下保存。

- 蛋白溶液量要 100 μ l，如果抗体浓度<0.5 mg/ml，重复步骤1和2直至总蛋白量达到50-200 μ g。
- 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，继续离心5 min或提高转速。
- NH₂-Reactive ICG在管子的底部，加10 μ l DMSO到管子的底部，用移液器反复吹打溶解。由于NH₂-Reactive ICG会被

DMSO中的水分水解，在制备好NH₂-Reactive ICG溶液后马上进行第4步操作。

- 如果蛋白总量达到200 μ g，请加入全部NH₂-Reactive ICG溶液。
- 我们推荐用WS Buffer保存标记产物，但也可以根据下一步实验要求选择合适的缓冲液。

计算标记率

$$\text{ICG/蛋白质的标记率} = \frac{A_{800}/147,000}{(A_{280} - A_{800} \times 0.075)/\epsilon}$$

A₈₀₀ : 在800 nm的吸光度

A₂₈₀ : 在280 nm的吸光度

ϵ : 蛋白质在280 nm的摩尔吸光系数

* 如果是IgG, $\epsilon = 216,000$ 。

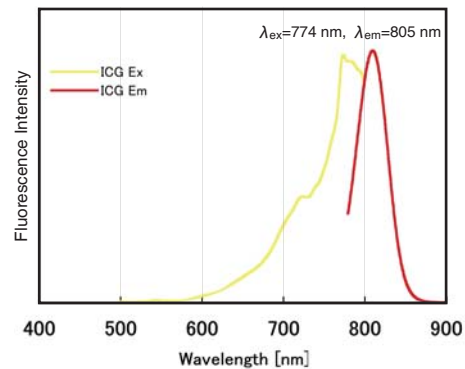


图4. ICG的激发和发射光谱图

ICG标记实验例



图5. 小鼠尾静脉注射ICG抗体的荧光成像图

小鼠皮下肿瘤模型在注射了ICG抗体 (50 μ g) 48 h后，有明显的迹象表明抗体在肿瘤中有选择性地聚集。

仪器：活体成像仪 (Clairvivo OPT, 岛津制作所)

小鼠：BALB/c (n_u/n_u) 纯合子裸小鼠 (母, 11周)

肿瘤细胞：HeLa细胞 (在右腋皮下移植后4周)

检测条件：E_x=785 nm, E_m=845/55 nm

抗体：整合素 α 2抗体 曝光时间：10 s

四. 用R-Phycocerythrin Labeling Kit-NH₂、Allophycocyanin Labeling Kit-NH₂在氨基上标记 (货号：LK23, LK21)

试剂盒内含

NH₂-Reactive Phycobiliprotein

WS Buffer

Reaction Buffer

过滤管

所需的设备和材料

微型离心机, 10 μ l、200 μ l移液器, 37 $^{\circ}$ C 培养箱, 微量管 (保存标记体用)

储存条件

在0-5 $^{\circ}$ C 保存。NH₂-Reactive Phycobiliprotein开封后, 在-20 $^{\circ}$ C 保存

注意事项

1. 用该试剂盒标记的蛋白质的分子量应当>50,000。
2. 在标记过程中, IgG或者Phycobiliprotein-IgG标记物始终在过滤管的滤膜上。
3. 如果IgG溶液中含有分子量>10,000的其他蛋白质, 如BSA或明胶时, 在使用该试剂盒标记前, 先要纯化IgG溶液。IgG溶液能够用IgG Purification Kits (不包含于本试剂盒中) 来纯化。
4. 如果IgG溶液含有小的不溶物, 离心后取上清液来进行标记。

标记机理

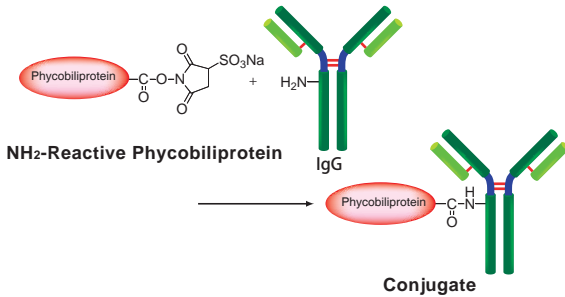


图6. NH₂-Reactive Phycobiliprotein的IgG标记

标记IgG操作步骤



1 将100 μ l WS Buffer以及含有100 μ g IgG的样品溶液加入到过滤管中。^{a)}



2 在8,000-10,000 \times g离心10 min后, 加入100 μ l WS Buffer再离心一次。^{b)}



3 完成离心后, 将10 μ l Reaction Buffer加入到NH₂-Reactive Phycobiliprotein中并用移液枪吹打使其溶解。



4 将含有NH₂-Reactive Phycobiliprotein的溶液转移到IgG所集中的过滤管的滤膜上。



5 用移液器吸取溶液吹洗净整个滤膜表面, 然后将过滤管放入培养箱中, 在37 $^{\circ}$ C 培养2 h。



6 将190 μ l WS Buffer加入到过滤管中并用移液器吹打10-15次来回回收标记产物。^{c)}将溶液转移至微量管中, 并储存于0-5 $^{\circ}$ C 下。^{d)}

- a) 样品溶液的体积不应超过100 μ l。如果抗体浓度低于0.5 mg/ml, 重复步骤1和2直至总的IgG聚积量达到100 μ g。
- b) 如果溶液在离心后仍然残留在膜上, 可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- c) 标记后产物的浓度为1.4-1.8 mg/ml。在进行后续的酶免疫、免疫印迹、免疫转染实验前先要将标记后的IgG稀释至适当的浓度。每个IgG分子上会被标记上1-2个Phycobiliprotein分子。没有被结合的Phycobiliprotein可能会干扰正常的免疫实验。如果需要纯化的话, 可以使用凝胶渗透柱或亲和柱。
- d) 通常R-PE标记后的IgG在Storage Buffer中, 0-5 $^{\circ}$ C 下至少能够保存2个月, 如果需要保存更久, 可以添加等量的丙三醇 (终浓度: 50%), 并在-20 $^{\circ}$ C 下存放。但是还要注意样品自身是否稳定。

五. 用R-Phycoerythrin Labeling Kit-SH、Allophycocyanin Labeling Kit-SH在SH基上标记 (货号: LK26, LK24)

试剂盒内含

- SH-Reactive Phycobiliprotein
- Reducing Agent
- RA Solution
- WS Buffer
- Reaction Buffer
- 过滤管

所需的设备和材料

微型离心机, 10 μ l和100-200 μ l移液器, 37 $^{\circ}$ C 培养箱, 微量管 (保存标记体用)

储存条件

在0-5 $^{\circ}$ C 储存。SH-Reactive Phycobiliprotein开封后, 在-20 $^{\circ}$ C 储存。

注意事项

1. 用该试剂盒标记的蛋白质的分子量应当 $>50,000$ 。
2. 在标记过程中，IgG或者Phycobiliprotein-IgG标记物始终在过滤管的滤膜上。
3. 如果IgG溶液中含有分子量 $>10,000$ 的其他蛋白质，如BSA或明胶时，在使用该试剂盒标记前，先要纯化IgG溶液。IgG溶液能够用IgG Purification Kits (不包含于本试剂盒中) 来纯化。
4. 如果IgG溶液含有小的不溶物，离心后取上清液来进行标记。

标记机理

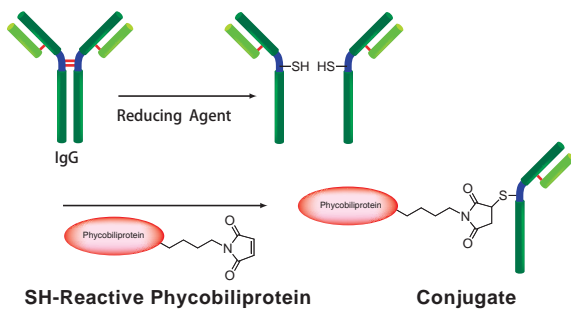


图7. SH-Reactive Phycobiliprotein的IgG标记

标记IgG操作步骤



1 将100 μ l WS Buffer以及含有100 μ g IgG的样品溶液加入到过滤管中。^{a)}



2 用移液器使溶液混合，然后在8,000-10,000 \times g离心10 min。^{b)}



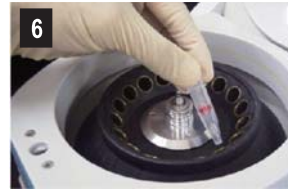
3 将150 μ l WS Buffer加入到Reducing Agent中并用移液器吹打数次使其溶解。



4 从步骤3所得的溶液中，取100 μ l转移到IgG所集中的过滤管的滤膜上。



5 用移液器吹打数次后，在37培养30 min。



6 将100 μ l RA Solution加入到管中，在8,000-10,000 \times g离心10 min。弃滤液，加入200 μ l RA Solution，再离心一次。^{b)}



7 将50 μ l Reaction Buffer加入到SH-Reactive Phycobiliprotein并吹打其溶解。



8 将所得的SH-Reactive Phycobiliprotein溶液转移到被还原的IgG所集中的过滤管的膜上。



9 用移液器吹打数次后，在37培养1 h。



10 加入150 μ l WS Buffer并吹打10-15次来回收标记产物。^{c)} 将该溶液转移至微量管中，在0-5 $^{\circ}$ C下保存。^{d)}

- a) 样品溶液的体积不应超过100 μ l。如果抗体浓度低于0.5 mg/ml，重复步骤1和2直至总的IgG聚积量达到100 μ g。
- b) 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- c) 标记后产物的浓度为1.4-1.8 mg/ml。在进行后续的酶免疫、免疫印迹、免疫转染实验前先将标记后的IgG稀释至适当的浓度。每个IgG分子上会被标记上1-2个Phycobiliprotein分子。没有被结合的Phycobiliprotein可能会干扰正常的免疫实验。如果需要纯化的话，可以使用凝胶渗透柱或亲和柱。
- d) 通常Phycobiliprotein标记后的IgG在Storage Buffer中，0-5 $^{\circ}$ C下至少能够保存2个月，如果需要保存更久，可以添加等量的丙三醇(终浓度：50%)，并在-20 $^{\circ}$ C下存放。但是还要注意样品自身是否稳定。