YUANZAN
远 赞 生 命

荧光染料快速标记试剂盒说明书（通用版）

本说明书适用于远赞生命目录号 Brilva Fluor™ 系列 FP268001～FP268016，Cyanine 系列 FP268017～FP268022

产品概述

- 本试剂盒利用染料的 NHS 酯（N-羟基琥珀酰亚胺酯） 与抗体或者重组蛋白、酶等表面赖氨酸残基的伯胺（-NH_2）在弱碱性条件下发生共价偶联，实现高效荧光标记。偶联反应在室温下 30 分钟即可完成，随后通过超滤去除游离染料，可快速获得高纯度、可直接使用的荧光标记产物。
- 本试剂盒适用于实验室自主制备荧光标记一抗，荧光标记二抗以及荧光标记抗原、多肽等。

试剂盒组成与储存

- 以 5 次反应（每次标记约 100 μg 蛋白） 规格为例：

组分	名称	规格与数量	储存条件
A	染料-NHS(10mM)	5 次/支，共 1 支	-80°C，避光
B	缓冲液 I	10mL/支，共 1 支	室温
C	缓冲液II	15mL/瓶，共 1 瓶	室温
D	*0.5mL 超滤管，30KD MWCO	5 套/包	室温
E	不透明棕色反应管	1.5mL 离心管，5 支	室温
F	不透明棕色保存管	0.5mL，5 支	室温
G	说明书	1 份	——

备注：收到货后染料-NHS(10mM)需立即置于-80°C 低温冰箱；避免反复冻融；用前恢复至室温；解封后尽快使用；试剂使用过程中应全程避光；有效期以包装标签及 COA 标注为准。

*0.5mL 超滤管，默认发货 30KD MWCO。

适用范围与限制

- **适用**：IgG、F（ab’）$_2$，VHH-Fc，VHH 及其他形式抗体、链霉亲和素、酶（HRP/AP）、重组蛋白、肽类（含

≥ 2 个赖氨酸)。

- **缓冲限制**：蛋白样本须溶于不含游离胺的缓冲液（如 PBS，pH 7.4），避免含 Tris、甘氨酸、精氨酸，谷胱甘肽，DTT，Proclin、叠氮化钠、BSA/血清白蛋白的样品，会竞争性消耗或淬灭染料。
- **浓度限制：**蛋白浓度过低（< 0.5 mg/mL）标记效率低；过高（> 4 mg/mL）易聚集。
- **最小分子量**：靶蛋白建议 ≥ 10 kDa，以保证纯化回收率。

操作流程

1) 样本准备：
   - 取抗体或者蛋白 100-120μg，加入标记缓冲液 I（总体积不超过 500 μL），转移至超滤离心管，10000rpm，离心 10min，进行标记缓冲液置换 2 次。
2) 偶联反应：将用标记缓冲液 I 处理后的样品（约 50-100μL）转移至不透明棕色反应管，按照染料 ：蛋白 ≈5：1（摩尔比） 加入染料溶液，快速混匀，室温（20–25 °C）避光孵育 30 分钟（推荐置于水平摇床 250rpm 进行偶联反应)。剩余染料试剂迅速放置-80°C 低温冰箱。
3) 超滤纯化：将偶联后产物转移至超滤管（*若第一步已使用，请先用缓冲液Ⅱ洗涤 2 次后备用*），加入适量缓冲液Ⅱ，10000rpm，离心 10min，弃接收管液体，之后再加入适量缓冲液Ⅱ， 再次离心，重复 3 次，洗脱未结合染料。转移纯化后偶联产物至不透明棕色冻存管。
4) 浓度测量：纯化后产物使用分光光度计测 A280 与浓度以及染料 λmax（可选，但需使用*缓冲液Ⅱ Blank*)。
5) 样品储存：标记后的样品转移至无菌无酶不透明冻存管，存放至 2-8°C 冷藏冰箱，建议有效期 12 个月。*注意不要冻存，若需长期冻存储存，请添加 50%甘油。*

注意事项

- 避光：荧光染料及标记过程全程避光（铝箔包裹），防止光漂白。
- 缓冲兼容性：含 Tris/甘氨酸/叠氮的样品会严重抑制反应，务必预先置换缓冲液。
- 水分敏感：NHS 酯遇水易水解失活，解封后尽快使用。
- 蛋白活性：强标记（高 DOL）可能影响抗体结合或酶活，建议通过滴定确定最佳染料投料。
- 回收率：超滤管回收率 80%以上，超滤后损失理论蛋白 10%-20%，建议按照所需量 120%准备。
- 废弃处理：含染料废液按化学危废处理，勿随意倾倒。

标记程度 DOL（Degree of Labeling）计算(可选)

以 Brilva Fluor™ -V_HH-hFc 反应后纯化产物为例，使用 NanoDrop ND-1000 分光光度计 Protein and Label 模块，用保存缓冲液进行 Blank，测得 A280= 1.41，A650=10.25 ,根据公式计算可知标记度 DOL 为 4.28

项目	公式	数据来源	Brilva Fluor™-V_HH-hFc 为例
荧光染料吸光度	λmax（A650）	测量值	10.25
荧光染料对 280 nm 的干扰校正因子	*CF_280nm*	*常数，参考荧光素参数表*	*0.03*
荧光染料消光系数	*ε_fluor*	*常数，参考荧光素参数表*	*270000*
荧光染料摩尔浓度 C_dye (M)	C_dye (M)=λmax/ε_fluor	计算浓度	3.80E-05
蛋白吸光度	A280	测量值	1.41
蛋白摩尔消光系数	*ε_prot.*	*常数，参考 snapgene*	*124680*
1 mg/mL IgG 溶液在 280 nm 下的吸光度	$A_{1mg/ml\ 280nm}$	*常数，参考 snapgene*	*1.59*
标记蛋白校正吸光度 A280_corr	A280_corr=A280-λmax*CF_280nm	计算值	1.1065
标记蛋白质量浓度 C_prot(mg/mL)	C_prot(mg/mL)=A280_corr/ $A_{1mg/ml\ 280nm}$	计算值	0.696
标记蛋白分子量(Da)	*MW*	*常数，参考 snapgene*	*78530*
标记蛋白摩尔浓度 C_prot(M)	C_prot(M)= C_prot(mg/mL)/MW	计算浓度	8.86E-06
标记程度 DOL	DOL=C_dye(M) / C_prot(M)	计算值	4.28

YUANZAN
远 赞 生 命

附表 1

荧光染料技术参数

荧光试剂名称	分子量	Ex / Em (nm)	Ext. Coeff.1	CF at 280 nm	亮度	推荐通道
YUANZAN Brilva Fluor™ 350	~410.4	346/445	19,000 cm-1M-1	0.19	低	355 nm / DAPI 组（UV）
YUANZAN Brilva Fluor™ 405	~1028.3	400/424	35,000 cm-1M-1	0.7	低	405 nm / BV421 通道
YUANZAN Brilva Fluor™ 430	~701.8	430/545	15,000 cm-1M-1	0.28	低	405 nm / 大 Stokes 位移
YUANZAN Brilva Fluor™ 488	~643.4	494/517	73,000 cm-1M-1	0.11	高	488 nm / FITC；共聚焦 FITC 组
YUANZAN Brilva Fluor™ 514	~714	517/542	80,000 cm-1M-1	0.116	高	514 nm；YFP 组
YUANZAN Brilva Fluor™ 532	~723.8	530/555	81,000 cm-1M- 1	0.09	中	532 nm；PE 通道备选
YUANZAN Brilva Fluor™ 546	~1159.6	554/570	112,000 cm-1M-1	0.12	高	561 nm / PE；TRITC 组
YUANZAN Brilva Fluor™ 555	~1250	555/572	155,000 cm-1M-1	0.08	中	561 nm / PE；TRITC 组
YUANZAN Brilva Fluor™ 568	~791.8	578/602	88,000 cm-1M-1	0.46	高	561 nm / PE-Texas Red；Texas Red 组
YUANZAN Brilva Fluor™ 594	~819.8	590/617	92,000 cm-1M-1	0.56	高	561 nm / PE-Texas Red；Texas Red 组
YUANZAN Brilva Fluor™ 647	~1250	651/672	270,000 cm-1M-1	0.03	高	640 nm / APC；Cy5 组
YUANZAN Brilva Fluor™ 660	~1100	668/698	132,000 cm-1M-1	0.1	中	640 nm / APC-R700
YUANZAN Brilva Fluor™ 680	~1200	684/707	183,000 cm-1M-1	0.05	高	640 nm / 710；Odyssey 700
YUANZAN Brilva Fluor™ 700	~1400	702/723	205,000 cm-1M-1	0.07	中	640 nm / APC-R700
YUANZAN Brilva Fluor™ 750	~1300	753/782	290,000 cm-1M-1	0.039	中	640 nm / APC-Cy7；活体成像
YUANZAN Brilva Fluor™ 790	~1750	785/810	260,000 cm-1M-1	0.09	中	Odyssey 800；活体成像
YUANZAN Cyanine3	~829	554/566	162000 cm-1M-1	0.06	中	561 nm / PE；TRITC 组
YUANZAN Cyanine3.5	~1100.33	591/604	139000 cm-1M-1	0.17	中	561 nm / PE-Texas Red
YUANZAN Cyanine5	~855	640/664	271000 $cm^{-1}M^{-1}$	0.04	中	640 nm / APC
YUANZAN Cyanine5.5	~1318	680/698	210000 $cm^{-1}M^{-1}$	0.11	中	640 nm / 710；Odyssey 700
YUANZAN Cyanine7	~881	740/770	250000 cm-1M-1	0.03	中	640 nm / 780；活体成像
YUANZAN Cyanine7.5	~1256.2	784/814	222000 cm-1M-1	0.109	低	785 nm；Odyssey 800

附表 2

荧光染料快速标记试剂盒订购信息

产品名称	规格	货号
YUANZAN Brilva Fluor™ 350 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268001
YUANZAN Brilva Fluor™ 405 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268002
YUANZAN Brilva Fluor™ 430 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268003
YUANZAN Brilva Fluor™ 488 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268004
YUANZAN Brilva Fluor™ 514 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268005
YUANZAN Brilva Fluor™ 532 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268006
YUANZAN Brilva Fluor™ 546 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268007
YUANZAN Brilva Fluor™ 555 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268008
YUANZAN Brilva Fluor™ 568 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268009
YUANZAN Brilva Fluor™ 594 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268010
YUANZAN Brilva Fluor™ 647 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268011
YUANZAN Brilva Fluor™ 660 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268012
YUANZAN Brilva Fluor™ 680 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268013
YUANZAN Brilva Fluor™ 700 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268014
YUANZAN Brilva Fluor™ 750 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268015
YUANZAN Brilva Fluor™ 790 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268016
YUANZAN Cyanine3 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268017
YUANZAN Cyanine3.5 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268018
YUANZAN Cyanine5 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268019
YUANZAN Cyanine5.5 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268020
YUANZAN Cyanine7 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268021
YUANZAN Cyanine7.5 快速标记试剂盒	5 次/盒, 100μg/次	FP268022

免责声明

本说明书所提供信息仅供参考，使用者应结合自身蛋白特性进行条件优化。因样本差异、缓冲不当或违规操作导致的标记失败或活性损失，供应商不承担责任。本产品仅供科研使用（For Research Use Only），不可用于诊断、治疗或人体试验。