

## 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。

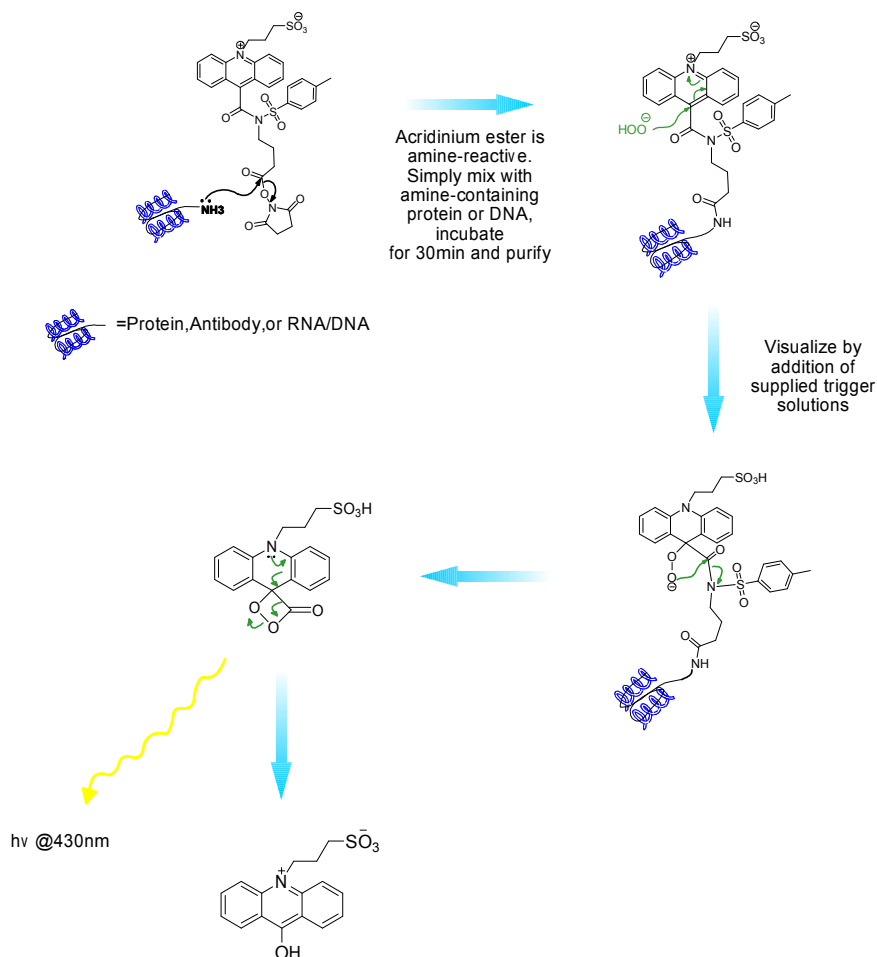


图 1. 吖啶酯标记化学及其化学发光。

## 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  $\mu\text{L}$  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)

小瓶含有 50 mL 1M 的磷酸盐缓冲液, pH 值 6.3, 含有 1% 的牛血清白蛋白, 1.5 M 氯化钠, 0.1% 叠氮化钠. 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

小瓶含有 2 mL 的 0.1M 的磷酸盐缓冲液, pH 值 8, 含 0.15M 氯化钠和 1% 赖氨酸. 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

小瓶含有 5 mL 0.1M 磷酸盐缓冲液, pH 值 8, 含有 0.15 M NaCl. 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%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 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  $\mu\text{L}$  稀释吖啶溶液 I 加入 90  $\mu\text{L}$  无水 DMF 稀释, 配置吖啶溶液 II.

2. 稀释 50  $\mu\text{g}$  的抗体为 300  $\mu\text{L}$  吖啶标记液. 加入 10  $\mu\text{L}$  (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  $\mu\text{L}$  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吖啶脱盐柱的顶部, 收集第一管洗脱液, 取 1 mL 稀释过的吖啶净化缓冲液洗脱, 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 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。
7. 检测标记的蛋白, 每等分 10  $\mu\text{L}$  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. 使用前将吖啶触发液各取 1 mL 1 : 1 混合均匀, 调整光度计向每个微孔注入 50  $\mu\text{L}$  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 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  或者 -80 $^{\circ}\text{C}$  保存。

**表 1** 吖啶用量对照表

蛋白分子量	吖啶标记液
10kDa-50kDa	1-3 $\mu\text{L}$
50kDa-100kDa	3-7 $\mu\text{L}$
100kDa-150kDa	7-10 $\mu\text{L}$
150kDa-200kDa	10-13 $\mu\text{L}$
200kDa-250kDa	13-17 $\mu\text{L}$
250kDa-300kDa	17-20 $\mu\text{L}$
300kDa-350kDa	20-23 $\mu\text{L}$
350kDa-400kDa	23-27 $\mu\text{L}$

## 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

试剂盒请储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ , 有效日期显示在盒子外面

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](http://www.heliosense.com)  
邮箱: [info@heliosense.com](mailto:info@heliosense.com)