产 品 说 明 书

Super-n-stain Antibody Labeling Kits（抗体标记试剂盒）

产品货号：SB-S6011S/S6011M/S6011L

产品规格：S, M, L

产品内容：

组分	SB-S6011S (5-20 μg)	SB-S6011M (20-50 μg)	SB-S6011L (50-100 μg)
A: Dye vial	1 vial	1 vial	1 vial
B: Super-n-stain reaction buffer, 10 ×	1 vial of 15 μL	1 vial of 15 μL	1 vial of 30 μL
C: Super-n-stain antibody storage	1 vial of 60 μL	1 vial of 150 μL	1 vial of 300 μL
D: Ultrafiltration vial (MWCO=10K)	1 each	1 each	1 each

染料信息

Super-n-stain Antibody Labeling Kit			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	SB-S601101S	SB-S601101M	SB-S601101L
FITC	494	518	SB-S601102S	SB-S601102M	SB-S601102L
350 SE	347	448	SB-S601103S	SB-S601103M	SB-S601103L
405S SE	404	431	SB-S601104S	SB-S601104M	SB-S601104L
LS405 SE	408	452	SB-S601105S	SB-S601105M	SB-S601105L
488(6)-2 SE	490	515	SB-S601106S	SB-S601106M	SB-S601106L
532 SE	527	558	SB-S601107S	SB-S601107M	SB-S601107L
555 SE	555	565	SB-S601121S	SB-S601121M	SB-S601121L
568 SE	562	583	SB-S601108S	SB-S601108M	SB-S601108L
594 SE	590	617	SB-S601109S	SB-S601109M	SB-S601109L
640 SE	642	662	SB-S601112S	SB-S601112M	SB-S601112L
647A SE	650	665	SB-S601113S	SB-S601113M	SB-S601113L
660 SE	663	682	SB-S601114S	SB-S601114M	SB-S601114L
750 SE	750	777	SB-S601120S	SB-S601120M	SB-S601120L

储存条件

-20℃保存，有效期见外包装。

产品应用

Super-n-stain 抗体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内提供的反应缓冲溶液中，进行短时间的孵育即可。Super-n-stain 染

-

料在标记结束时不再反应，因此无需进一步纯化步骤。标记后，约 4-6 分子染料与 1 分子抗体共价结合。Super-n-stain 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。

Super-n-stain 标记可以兼容 NaN_3、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。

标准 Super-n-stain 标记步骤可以用于多于 IgG (μg) 4 倍的 BSA 或明胶样品。根据您希望标记的 IgG 量来选择试剂盒大小。优化标记步骤适用于稳定蛋白质过剩或腹水的 IgG 样品。在这种情况下，根据需要标记抗体样本的蛋白质总量（IgG + 稳定剂，或腹水中总蛋白量）来选择试剂盒大小。优化步骤也可用于标记 IgG 量低于最低范围的样品，通过添加稳定剂蛋白使总蛋白量达到试剂盒的标记范围。优化步骤不建议用于标记天然抗血清或杂交瘤细胞株培养上清，因为这些样本的抗体含量相对于总蛋白非常低。

当用荧光标记抗体直接进行免疫荧光时，您可能需要使用更高浓度的抗体来实现类似间接免疫荧光法检测（一抗加标记二抗）染色的强度。在我们的内部测试中发现，间接免疫荧光染色结果是直接免疫荧光染色信号的三倍左右。

标记二抗仍可以连接到使用 Super-n-stain 试剂盒标记的一抗上，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 Super-n-stain 试剂盒标记的一抗。Super-n-stain 标记抗体可以用作传统间接免疫荧光法检测后的三级染色。

圣尔生物 还提供生物素 Super-n-stain 标记试剂盒、二次检测使用的 染料标记的链霉亲和素或 染料标记的单克隆生物素抗体。

我们还提供酶标记和荧光蛋白标记的 Super-n-stain 试剂盒，以及小配体标记试剂盒（请访问 http://www.share-bio.com/）。更多信息，请参见常见问题。

准备工作

Super-n-stain 抗体标记试剂盒适合标记 IgG。我们不建议标记其他蛋白质，因为标记的 DOL（degree of labeling）可能达不到较好值。Super-n-stain 标记条件可能导致 IgM 抗体变性。

检查你的抗体与抗体兼容性指南。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配方。Super-n-stain 标记不能用于标记天然抗血清或杂交瘤细胞株培养上清液。使用蛋白质纯化步骤或商业化抗体纯化试剂盒，如 Pierce Antibody Clean-Up Kit 纯化 IgG。

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的 BSA、明胶、Tris 和甘油，标记液不受 NaN_3 的影响。对于标准的标记步骤（B），根据需要标记的 IgG 的 ug 数量选择试剂盒的规格。

Super-n-stain 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（通过测量 280 nm 吸光度估计蛋白质浓度）。试剂盒规格的选择根据您标记抗体样本的总蛋白量来确定。优化步骤也可用于标记 IgG 量低于试剂盒最低范围的样品，通过添加稳定剂蛋白使总蛋白量在试剂盒的标记范围之内。

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。

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）。

标记效率较高的抗体浓度为 0.5-1 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，圣尔生物 提供蛋白质定量试剂盒（SB-WB013），一种高度敏感性的蛋白质荧光定量测定试剂盒。如果不需要去除或浓缩抗体，则按照标准步骤（B）或优化步骤（C）进行实验。

表 1. Super-n-stain 抗体兼容性和标记步骤选择指南

组分	兼容性
NaN_3	兼容

甘油	≤10%：标准步骤（部分 B） ＞10%：执行超滤（部分 A）
Tirs	≤20 mM：标准步骤（部分 B） ＞20 mM：执行超滤（部分 A）
甘氨酸	执行超滤（部分 A）
BSA 或明胶	≤4 倍 IgG μg 数：标准步骤（部分 B） ＞4 倍 IgG μg 数：优化步骤（部分 C）
腹水	优化步骤（部分 C）
血清	不兼容：纯化 IgG
杂交瘤细胞株培养上清液	不兼容：纯化 IgG

A. 超滤步骤

重要：在您开始之前，对照表 1（Super-n-stain 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。如果有必要，联系抗体厂家了解 IgG 和抗体稳定剂的浓度。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 万，因此，小于 10 kDa 将可以通过膜，和分子大于 10 kDa 的，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。

超滤管性能

最大样本体积：500 μL 最终浓缩体积：15 μL

滤液接收器体积：500 μL

滞留体积（膜/支持）：＜5 μL

1. 添加适量的抗体至超滤管膜中，小心不要触碰膜。14000 g 微型离心机离心 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，进行第 3 步。对于纯化，加入等体积 1×PBS 至超滤管膜中。14000 g 微型离心机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 0.5-1 mg/mL，在膜表面小心上下抽吸 PBS 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。

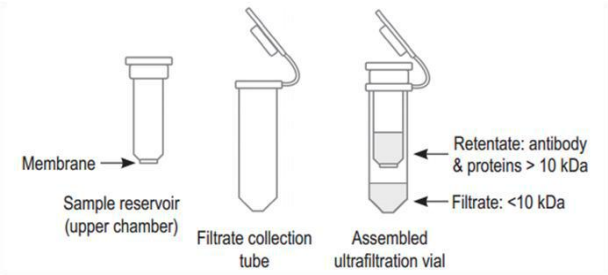

图 **1. 超滤管组成**

B. 标准的 Super-n-stain 标记步骤

重要：在您开始之前，对照表 1（Super-n-stain 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 Super-n-stain 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。

1. 抗体浓度 0.5-1 mg/mL 是较合适的标记浓度。如果抗体是冻干形式或浓度更浓，用 PBS 溶解或稀释抗体。将需要标记的抗体转移到干净的管子里。确保 IgG 的 μg 数匹配试剂盒的标记范围。

2. Super-n-stain 反应缓冲液和 Super-n-stain 存储缓冲液恢复室温。短暂离心试剂瓶将液体集中到底部。

3. 以 1:10 混合 10 × Super-n-stain 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）。移液器上下吹吸混合。

4. 将上步的溶液全部转移至 染料瓶中，这里不需要检测瓶中染料的含量，涡旋几秒钟。

5. 室温避光孵育 30 min。

6. 用存储缓冲液稀释标记的抗体，将全部标记抗体溶液转移到存储缓冲液中，抗体现在就可以直接用于染色， 标记抗体的浓度大约是起始抗体标记数量除以总体积。注意：抗体存储缓冲液包含 2 mM NaN_3。

7. 标记抗体 4℃避光至少可以稳定存储 6 个月，此外，可以将抗体分装成多份小包装在-20℃长期储存。注意：如果您不喜欢使用抗体稀释缓冲液，可以将溶液分装成多份小包装-20℃储存，避免有反复冻融，标记抗体至少可以稳定储存 6 个月。

C. Super-n-stain 优化标记步骤

重要：在您开始之前，对照表 1（Super-n-stain 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 Super-n-stain 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。

1. 蛋白（IgG 和稳定剂蛋白）浓度 0.5-1 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 μg 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. Super-n-stain 反应缓冲液和 Super-n-stain 存储缓冲液恢复室温。短暂离心试剂瓶将液体集中到底部。

3. 以 1:10 混合 10×Super-n-stain 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）。移液器上下吹吸混合。

4. 将上步的溶液全部转移至 染料瓶中，这里不需要检测瓶中染料的含量，涡旋几秒钟。

5. 室温避光孵育 30 min。

6. 可选择步骤：将全部标记抗体溶液转移到试剂盒的存储缓冲液中，但这会使得 IgG 溶液被稀释，不利于后续实验，将抗体转移到存储缓冲液，不进行额外稀释，按照下面的步骤操作。注意：抗体存储缓冲液包含 2 mM NaN_3。

7. 标记反应转移到超滤管膜上（或是之前抗体纯化使用后保存的超滤管），离心机 14000 g 离心直到所有的液体过滤到接收瓶中。

8. 添加适当体积的抗体储存液至超滤管膜，在膜表面小心上下抽吸 PBS 以重悬抗体。注意：抗体存储缓冲液包含 2 mM NaN_3。

9. 转移回收的抗体溶液至新管中。抗体可以直接用于染色。

10. 标记抗体 4℃避光至少可以稳定存储 6 个月，此外，可以将抗体分装成多份小包装在-20℃长期储存。

Super-n-stain 抗体标记试剂盒常见问题

问题	解答
实验过程中没有纯化步骤，我如何将未标记上的荧光染料除去？	该问题描述了我们研发的关键因素，我们独特的染料、缓冲液组分以及完善的标记策略已经完美地解决了这个问题，具体机制涉及专利保护，不便透露。
Super-n-stain 试剂盒可用于多色免疫标记吗，不同抗体间是否会发生染料转移？	Super-n-stain 试剂盒抗体与染料是共价结合方式，不存在染料扩散和转移现象。详细信息请参照上面产品说明部分。
Super-n-stain 试剂盒可用于标记抗体以外的蛋白吗？	该试剂盒是针对 IgG 抗体标记优化设计的，不推荐用于标记其它蛋白。Super-n-stain 标记条件可能会导致 IgM 变性。
Super-n-stain 试剂盒标记一抗和二抗的灵敏性是否一样？	直接免疫荧光检测信号会弱于间接检测，详细信息请参照上面产品说明部分。
用标记二抗的间接标记相比，直接标记复合物有哪些优势？	直接免疫染色避免了二抗孵育和清洗的步骤，容许来自同一物种的多个抗体同时使用进行多色检测，可以使用来自同一物种的抗体进行动物组织染色，从而避免了二抗的交叉反应。
Super-n-stain 试剂盒与 Invitrogen's Zenon 抗体标记试剂盒相比，有哪些优势？	主要优势：1. 染料与抗体共价结合避免了多重染色时染料转移和扩散现象；2. Super-n-stain 复合物在储液中可稳定保存几个月之久，而 Zenon 标记物必须在 30min 内使用；3. Super-n-stain 复合物体积更小些，因为染料直接与抗体结合，而 Zenon 复合物与抗体片段配合使用；4. 无需进行 染料与标记蛋白的比例优化，直接混合、染色即可；5. 无需进行后染固定；6.没有种属特异性
Super-n-stain 试剂盒与 Innova Bioscience Lightning-link 快速抗体标记试剂盒相比，有哪些优势？	Super-n-stain 试剂盒使用荧光更亮、光稳定性更好的 染料，试剂盒规格更灵活，可提供至单个抗体标记反应。
什么是 染料？	染料是一种水溶性较好、用于标记蛋白和核酸的小分子有机染料。我们可提供多达 20 种的此类 染料。
我应如何选择 Super-n-stain 试剂盒？	每种 染料，我们都提供三种不同抗体标记量的试剂盒，分别是：5-20 μg, 20-50 μg, 50-100 μg。对于没有稳定剂的抗体标记，根据抗体规格，选择其中一种即可，含有稳定剂的抗体标记，请参考产品描述中的表 1。

若待标记抗体总量适用于两种 Super-n-stain 试剂盒，我应如何选择？例如：标记 50 μg 抗体，我应购买 50-100 μg 抗体标记试剂盒还是 20-50 μg 的试剂盒？	遇到这种情况，两种规格都可以得到较好的结果，使用较小规格的效果更好。
如何选择染料与蛋白的比例获得较好的标记效果？	如果待标记的抗体量在试剂盒范围内，无需改变染料量或反应时间，因为 Super-n-stain 试剂盒中染料和反应缓冲液可以确保较好的标记效果。
我可以拆分试剂盒组分，以便多次使用吗？	不行，因为 Super-n-stain 试剂盒已经优化至一个标记单位，我们不建议拆分试剂盒以标记多个抗体或多次使用。
抗体浓度是否影响标记效率？	Super-n-stain 试剂盒较好的标记抗体浓度为 0.5-1 mg/mL，您可通过浓缩或稀释使待标记抗体达到上述浓度范围，小于或超过该浓度范围，会导致标记效率过低或过多。
使用标记后的抗体进行免疫荧光染色未观察到荧光信号	与供应商联系，确保抗体组分、浓度在容许范围内。
使用标记后的抗体进行免疫荧光染色未观察到荧光信号怎么办？	与供应商联系，确保抗体组分、浓度在容许范围内。在直接标记前，应确定用于间接标记的一抗的敏感性和特异性。为了得到与间接标记相同的信号强度，直接标记时需要使用更高浓度的一抗，更多信息请参考产品应用部分。共价标记可能会影响某些抗体的反应活性。可以通过实验确定是否是这一因素的原因，即使用 Super-n-stain 标记的一抗和荧光标记的二抗进行间接免疫染色，以确定 Super-n-stain 标记后的一抗是否仍具有反应活性。如果有兼容 染料的激发/发射波长的荧光读胶仪或扫描仪，可以通过 SDS-PAGE 电泳确定抗体是否标记上染料，取 0.1-0.5 μg 标记抗体进行变性 SDS-PAGE 电泳，然后进行凝胶拍照，你应该可以观察到 IgG 的 55 kDa 的重链和 25 kDa 的轻链对应的两条荧光条带。