

FlexAble 抗体标记试剂盒常见问题解析

一、FlexAble试剂盒分装、保存、选择常见问题

Q1: FlexLinker, FlexQuencher, FlexBuffer是否需要分装?

A: 可以分装。FlexAble试剂盒经过50个冻融循环测试仍保持活性, 分装不影响保质期。

Q2: 如何储存FlexAble抗体标记试剂盒?

A: -20°C保存1年, 4°C保存6个月。

Q3: 一个试剂盒可以标记多少种不同的一抗?

A: FlexAble试剂盒50 rxns规格可以标记多达50种不同的抗体, 使用FlexAble试剂盒 10 rxns规格可以标记多达10种抗体。

Q4: FlexAble试剂盒如何选?

A: 需要确认标记抗体的亚型, 再进行选择。目前FlexAble可标记的抗体类型有: Rabbit IgG, Mouse IgG1, Mouse IgG2a, Mouse IgG2b, Human IgG, Rat Kappa Light Chain。

如: FlexAble Antibody Labeling Kit for Mouse IgG1只能标记Mouse IgG1一抗。

Q5: FlexAble试剂盒1.0系列与2.0系列区别是什么?

A: FlexAble2.0系列是1.0系列的升级版, 荧光强度更高。在多重染色中, FlexAble1.0适合高丰度蛋白抗体标记, FlexAble2.0更适合中低丰度蛋白抗体标记; 在流式实验中标记流式抗体, 二者均可。

二、FlexAble标记前抗体缓冲液、浓度、物种常见问题

1. 抗体缓冲液

Q1: 是否可以直接标记含有BSA、甘油、Tris缓冲液和/或防腐剂储存的一抗?

A: 可以, FlexAble抗体标记试剂盒已经进行了验证。BSA、胺类缓冲液、50 %甘油、叠氮化钠等防腐剂都不会干扰标记效率。

2. 标记的抗体量及浓度

Q1: 标记的目标抗体是否需要稀释?

A: 标记前的抗体不需要稀释, 直接进行标记。

Q2: FlexAble能标记的抗体量是多少?

A: 一次标记反应, 可以标记至少0.5 µg一抗。使用标准规格 (50 rxns) 试剂盒, 可以标记25 µg的一种抗体或多达50种不同的0.5 µg抗体。

Q3: 标记抗体量超过0.5 µg, 如何按比例增加FlexLinker、FlexBuffer和FlexQuencher?

A: 可以根据所需一抗的量按比例增加所需的试剂体积。参见下表的计算示例:

抗体量	0.5 µg	1 µg	2.5 µg	5 µg	10 µg	25 µg
FlexLinker 体积	1 µL	2 µL	5 µL	10 µL	20 µL	50 µL
FlexBuffer 体积	≤ 8 µL	≤ 16 µL	≤ 40 µL	≤ 80 µL	≤ 160 µL	≤ 400 µL
FlexQuencher 体积	2 µL	4 µL	10 µL	20 µL	40 µL	100 µL
总体积	10 µL	20 µL	50 µL	100 µL	200 µL	500 µL

Q4: FlexAble标记的一抗浓度是多少? 抗体浓度很低或很高如何标记?

A: FlexAble标记方案是在总体积10 µL体系中使用0.5 µg一抗, 抗体最终为0.05 mg/mL。如果抗体浓度较低, 可以适当增加FlexLinker及FlexQuencher用量, 使用总体积大于10 µL的体系。

FlexAble对高浓度的一抗没有限制。若抗体浓度很高, 待移液体积过小, 可将抗体用PBS缓冲液稀释至0.5-1 mg/mL再进行标记。

Q5: 一抗浓度未知, 如何进行标记?

A: 以下是常用抗体来源和浓度信息, 可以用来估计一抗浓度:

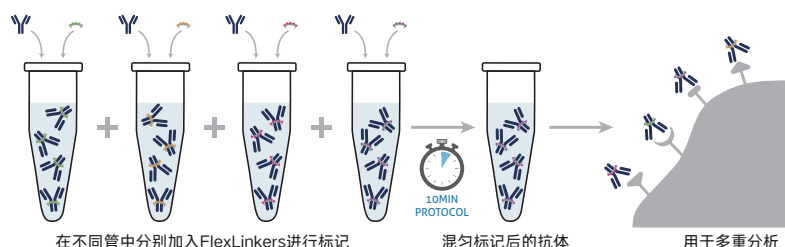
- 血清来源的多克隆抗体: 特异性抗体约1 mg/mL, 总抗体约10 mg/mL;
- 组织培养上清 (含10%胎牛血清) 来源的单克隆抗体: 特异性抗体约0.05 mg/mL, 总抗体约1 mg/mL;
- 组织培养上清 (无血清培养基) 来源的单克隆抗体: 特异性抗体约0.05 mg/mL, 总抗体约0.05 mg/mL;
- 腹水来源的单克隆抗体: 特异性抗体约0.9- 9 mg /mL, 总抗体约1- 10 mg /mL。

(摘自《抗体: 实验室手册》, E. Harlow & D. Lane, CSHL出版社, 1988年出版)

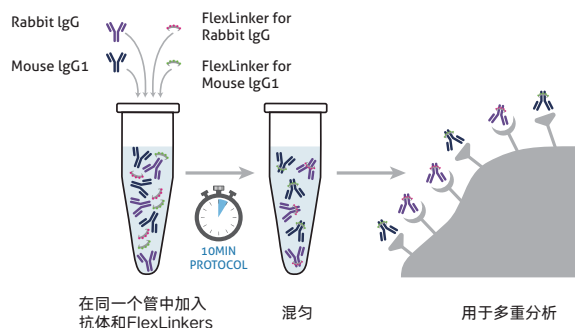
3. 不同物种来源的抗体

Q1: 不同物种来源的抗体如何标记?

A: 1) .针对相同种属的抗体, 需要分别标记后再混合一起进行实验。比如均是Rabbit IgG, 或者均是Mouse IgG1抗体, 或者Mouse的不同亚型抗体等, 都需要分开标记。



2) .针对不同种属来源的抗体, 可以混合标记。比如标记Rabbit IgG和Mouse IgG1抗体, 此时可以混合在一支EP管中进行标记, 直接添加相应的FlexLinker和FlexQuencher。



三、FlexAble标记后操作问题

Q1: 未结合的FlexLinker是否需要去除?

A: 未结合的FlexLinker可以通过添加FlexQuencher来中和。不需要额外的去除步骤(如超滤)。

Q2: FlexAble标记效率如何? 标记后是否需要纯化?

A: FlexAble标记是无损耗标记, 抗体回收率是100%。试剂盒中FlexLinker和FlexQuencher都是过量的, 可以确保抗体100%标记后, FlexQuencher封闭剩余的染料, 不让剩余染料影响实验体系和结果。标记完成后不需要纯化, 可以将整个混合物进行实验。

Q3: 标记后的抗体实验之前是否需要稀释?

A: 标记后的抗体需要根据样本类型, 靶蛋白丰度以及抗体效价来确定是否稀释。

Q4: FlexAble标记的一抗可否和间接法同时使用?

A: 可以。先做间接法染色, 再做直标抗体染色。

Q5: FlexAble标记的抗体可以保存多长时间?

A: 4℃避光保存1周。FlexAble是微量标记, 10分钟即可完成抗体标记, 推荐即标即用, 效果更好。

Q6: 使用来自同一物种的两种FlexAble标记抗体时, 是否会看到交叉反应或染料渗漏?

A: FlexAble用高亲和力的FlexLinker标记一抗。FlexLinker从一种抗体解离并结合到另一种抗体是非常罕见的。如果观察到渗漏, 可添加更多的FlexQuencher来去除未结合的FlexLinker, 或者尝试使用标记的抗体进行依次染色。

Q7: 如何减少实验背景?

A: 实验背景通常是由一抗带来的, 可以根据实验结果调整一抗和标记试剂盒的使用量来优化实验。