

- **本试剂盒标记效率高、标记速度快、操作简单。**本试剂盒提供的Sulfo-SMCC可高效标记各种带伯胺基的蛋白、抗体或其它分子；提供了配套的不同柱床体积的Desalting Column (5kDa MWCO), 可轻松去除过量的标记试剂和盐离子并获得SMCC标记的生物大分子, 而不需要进行透析或者凝胶过滤。不同浓度的蛋白与不同比例的Sulfo-SMCC反应后马来酰亚胺的修饰结果可参考图3。

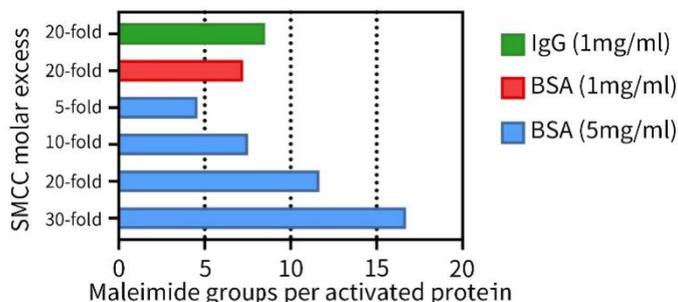


图3. 碧云天Maleimide快速标记试剂盒(P1291)对于不同比例Sulfo-SMCC修饰不同浓度的蛋白结果。实际修饰效果会因实验条件、操作等而存在一定差异, 本图仅供参考。

- **本试剂盒标记时间短、体系灵活。**本试剂盒可以在2小时内完成整个标记反应, 能有效保证了生物大分子的活性。
- 本试剂盒小包装、中包装和大包装都可进行10次标记反应, 每次最多分别可以标记约0.3mg、1.3mg和6.6mg蛋白或抗体。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P1291S-1	Sulfo-SMCC	2mg
P1291S-2	无水溶剂	200μl
P1291S-3	Conjugation Buffer	25ml
P1291S-4	Desalting Column (5kDa MWCO, 0.5ml)	10个
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P1291M-1	Sulfo-SMCC	5mg
P1291M-2	无水溶剂	500μl
P1291M-3	Conjugation Buffer	100ml
P1291M-4	Desalting Column (5kDa MWCO, 2ml)	10个
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P1291L-1	Sulfo-SMCC	10mg
P1291L-2	无水溶剂	1ml
P1291L-3	Conjugation Buffer	250ml
P1291L-4	Desalting Column (5kDa MWCO, 8ml)	10个
—	说明书	1份

保存条件:

Desalting Column 4°C保存, 一年有效; 其余-20°C保存, 一年有效。Sulfo-SMCC须避光保存。无水溶剂也可以室温或4°C保存, 至少一年有效。

注意事项:

- 待标记分子的溶液里不能含有除待标记分子上的额外的伯胺基团或胺基离子, 推荐使用Conjugation Buffer溶解待标记分子。为提升标记效果, 待SMCC标记的生物大分子的浓度不能太低。
- Sulfo-SMCC很容易受潮水解失活, 保存时一定要保持干燥; 使用试剂盒提供的无水溶剂配制成母液后, 可分装后-20°C保存, 两个月内有效。-80°C可以保存更长时间。
- 如需在室温下进行反应, Conjugation Buffer需平衡至室温(25°C左右)后再使用, 溶液温度会影响反应动力学。
- 对于不同体积和浓度的待标记分子, 请选择适当的标记试剂盒。Desalting Column (5kDa MWCO, 0.5ml)、Desalting Column (5kDa MWCO, 2ml)和Desalting Column (5kDa MWCO, 8ml), 柱床体积分别0.5ml、2ml和8ml, 对应的脱盐样品体积上限分别约为130μl、0.5ml和2.5ml。
- 对于分子量小于5kDa的生物大分子, 推荐使用BeyoDesalt™ G-10 Spin脱盐柱(P2603)、BeyoDesalt™ G-10 Mini脱盐柱(P2605)或BeyoDesalt™ G-10 Max脱盐柱(P2609), 这三种脱盐柱的MWCO为0.7kDa。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 准备工作。

- 将要标记的生物大分子溶解在Conjugation Buffer中, 使终浓度约为0.5-10mg/ml。如果溶液里有额外的伯胺(如Tris或Glycine)或者铵离子, 推荐使用碧云天脱盐柱(P2603/P2605/P2607/P2613/P2615/P2617)进行脱盐处理。
- 10mg/ml Sulfo-SMCC的配制: 将交联剂Sulfo-SMCC平衡至室温再开瓶。称量适量的Sulfo-SMCC, 用试剂盒中提供的无水溶剂进行溶解配制成10mg/ml Sulfo-SMCC。如果短期内全部使用完毕, 可以使用试剂盒中提供的全部的无水溶剂溶解全部的Sulfo-SMCC, 充分溶解后即10mg/ml Sulfo-SMCC, 例如小包装中的2mg Sulfo-SMCC用200 μ l无水溶剂进行溶解。如不立即使用, 可分装后-20 $^{\circ}$ C保存, 两个月内有效。

- 确认反应比例。**需根据蛋白的浓度, 参考下表中的推荐比例进行标记反应。如果标记效率不理想, 可酌情提高Sulfo-SMCC的比例。不同浓度的蛋白与不同比例的Sulfo-SMCC反应后马来酰亚胺的修饰结果可参考图3。

Sample Type	Sample Concentration	Recommended Molar Excess
IgG antibody	1mg/ml	~20X
Purified protein	<1mg/ml	~40-80X
Purified protein	1-4mg/ml	~20X
Purified protein	5-10mg/ml	~5-10X

3. 小量样品(不超过130 μ l)的SMCC标记反应。

以下以IgG作为样品(MW 150kDa), 体积为0.1ml为例, 其它样品体积可按比例调整。不同分子量的样品需根据推荐的比例进行调整。

- 将需要标记的0.1ml样品转移到洁净的1.5ml离心管(FTUB306), 样品应该已经溶解于Conjugation Buffer中。
- 根据样品浓度, 参考下表计算加入10mg/ml Sulfo-SMCC的体积, 加入后立即轻柔涡旋混匀。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of Sulfo-SMCC Solution	Molar Excess
0.5mg/ml	0.1ml	0.7 μ l	50X
1.0mg/ml	0.1ml	0.6 μ l	20X
2.0mg/ml	0.1ml	1.2 μ l	20X
5.0mg/ml	0.1ml	1.5 μ l	10X
10.0mg/ml	0.1ml	1.5 μ l	5X

- 在室温(约25 $^{\circ}$ C)反应30分钟或者4 $^{\circ}$ C反应2小时, 反应过程推荐在翘板摇床(也称侧摆摇床)上进行。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)。也可以使用LCD数控型长轴旋转混匀仪(E1505), 推荐的速度为25rpm上下翻转。
- 脱盐柱的准备: 移去脱盐柱Desalting Column (5kDa MWCO, 0.5ml)的下堵头, 置于1.5ml离心管或2ml洗脱管中, 1,000 \times g离心1分钟, 丢弃脱盐柱离心下来的保存溶液, 并重新把脱盐柱放回离心管中。使用非水平转头的环境下, 由于离心会使树脂压实形成一个向上的斜面, 该斜面的方向宜在后续步骤中保持, 所以在脱盐柱外壳上的斜面向上位置做标记, 在随后的离心步骤中需要调整好离心管的放入方向, 确保离心后斜面的方向和位置不会改变。
- 脱盐柱的预平衡: 向脱盐柱树脂顶部加入0.5ml Conjugation Buffer以平衡脱盐柱, 1,000 \times g离心1分钟, 丢弃溶液, 重复本步骤2-3次。
- 上样: 将脱盐柱放入新的1.5ml离心管中, 把步骤3c的样品(不能超过130 μ l)加入到树脂的中心位置, 使树脂吸入样品。
注: 样品体积不要超过脱盐柱规定的样品量体积, 否则会降低样品回收率。
- 洗脱: 将脱盐柱1,000 \times g离心2分钟, 流穿液含有纯化的SMCC标记的生物大分子。
注: 脱盐柱不适合重复使用。
- 立即进行下一步与带巯基蛋白(本试剂盒不提供)的交联反应。或尽快将SMCC标记的蛋白进行冻干, 以待后续使用。

4. 中量样品(不超过0.5ml)的SMCC标记反应。

以下以IgG作为样品(MW 150kDa), 体积为0.5ml为例, 其它样品体积可按比例调整。不同分子量的样品需根据推荐的比例进行调整。

- 将需要标记的0.5ml样品转移到洁净的1.5ml离心管(FTUB306), 样品应该已经溶解于Conjugation Buffer中。
- 根据样品浓度, 参考下表计算加入10mg/ml Sulfo-SMCC的体积, 加入后立即轻柔涡旋混匀。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of Sulfo-SMCC Solution	Molar Excess
0.5mg/ml	0.5ml	3.6 μ l	50X
1.0mg/ml	0.5ml	3 μ l	20X
2.0mg/ml	0.5ml	5.8 μ l	20X
5.0mg/ml	0.5ml	7.3 μ l	10X
10.0mg/ml	0.5ml	7.3 μ l	5X

- 在室温(约25 $^{\circ}$ C)反应30分钟或者4 $^{\circ}$ C反应2小时, 反应过程推荐在翘板摇床(也称侧摆摇床)上进行。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)。也可以使用LCD数控型长轴旋转混匀仪(E1505), 推荐的速度为25rpm上下翻转。
- 脱盐柱的准备: 移去脱盐柱Desalting Column (5kDa MWCO, 2ml)的下堵头, 置于15ml离心管中, 1,000 \times g离心2分钟, 丢

弃脱盐柱离心下来的保存溶液，并重新把脱盐柱放回离心管中。使用非水平转头的情况下，由于离心会使树脂压实形成一个向上的斜面，该斜面的方向宜在后续步骤中保持，所以在脱盐柱外壳上的斜面向上位置做标记，在随后的离心步骤中需要调整好离心管的放入方向，确保离心后斜面的方向和位置不会改变。

- e. 脱盐柱的预平衡：向脱盐柱的树脂顶部加入1.5ml Conjugation Buffer以平衡脱盐柱，1,000×g离心2分钟，丢弃溶液，重复本步骤2-3次。
- f. 上样：将脱盐柱放入新的15ml离心管中，把步骤4c的样品(不能超过0.5ml)加入到树脂的中心位置，使树脂吸入样品。
注：如果样品体积<400μl，在树脂吸入样品后再加入100μl超纯水可以增加样品回收率，但同时会稀释标记样品的浓度。
- g. 洗脱：将脱盐柱1,000×g离心2分钟，流穿液含有纯化的SMCC标记的生物大分子。
注：脱盐柱不适合重复使用。
- h. 立即进行下一步与带巯基蛋白(本试剂盒不提供)的交联反应。或尽快将SMCC标记的蛋白进行冻干，以待后续使用。

5. 大量样品(不超过2.5ml)的SMCC标记反应。

以下以IgG作为样品(MW 150kDa)，体积为2ml为例，其它样品体积可按比例调整。不同分子量的样品需根据推荐的比例进行调整。

- a. 将需要标记的2ml生物大分子转移到洁净的15ml离心管(FTUB515)，样品应该已经溶解于Conjugation Buffer中。
- b. 根据样品浓度，参照下表计算加入10mg/ml Sulfo-SMCC的体积，加入后立即轻柔涡旋混匀。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of Sulfo-SMCC Solution	Molar Excess
0.5mg/ml	2ml	14.6μl	50X
1.0mg/ml	2ml	11.7μl	20X
2.0mg/ml	2ml	23.3μl	20X
5.0mg/ml	2ml	29.1μl	10X
10.0mg/ml	2ml	29.1μl	5X

- c. 在室温(约25°C)反应30分钟或者4°C反应2小时，反应过程推荐在翘板摇床(也称侧摆摇床)上进行。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)。也可以使用LCD数控型长轴旋转混匀仪(E1505)，推荐的速度为25rpm上下翻转。
- d. 脱盐柱的准备：移去脱盐柱Desalting Column (5kDa MWCO, 8ml)的下堵头，置于50ml离心管中，1,000×g离心2分钟，丢弃脱盐柱离心下来的保存溶液，并重新把脱盐柱放回离心管中。使用非水平转头的情况下，由于离心会使树脂压实形成一个向上的斜面，该斜面的方向宜在后续步骤中保持，所以在脱盐柱外壳上的斜面向上位置做标记，在随后的离心步骤中需要调整好离心管的放入方向，确保离心后斜面的方向和位置不会改变。注：脱盐柱(5kDa MWCO, 8ml)放入50ml离心管内进行离心时，需要使用相应的适配器(Adaptor)，如12ml层析柱转50ml离心管适配器(FSA013)。
- e. 脱盐柱的预平衡：向脱盐柱的树脂顶部加入5ml Conjugation Buffer以平衡脱盐柱，1,000×g离心2分钟，丢弃溶液，重复本步骤2-3次。
- f. 上样：将脱盐柱放入新的50ml离心管中，把步骤5c的样品(不能超过2.5ml)加入到树脂的中心位置，使树脂吸入样品。
注：如果样品体积<1.8ml，在树脂吸入样品后再加入200μl超纯水可以增加样品回收率，但同时会稀释标记样品的浓度。
- g. 洗脱：将脱盐柱1,000×g离心2分钟，流穿液含有纯化的SMCC标记的生物大分子。
注：脱盐柱不适合重复使用。
- h. 立即进行下一步与带巯基蛋白(本试剂盒不提供)的交联反应。或尽快将SMCC标记的蛋白进行冻干，以待后续使用。

6. (选做)马来酰亚胺修饰的蛋白与带巯基蛋白的交联反应。

- a. 立即将步骤3g/4g/5g中纯化后的马来酰亚胺修饰蛋白与带巯基的蛋白按照所需比例混合。反应比例可根据最终交联物所需的摩尔比以及两种蛋白上的巯基和马来酰亚胺的相对数量来进行计算和优化。
- b. 室温下孵育30分钟，或4°C孵育2小时。
注1：通常在交联反应体系中补加1-5mM EDTA，能有效避免带巯基的蛋白自身反应形成二硫键。
注2：交联反应虽然在一定时间内就能完成，延长反应时间至数小时或过夜通常没有影响。如需提前终止交联反应，可向反应溶液中加入L-半胱氨酸溶液，终浓度需为反应体系中带巯基蛋白浓度的数倍。

参考文献：

1. Yoshitake S, Imagawa M, Ishikawa E, Niitsu Y, Urushizaki I, et al. J Biochem. 1982. 92(5):1413-1424.
2. Partis MD, Griffiths DG, Roberts GC, Beechey RB. J Protein Chem. 1983. 2(3):263-277.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P0630	Avi标签蛋白生物素标记试剂盒(BirA法)	20/100/500次
P0632S	生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)	0.3mg×10次
P0632M	生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)	1.3mg×10次
P0632L	生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)	6.6mg×10次
P0639S	FITC快速标记试剂盒	0.3mg×10次
P0639M	FITC快速标记试剂盒	1.3mg×10次

P0639L	FITC快速标记试剂盒	6.6mg×10次
P1251S	AF350快速标记试剂盒	5次
P1253S	AF488快速标记试剂盒	5次
P1256S	AF555快速标记试剂盒	5次
P1261S	AF594快速标记试剂盒	5次
P1265S	AF647快速标记试剂盒	5次
P1281S	DBCO快速标记试剂盒	0.3mg×10次
P1281M	DBCO快速标记试剂盒	1.3mg×10次
P1281L	DBCO快速标记试剂盒	6.6mg×10次
P1283S	Azide快速标记试剂盒	0.3mg×10次
P1283M	Azide快速标记试剂盒	1.3mg×10次
P1283L	Azide快速标记试剂盒	6.6mg×10次
P1285S	Alkyne快速标记试剂盒	0.3mg×10次
P1285M	Alkyne快速标记试剂盒	1.3mg×10次
P1285L	Alkyne快速标记试剂盒	6.6mg×10次
P1291S	Maleimide快速标记试剂盒	0.3mg×10次
P1291M	Maleimide快速标记试剂盒	1.3mg×10次
P1291L	Maleimide快速标记试剂盒	6.6mg×10次

Version 2025.01.15