LinKine™ AP 偶联试剂盒

Cat #: KTL0110 Size: 3×100 μg/1 mg

	AP 偶联试剂盒		
REF	**货号：**KTL0110	LOT	**批号：**见产品标签
	适用样本：蛋白质、多肽及其它含游离氨基的配体		
	保质期：4℃，避光保存 6 个月		

原理

碱性磷酸酶(ALP 或 AKP)是一种能够将对应底物去磷酸化的酶，即通过水解磷酸单酯将底物分子上的磷酸基团除去，并生成磷酸根离子和自由的羟基，这类底物包括核酸、蛋白、生物碱等。而该脱去磷酸基团的过程被称为去磷酸化或脱磷酸化。碱性磷酸酶可以与待标记分子结合，当与适当的底物一起孵育时，会生成带有颜色，荧光或发光衍生物的标记分子偶联体，我们可以对其进行检测和定量分析。AP 通常用于偶联物中，以确定分子靶标的存在，常用于 ELISA、蛋白质免疫印迹和和免疫组织化学等实验。由于较高浓度的无机磷可竞争性地抑制碱性磷酸酶的活性，所以在免疫实验中不能用含磷酸根丰富的 PBS 等体系，否则会造成本底偏高，可以用 TBS 等不含磷酸根的体系。

LinKine™ AP Labeling Kit 采用戊二醛作为交联剂，通过一步法，使酶和抗体蛋白的氨基分别与戊二醛的两个醛基结合。可直接对蛋白质、多肽及其它含游离氨基的配体上标记 AP。偶联产物在 4°C 下可稳定保存 1 个月。

应用举例：直标一抗在免疫实验中无需二抗，免去繁琐的孵育和洗涤步骤，节省时间。

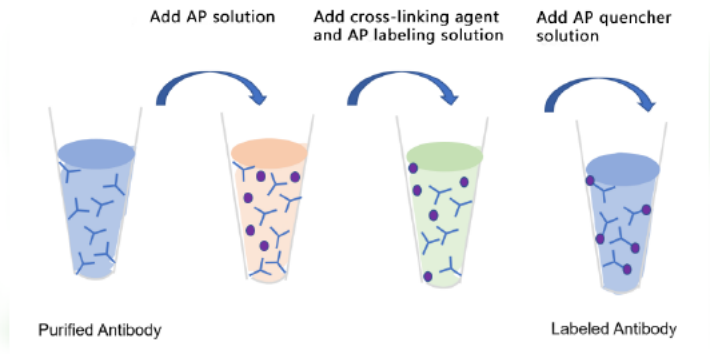


图 1：LinKine™ AP Labeling Kit 偶联步骤

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	3×100 μg	**1 mg**	
AP Solution	30 μL	100 μL	4℃，避光保存
AP Labeling Solution	10 mL	10 mL	4℃保存

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

Cross-linking Agent	500 µL	500 µL	4℃，避光保存
AP Quencher Powder	3	1	4℃，避光保存
说明书	1	1	RT

自备耗材

- 待标记样本
- 移液器和吸头
- 去离子水
- 超滤管（按照实验需求）

样本制备

待标记样本的缓冲液应满足如下要求：

pH	6.5-8.0
无胺缓冲液	MES，TBS，HEPES
螯合剂 (e. g. EDTA)	✓
甘油（Glycerol）	< 50%
牛血清白蛋白（BSA）	< 0.1%
甘氨酸（Glycine）	✗
明胶（Gelatin）	< 0.1%
普罗克林（Proclin）	✗
磷酸盐缓冲液	✗
含氨基成分	✗

实验步骤

1. 偶联物制备

待标记样本与 AP 最佳摩尔比为 1:1 至 1:2。我们建议以约 1:1 的比例进行偶联实验。您可以通过预实验确定最佳摩尔比。以标记抗体为例，从 1:1 到 1:2 推荐用量如下。

规格	AP 量	抗体量 (抗体: AP)		最佳标记体系
		1:1	1:2	
3×100 µg/Kit	300 µg	300 µg	150 µg	150 µL
1 mg/Kit	1 mg	1 mg	0.5 mg	0.5 mL

考虑到 AP 分子量（160,000:160,000），对于 1 mg AP，需要添加 0.5-1 mg 抗体。

标记样本用 AP labeling solution 置换缓冲液。建议用超滤的方法，添加 AP labeling solution 至 500 µL，4℃，12,000 g 离心 10 min，再次添加 AP labeling solution 至 500 µL，4℃，12,000 g 离心到样本体积不超过 50 µL。超滤完成以后,将超滤管的内管取出倒置放入一支新的超滤管中，4℃，4,000 g 离心 2 min 收集待标记样本。

以 3×100 µg/Kit 试剂盒为例，待标记样本与 AP 推荐摩尔比为 1:1。其它规格，试剂用量依据说明书进行等比调整。如果需要调整摩尔比，请保持 AP 量不变，更改待标记样本用量和 AP labeling solution 用量。

(1) 向待标记样本中加入 30 µL AP solution 用移液器温和混匀。

(2) 加入 15 µL cross-linking agent 至步骤（1）反应液中，加 AP labeling solution 至 150 µL 温和混匀，垂直混匀仪上室温避光反应 2 h。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

(3) 向 AP quencher powder 中加入 1 mL AP labeling solution 制作 AP quencher solution。AP quencher solution 可置于室温保存，但须当天使用。

注意：(1) 为了防止气体在管内聚集，瞬间膨胀，导致安全隐患，请开盖配制 AP quencher solution；(2) 不同规格的试剂盒，配制 AP quencher solution 的 AP labeling solution 用量保持不变（1 mL）。

(4) 向步骤（2）反应液中加入 60 μL AP quencher solution，温和混匀，4℃，避光放置 1 h。

(5) 用超滤的方式除去小分子杂质，添加 AP labeling solution 至 500 μL，4℃ 12,000 g 离心 10 min，再次添加 AP labeling solution 至 500 μL，4℃，12,000 g 离心 10 min，可适当延长时间使体积缩小，偶联物浓度高。超滤完成以后,将超滤管的内管倒置放入一支新的超滤管中，4℃，4,000 g 离心 2 min 收集偶联物。

(6) 除去小分子杂质以后的偶联物可直接用于下游实验。

2. 偶联物储存

偶联物 4℃避光条件下可稳定保存一个月。若需长期储存，请分装并于-20℃下避光保存，避免反复冻融，可加入同体积甘油。如需稀释偶联物，避免使用含磷酸根丰富的 PBS 等缓冲液，可以使用 TBS 等不含磷酸根的缓冲液。

常见问题

问 1：由于样本浓度低，反应体积超过了最佳标记体系？

答 1：如果浓缩后样本浓度仍小于 2 mg/mL，可适当调整反应体积，但最终浓度应大于 1 mg/mL。AP solution 和 AP quencher solution 的比例需保持不变。

问 2：待标记样本与 AP 摩尔比只能在 1:1 和 1:2 之间吗？

答 2：不同样本，最佳摩尔比不同。对于抗体，建议不要超过 1:2。其它样本，可以尝试不同比例。

注意事项

1. 不同批次号、不同的厂家的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
2. 混合或复溶组分时，避免产生气泡。如有未使用完的试剂，请及时密封保存于 4℃。
3. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。
4. 保持好的实验习惯，穿戴好手套、实验服、口罩、防目镜等防护工具后再开始实验。

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTL0100	LinKine™ 辣根过氧化物酶偶联试剂盒
KTL0210	LinKine™ FITC 偶联试剂盒
KTL0520	LinKine™ AbFluor™ 488 偶联试剂盒
KTL0540	LinKine™ AbFluor™ 594 偶联试剂盒
KTL0120	LinKine™ 生物素偶联试剂盒
KTL0530	LinKine™ AbFluor™ 555 偶联试剂盒
KTL0560	LinKine™ AbFluor™ 647 偶联试剂盒
KTL0580	LinKine™ AbFluor™ 680 偶联试剂盒

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.