

# pH630 Deep Red anti-human labeling reagent

## 标记试剂产品说明书

### 产品简介

启和医疗推出的 pH 敏感性 pH630 Deep Red anti-human labeling reagent 标记试剂能够对抗体进行快速、可扩展且高效的内化标记，其配套的 pH 染料标记抗体试剂盒专为便捷快速地标记测试抗体制备，通过偶联 pH 敏感荧光基团可精准量化标记抗体的内吞过程；该系统依托溶酶体的酸性环境发挥作用，当 pH 染料标记的抗体处于 pH 7.4 的中性细胞外液时，可与细胞表面特异性抗原结合并被内吞，进入 pH 4.5-5.5 的溶酶体酸性环境后荧光强度会显著增强，而在细胞缺乏特异性抗原表达的情况下，内吞作用不会发生，标记抗体的荧光强度维持在较低水平，从而最大程度降低背景荧光，因此该 pH 染料作为一种优质的低背景抗体标记染料，已在多种细胞类型及不同抗体的实验中获得成功应用。

### 产品信息

货号	产品名称	浓度	Ex/Em(nm)	产品包装
QH-17-1003	pH630 Deep Red anti-human labeling reagent	0.5 mg/mL	640/655	200 $\mu$ L

### 产品规格储存

- 存储缓冲液成分: 10 mM 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4)，含 50% 甘油。
- 存储: 试剂需在 4°C 避光环境下保存，自收货之日起稳定期不少于 6 个月；  
**注意事项: 避免反复冻融，开启后尽快使用，剩余试剂需严格按储存条件密封保存。**

### 推荐使用方法

#### 1. 储存液制备

- 向冻干染料中加入 100  $\mu$ L 无菌水，制备浓度为 0.5 mg/mL 的储备液，轻柔吹打混匀（溶液不澄清时可离心），禁止超声处理。储备液可直接稀释到含检测抗体的标记混合物中。

## 2. 快速操作指南

- 细胞铺板: 将细胞以 50  $\mu$ L / 孔的体积铺于 96 孔板, 细胞密度为 5000-30000 个 / 孔, 静置 2-24 小时 (根据细胞类型调整) 使细胞贴壁;
- 抗体标记: 在培养基中按 1:2 的摩尔比混合检测抗体与染料试剂 (浓度为最终检测浓度的 2 倍), 37°C 孵育 15 分钟完成偶联;
- 向细胞中加样: 将抗体-染料混合物以 1 $\times$  工作浓度加入细胞培养孔 中, 37 °C 孵育 6~24 小时。
- 活细胞荧光成像: 使用合适的荧光成像系统观察抗体内吞情况。

# 实验操作步骤

## 1. 靶细胞准备

- 确保靶细胞状态良好 (无污染、活性 $\geq$ 90%), 用适宜的细胞培养基充分稀释混匀;
- 向 96 孔细胞培养板中加入细胞悬液, 每孔 100  $\mu$ L, 细胞密度控制在 3000~6000 个 / 孔 (需根据细胞生长速率调整: 生长快的细胞可适当降低密度, 生长慢的细胞可提高密度);
- 轻轻晃动培养板使细胞均匀分布, 待细胞自然沉降后, 转移至 37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育, 直至细胞铺板密度达到 50% 左右 (最适检测状态, 通常需 2~24 小时, 具体时间因细胞类型而异)。

## 2. 抗体标记操作

- 混合反应: 按 “待测抗体: 标记染料 =1:2” 的摩尔比混合 (推荐用量: 10  $\mu$ g 待测抗体 + 2  $\mu$ g 标记染料), 可直接混合纯品 (无需提前稀释), 室温下避光孵育 20 分钟;
  - 注: 待测抗体浓度范围为 0.1~10 mg/mL, 抗体原有缓冲液不影响标记反应, 无需更换缓冲液。
  - 工作液配置: 用细胞培养基将上述 “抗体 - 染料复合物” 稀释, 使待测抗体终浓度达到 3  $\mu$ g/mL (约 20 nM), 轻轻吹打混匀;
- 注: 根据实验需求, 待测抗体终浓度可调整为 5~100 nM, 需确保稀释后溶液均匀无沉淀。

## 3. 抗体内吞反应

- 从培养箱中取出已准备好的靶细胞板, 吸弃原有培养基 (或直接加入工作液, 根据细胞耐受度选择);
  - 向每孔加入 100  $\mu$ L 配制好的 “抗体 - 染料复合物工作液”, 轻轻敲击板壁使液体均匀覆盖细胞;
  - 将细胞板放回 37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育 6~24 小时。
- 注: 不同靶点、不同细胞的内吞效率差异较大, 建议设置梯度孵育时间 (如 6 h、12 h、24 h), 筛选

最佳检测时间: 用户可根据实验需求及实际情况设计对照及复孔。

#### 4. 细胞成像与分析

- 孵育结束后, 取出细胞板, 轻轻吸弃孔内工作液 (可选, 部分成像系统支持直接观察), 用 PBS 轻轻洗涤细胞 1~2 次 (去除未结合的游离染料, 降低背景) ;
- 观察细胞生长情况, 检测细胞内荧光变化。检测内吞时荧光的增加可通过多种技术实现, 包括细胞成像、流式细胞仪和荧光平板阅读器。

## 注意事项

- 储存及使用期限: 试剂需在 4°C避光环境下保存, 自收货之日起稳定期不少于 6 个月; 需注意避免反复冻融, 开启后尽快使用, 剩余试剂需严格按储存条件密封保存。
- 荧光保护要求: 所有荧光染料均存在淬灭特性, 实验全程请注意避光操作, 以减缓荧光淬灭速度, 保障检测效果。
- 产品使用限制: 本产品仅供专业人员进行科学使用, 严禁用于临床诊断、治疗、食品及药品领域, 且不得在普通住宅内存放。
- 操作安全规范: 为保障您的安全与健康, 操作时请穿戴实验服并佩戴一次性手套。