

## FITC 快速标记试剂盒

### FITC Quick Labeling Kit

货号	最大标记体积	待标记物最小分子量	可标记抗体量
BF06094-3K-0.5mL	0.5mL	3kDa	0.2-10mg
BF06094-3K-4.0mL	4.0mL	3kDa	1.0-80mg
BF06094-3K-15mL	15mL	3kDa	5-300mg
BF06094-10K-0.5mL	0.5mL	10kDa	0.2-10mg
BF06094-10K-4.0mL	4.0mL	10kDa	1.0-80mg
BF06094-10K-15mL	15mL	10kDa	5-300mg
BF06094-30K-0.5mL	0.5mL	30kDa	0.2-10mg
BF06094-30K-4.0mL	4.0mL	30kDa	1.0-80mg
BF06094-30K-15mL	15mL	30kDa	5-300mg
BF06094-50K-0.5mL	0.5mL	50kDa	0.2-10mg
BF06094-50K-4.0mL	4.0mL	50kDa	1.0-80mg
BF06094-50K-15mL	15mL	50kDa	5-300mg
BF06094-100K-0.5mL	0.5mL	100kDa	0.2-10mg
BF06094-100K-4.0mL	4.0mL	100kDa	1.0-80mg
BF06094-100K-15mL	15mL	100kDa	5-300mg

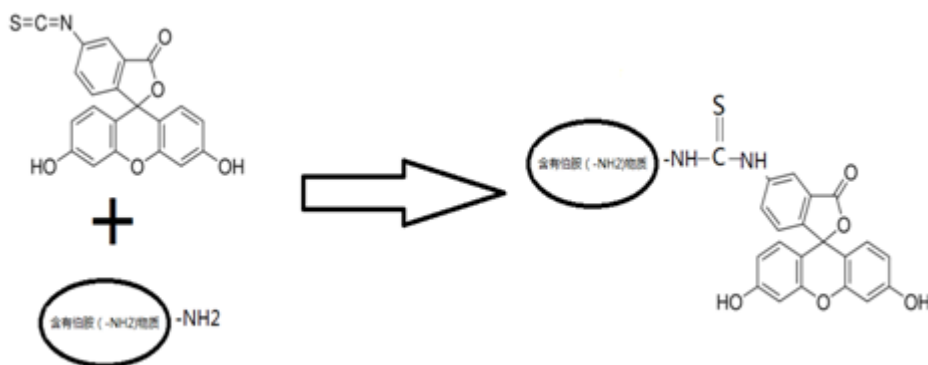
内含：活性FITC；FITC助溶剂（DMSO）（使用前需要在室温融化）；

超滤管1支；标记缓冲液；FITC清除指示剂；标记物保存液

储存：-20℃储存，有效期18个月

#### 一、产品描述

本品提供了FITC快速标记所需全部试剂，用于含有伯氨基（NH<sub>2</sub>-）的蛋白/抗体/多肽或者其他大分子的标记。待标记物上的赖氨酸残基的游离ε-氨基可与FITC发生亲核反应，形成硫脲连接而共价结合，形成稳定性的偶联物。其反应原理如下：



## 二、产品特点

1. 使用方法简单，无需额外准备试剂；
2. 通过离心脱盐和去除游离的FITC，无需透析或者凝胶过滤；
3. 本试剂盒配备指示剂，确保游离FITC去除完全。

## 三、FITC标记使用量的计算

每个反应中FITC试剂的使用量取决于待标记蛋白质氨基数目和总量。例如实验数据分析表明，标记2mg/ml的抗体（IgG，150KD），每毫升抗体溶液（2mg/mL）加入100 $\mu$ L的FITC（2mg/mL）能达到最佳标记效果效果；其他蛋白的标记可以根据实际分子量，参照此摩尔比类推。

## 四、实验前准备

1. 提前20min从冰箱中取出试剂盒，使试剂盒各组分平衡至室温；
2. 用FITC助溶剂(DMSO, 使用前需要放在室温融化)溶解FITC, 使FITC终浓度为2mg/mL。

特别提示：

- A. 溶解的活好FITC最好一次性使用完，如果使用不完可以密封放在-20 $^{\circ}$ C的冰箱内，一月内可以使用，但是标记效率会降低；
- B. 试剂盒中超滤管为一次性产品，用完后，可用市售的相同截留分子量的超滤管替代；
- C. FITC助溶剂使用完之后需要立即密封保存，防止吸潮。

## 五、操作步骤

（本操作步骤按照 1mg抗体的量进行标记）

1. 取1mg待标记抗体于超滤管中，加入不超过超滤管最大体积的标记缓冲液，12,000g离心10min；可以重复此步骤多次；最后一次超滤完成，可以加入适量标记缓冲液调整抗体的浓度到2mg/ml左右；

注意：

- A. 留意超滤管的最大体积和最大截留分子量，本实例超滤管的最大体积为0.5ml；
- B. 如果待标记抗体浓度低时，可先超滤离心浓缩；

C. 如果待标记物含有游离的氨基（Tris、氨基酸或者其他干扰物，需要用标记缓冲液反复超滤确保其去除干净）。

2. 加入溶解的FITC 50 $\mu$ l（浓度为2mg/mL）至上述超滤管中，并轻轻吹打混匀。放入37 $^{\circ}$ C恒温箱中避光温育60min以上；
3. 标记结束以后加入1/10体积（超滤管中总液体体积）的FITC清除指示剂至上述超滤管中；
4. 12,000g离心10min；
5. 加入适量标记缓冲液至上述超滤管中，并轻轻吹打混匀，12,000g离心10min。并重复操作多次，直至超滤管中没有蓝色，未标记的FITC被彻底清除干净；
6. 加0.2-0.5mL标记物保存液至超滤管中，轻轻吹打；吸取收集超滤管中的溶液，即为FITC标记抗体，-20 $^{\circ}$ C保存。

标记偶联比率的计算：

$$F/P = \frac{MW}{389} \times \frac{A495/195}{[A280 - (0.35 \times A495)]/E0.1\%280} = \frac{A495 \times C}{A280 - (0.35 \times A495)}$$

$$\text{其中 } C = \frac{MW \times E0.1\%280}{389 \times 195}$$

C是某个蛋白的一个常数；MW是蛋白的分子量；389是FITC的分子量；195是偶联的FITC在490nm（PH13.0）情况下1mg/ml的吸光值；(0.35 $\times$ A495)是FITC在280nm情况下吸光值的校正系数；E0.1% 是1.0 mg/ml的蛋白在280nm的吸光值。

\* FITC清除指示剂为蓝色，其为FITC的结构类似物，其数量为加入的FITC的20倍以上，在通过超滤管离心清除游离FITC的时候，如果超滤管中没有蓝色了，游离的FITC基本上被清除完毕。

## 六、注意事项

1. 本试剂盒适用于所有含有 $\epsilon$ -氨基（NH<sub>2</sub>-）的大分子物质的标记（蛋白，抗体，以及其他含有伯氨基（NH<sub>2</sub>-）的化合物分子），具体标记比例根据待标记物中氨基的数量确定；
2. 本试剂盒中的FITC助溶剂为DMSO，使用完毕后要密封干燥保存；

3. 本试剂盒配备了标记物保存液，实验人员也可以根据被标记物的特点不同，选择更适合的保存液；
4. 根据试剂盒中提供的超滤管规格通常要求小于目标蛋白分子量至少一倍以上。比如IgG抗体分子量为150kDa，选择50K及以下的超滤管。IgM五聚体分子量虽然有970kDa，但其中含有部分单体，分子量只有190kDa，因此建议也选择50K及以下超滤管。