

FITC快速标记试剂盒

产品编号	产品名称	包装
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

产品简介:

- 碧云天研发生产的FITC快速标记试剂盒, 即FITC Quick Labeling Kit, 也称FITC蛋白标记试剂盒(FITC Protein Labeling Kit)、FITC抗体标记试剂盒(FITC Antibody Labeling Kit)、FITC蛋白偶联试剂盒(FITC Protein Conjugation Kit), 是一种新型、高效的对感兴趣的蛋白、抗体或其它含有伯氨基的分子进行FITC快速标记的试剂盒。本试剂盒标记的蛋白、抗体等带有绿色荧光, 可以用于免疫荧光(Immunofluorescence)、流式细胞分析(Flow Cytometry)、免疫印迹(Immunoblotting)等实验。
- 异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC), 也称为异硫氰酸荧光素(异构体I)、荧光素异硫氰酸酯异构体I、荧光素-5-异氰酸酯(异构体I)、5-异硫氰酸荧光素、异硫氰酸荧光黄、异硫氰酸荧光红、异硫氰酸荧光橙红、5-FITC (异构体I), CAS号为3326-32-7, 分子量为389.38, 由于其出色的荧光量子产率和标记的稳定性, 而成为最常用的荧光标记探针之一[1]。FITC在492nm处有最大吸光波长, 通过激发, 在520nm具有最大发射波长。本试剂盒中提供的FITC标记试剂(Reactive FITC)是一种胺反应活性的NHS酯试剂, 可在pH7.0-9.0的缓冲液中与伯氨基(-NH₂)发生有效反应, 形成稳定的酰胺键[2]。包括抗体在内的蛋白质除了每个肽链的氨基末端, 通常还含有多个赖氨酸(K)残基, 因此具有多个伯胺作为FITC标记的靶标[3]。
- 本试剂盒提供了FITC标记试剂和用于纯化FITC标记生物大分子的脱盐柱(Desalting Column)。本试剂盒的标记流程和原理如图1所示。

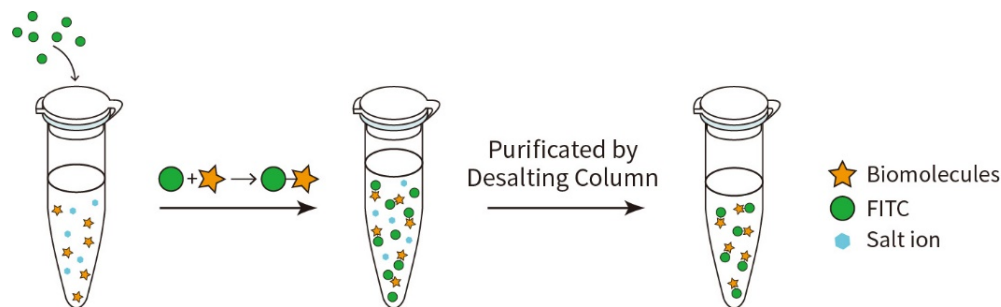


图1. 碧云天FITC快速标记试剂盒(P0639)的实验流程和原理示意图。

- 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FITC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FITC标记的生物大分子, 而不需要进行透析或者凝胶过滤。
- 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
P0639S-1	Reactive FITC	2mg
P0639S-2	无水溶剂	400μl
P0639S-3	NaHCO ₃	50mg
P0639S-4	Desalting Column (5kDa MWCO, 0.5ml)	10个
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0639M-1	Reactive FITC	5mg
P0639M-2	无水溶剂	1ml
P0639M-3	NaHCO ₃	100mg

P0639M-4	Desalting Column (5kDa MWCO, 2ml)	10个
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0639L-1	Reactive FITC	10mg
P0639L-2	无水溶剂	2ml
P0639L-3	NaHCO ₃	500mg
P0639L-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。Reactive FITC需避光保存。Reactive FITC也可以4°C保存，至少一个月有效；使用试剂盒提供的无水溶剂配制成母液后，可分装后-20°C避光保存，两个月内有效，-80°C可以保存更长时间。无水溶剂和NaHCO₃也可以室温或4°C保存，至少一年有效。

注意事项：

- 需自备PBS (C0221A/ST476)。
- 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PBS溶解带标记分子。为提升标记效果，待FITC标记的生物大分子的浓度不能太低。
- Reactive FITC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避光保存，两个月内有效。-80°C可以保存更长时间。
- 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，蛋白量上限分别约为0.3mg、1.3mg和6.6mg。
- 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1X PBS (C0221A)中，使终浓度约为0.5-3mg/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。
- 5mg/ml Reactive FITC的配制：称量适量的Reactive FITC，用试剂盒中的提供的无水溶剂进行溶解配制成5mg/ml Reactive FITC。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Reactive FITC，充分溶解后即即为5mg/ml Reactive FITC，例如小包装中的2mg Reactive FITC用400μl无水溶剂进行溶解。如不立即使用，可分装后-20°C避光保存，两个月内有效。
- 1M NaHCO₃的配制：根据样品量配制适量的1M NaHCO₃溶液，如称取10mg NaHCO₃，加入119μl超纯水即得1M NaHCO₃溶液。NaHCO₃可维持标记反应体系的pH在7-9之间，提高标记效率，一般加入量为样品体积的1/10。注：NaHCO₃溶液需用现配。

2. 小量样品(不超过130μl, 蛋白浓度不超过3mg/ml)的FITC标记反应。

以下以样品体积为0.1ml为例，其它样品体积可按比例调整。

- 将需要标记的0.1ml生物大分子转移到洁净的1.5ml离心管(FTUB306)，加入10μl新鲜配制的1M NaHCO₃溶液。
- 根据样品浓度，参照下表计算加入5mg/ml Reactive FITC的体积。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of Reactive FITC Solution
0.5mg/ml	0.1ml	1μl
1.0mg/ml	0.1ml	2μl
1.5mg/ml	0.1ml	3μl
2.0mg/ml	0.1ml	4μl
2.5mg/ml	0.1ml	5μl
3.0mg/ml	0.1ml	6μl

- 在室温(约25°C)反应30-60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。
- 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

×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: 向脱盐柱树脂顶部加入0.5ml 1X PBS以平衡脱盐柱, 1,000×g离心1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1.5ml离心管中, 把步骤3c的样品(不能超过130μl)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。
- g. 洗脱: 将脱盐柱1,000×g离心2分钟, 流穿液含有纯化的FITC标记的生物大分子, 可以直接用于后续实验。如需保存, 请保存在合适的条件。注: 脱盐柱不适合重复使用。
- h. 如需计算FITC标记蛋白的标记效率, 请参考步骤5。

3. 中量样品(不超过0.5ml, 蛋白浓度不超过3mg/ml)的FITC标记反应。

以下以样品体积为0.5ml为例, 其它样品体积可按比例调整。

- a. 将需要标记的0.5ml生物大分子转移到洁净的1.5ml离心管(FTUB306), 加入50μl新鲜配制的1M NaHCO₃溶液。
- b. 根据样品浓度, 参照下表计算加入5mg/ml Reactive FITC的体积。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of Reactive FITC Solution
0.5mg/ml	0.5ml	5μl
1.0mg/ml	0.5ml	6μl
1.5mg/ml	0.5ml	8μl
2.0mg/ml	0.5ml	11μl
2.5mg/ml	0.5ml	13μl
3.0mg/ml	0.5ml	15μl

- c. 在室温(约25°C)反应30-60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, 2ml)的下堵头, 置于15ml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。
- e. 脱盐柱的预平衡: 向脱盐柱的树脂顶部加入1.5ml 1X PBS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3c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FITC标记的生物大分子, 可以直接用于后续的实验。如需保存, 请保存在合适的条件。注: 脱盐柱不适合重复使用。
- h. 如需计算FITC标记蛋白的标记效率, 请参考步骤5。

4. 大量样品(不超过2.5ml, 蛋白浓度不超过3mg/ml)的FITC标记反应。

以下以样品体积为2ml为例, 其它样品体积可按比例调整。

- a. 将需要标记的2ml生物大分子转移到洁净的15ml离心管(FTUB515), 加入200μl新鲜配制的1M NaHCO₃溶液。
- b. 根据样品浓度, 参照下表计算加入5mg/ml Reactive FITC的体积。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of Reactive FITC Solution
0.5mg/ml	2ml	20μl
1.0mg/ml	2ml	24μl
1.5mg/ml	2ml	32μl
2.0mg/ml	2ml	44μl
2.5mg/ml	2ml	52μl
3.0mg/ml	2ml	60μl

- c. 在室温(约25°C)反应30-60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: Desalting Column (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 1X PBS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4c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FITC标记的生物大分子，可以直接用于后续的实验。如需保存，请保存在合适的条件。注：脱盐柱不适合重复使用。
- h. 如需计算FITC标记蛋白的标记效率，请参考步骤5。

5. FITC标记效率的计算。

- a. 将标记好的样品用1M NaHCO₃溶液进行稀释，稀释倍数记为Dilution factor。

- b. 蛋白浓度的计算：

蛋白浓度(M)可直接使用标记时的蛋白浓度(mg/ml)进行计算，一般脱盐柱纯化不会损失蛋白，只是去除未标记的FITC和盐离子。但在蛋白浓度比较低时，蛋白回收率可能在90%左右，计算蛋白浓度时需要在初始蛋白浓度的基础上，乘以回收系数0.9。

$$\text{Protein concentration (M)} = (\text{Protein concentration (mg/ml)}) / (\text{MW of protein})$$

注：对于大多数IgG, MW of protein = 145,000。

- c. FITC标记数的计算：

$$\text{FITC per protein molecule} = (A_{495} \times \text{Dilution factor}) / (68,000 \times \text{Protein concentration (M)})$$

其中：68,000cm⁻¹M⁻¹是 FITC 在 pH8.0时在495nm 处的摩尔消光系数(ε)；FITC 的最大吸收光波长是495nm，可使用1cm 比色皿或酶标仪测定 A₄₉₅，如果使用酶标仪测定，消光系数需乘以 L (cm)。L (cm)为测吸光度时的路径长度(Pathlength)，如100μl 样品在一般的96孔中的 L (cm)约为0.276，而超微量分光光度计的 L (cm)约为0.02-0.1。如果使用不同的反应孔或超微量分光光度计，请注意修改 L (cm)的值。

- d. 计算举例：如果已知蛋白是Casein，分子量约为24kDa，蛋白初始浓度是2mg/ml，计算可得Protein concentration (M)为 0.0000833；稀释10倍后，使用Varioskan LUX多功能酶标仪测得A₄₉₅的吸收值为0.1316，此时Dilution factor为10，L (cm)为0.049，计算FITC标记数 = 0.1316×10/(68000×0.049×0.000083) = 4.74。

6. FITC标记物的保存。

- a. 如果使用提供的脱盐柱纯化，FITC标记物可保存在PBS中，加入ProClean 300 (ST853)使终浓度为0.1%，4°C避光保存。
- b. 如果纯化后的标记物浓度低于1mg/ml，加入1-10mg/ml的BSA (ST023)或者其它稳定蛋白以防止标记物的降解。
- c. 加入ProClean 300后，FITC标记抗体通常可以在4°C稳定保存不少于1个月。如果长期保存，建议分装后-20°C避光保存，避免反复冻融。

参考文献：

1. Chaganti LK, Venkatakrisnan N, Bose K. Biosci Rep. 2018. 38(6): BSR20181764.
2. Stabenfeldt SE, LaPlaca MC. Acta Biomater. 2011. 7(12):4102-8.
3. Bian ZM, Field MG, Elnor SG, Kahlenberg JM, Elnor VM. Exp Eye Res. 2018. 170:29-39.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0221A	PBS	500ml
E6673	BeyoShaker™数字式翘板摇床	1套
E1505	LCD数控型长轴旋转混匀仪	1台
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
P2603	BeyoDesalt™ G-10 Spin脱盐柱	20/100个
P2605	BeyoDesalt™ G-10 Mini脱盐柱	5/20个
P2607	BeyoDesalt™ G-10 Midi脱盐柱	5/20个
P2609	BeyoDesalt™ G-10 Max脱盐柱	5/20个
P2613	BeyoDesalt™ G-25 Spin脱盐柱	20/100套
P2615	BeyoDesalt™ G-25 Mini脱盐柱	5/20个
P2617	BeyoDesalt™ G-25 Midi脱盐柱	5/20个
P2619	BeyoDesalt™ G-25 Max脱盐柱	5/20个
P2621	BeyoDesalt™ G-25脱盐柱(Superfine, 5ml)	1/5个
P2623	BeyoDesalt™ G-25脱盐柱(Fine, 70ml)	1/5个
P2627	BeyoDesalt™ 6FF Spin脱盐柱	20/100套
P2629	BeyoDesalt™ 6FF Mini脱盐柱	5/20个

P2631	BeyoDesalt™ 6FF Midi脱盐柱	5/20个
P2633	BeyoDesalt™ 6FF Max脱盐柱	5/20个
P2635	BeyoDesalt™ 6FF脱盐柱(Superfine, 5ml)	1/5个
P2637	BeyoDesalt™ 6FF脱盐柱(Fine, 70ml)	1/5个
ST476	PBS (10X)	500ml

Version 2024.12.09