

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

FITC 标记试剂盒

产品货号：RE80001

产品规格：20 mg/40 mg/60 mg

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

Web: <https://www.enkilife.cn/>

E-mail: customer@enkilife.cn

Tel: 027-87002838

产品简介

本 FITC 标记试剂盒提供了 FITC 快速标记所需全部试剂，能简单有效地对含有伯氨基(-NH₂)分子的蛋白标记，最大激发波长为 490 nm，最大荧光发射峰为 520 nm。

产品特点

便捷：通过离心脱盐和去除游离的 FITC，无需透析或者凝胶过滤。

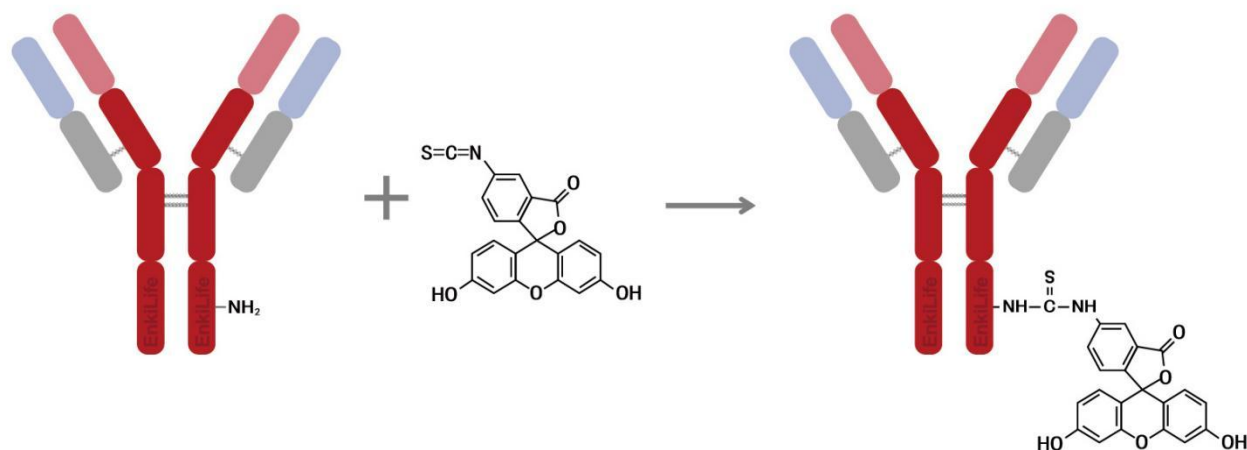
准确：本试剂盒配备指示剂，确保游离 FITC 去除完全。

基本信息

结构式	
分子量	389
Excitation/Absorption maximum (nm)	494
Emission maximum (nm)	518
摩尔消光系数 ϵ (L · mol ⁻¹ · cm ⁻¹)	68000
280 nm 矫正系数(CF280)	0.3

标记原理

在一定 pH 范围内，FITC 专一地与伯氨基反应(N-末端及赖氨酸残基侧链) 形成稳定的硫脲键，从而实现与蛋白/抗体/多肽或者其他大分子的偶联。



产品组分

产品组分	不同规格组分含量		
活性 FITC	2 mg	4 mg	6 mg
超滤管	1 支		
助溶剂(DMSO)	1.5 mL	3 mL	4.5 mL
标记缓冲液（Labeling Buffer）	30 mL	60 mL	90 mL
清除指示剂	1 mL	2 ml	3 ml
标记物保存液	2 mL	4 mL	10 mL
推荐标记抗体量	0.2-20 mg	1.0-40 mg	5.0-60 mg

*超滤管使用说明：

若标记同一种生物分子，超滤管膜未破裂前可重复使用数次。

若标记不同生物分子，应更换不同超滤管，避免生物分子交叉污染。

保存条件

未拆封的试剂盒可在 2~8°C 保存一年，溶解后的 FITC 可在-20°C 或-80°C 保存一周。

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，通过我们实验数据分析表明，标记 2 mg/mL 的抗体（IgG，150 KD），每毫升抗体溶液（2 mg/mL）加入 100 μ L 的 FITC(2 mg/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情况，参照此比例类推。

操作过程

·实验前准备

1. 仔细阅读使用说明书。
2. 提前 20 min 从冰箱中取出试剂盒，使试剂盒各组分平衡至室温；
3. 用 FITC 助溶剂（DMSO，使用前需要放在室温融化）溶解 FITC。

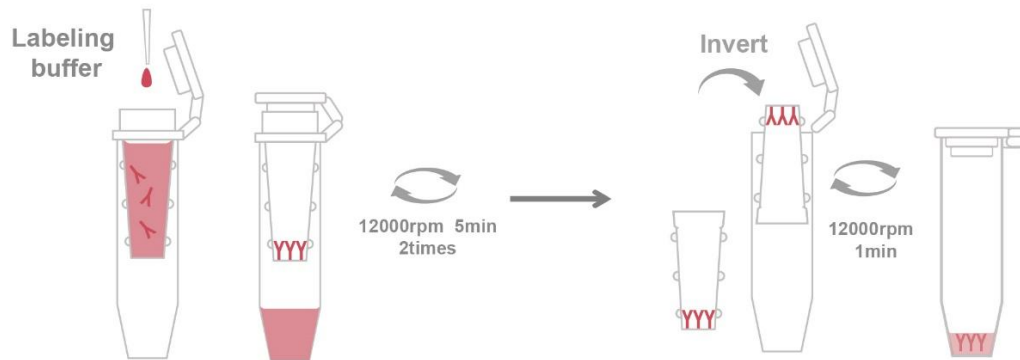
特别提示

A. 溶解的 FITC 最好一次性使用完，如果使用不完可以密封放在-20°C的冰箱内，一周内可以使用，但是标记效率会降低；

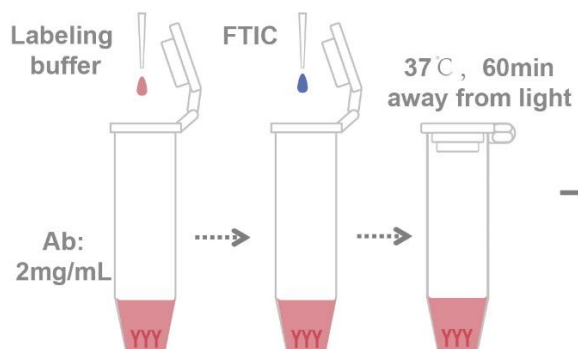
B. FITC 助溶剂使用完之后需要立即密封保存，防止吸潮。

·标记流程

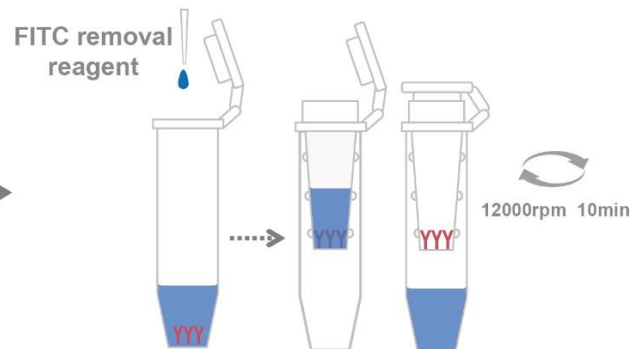
1. Replace the antibody buffer



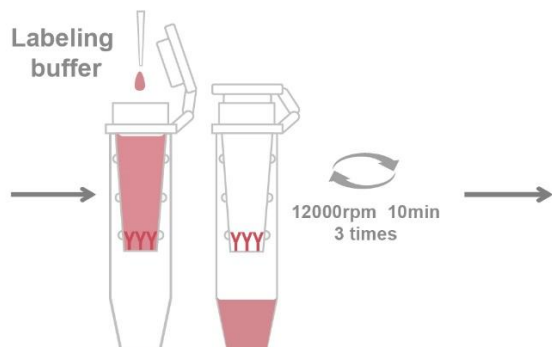
2. Labeling reaction



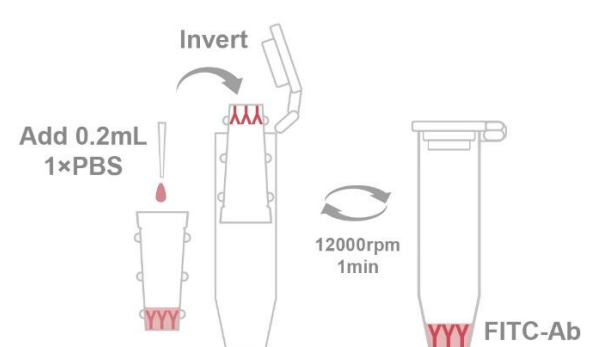
3. Add FITC removal reagent



4. Ultrafilter



5. Collect FITC-Ab



·标记步骤（本操作步骤按照 1 mg 抗体的量进行标记）

1. 取 1 mg 待标记抗体于超滤管中，并加入不超过超滤管最大体积的 Labeling Buffer, 12,000 rpm 离心 5 min; 重复一次上述步骤。然后将管芯倒置于外套管内，12,000 rpm 离心 1 min, 回收换液后的蛋白。

请注意:

- A. 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 0.5 mL。
 - 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. 向外管内补加 Labeling buffer 使抗体浓度为 2 mg/mL, 再加入溶解的 FITC 50 μ L 至上述超滤管中，并轻轻吹打混匀。放入 37°C 恒温箱中避光温育 60 min 以上。
3. 标记结束以后加入 1/10 体积的 FITC 清除指示剂至上述超滤管中，12,000 rpm 离心 10 min。
4. 加入适量 Labeling buffer 至上述超滤管中，并轻轻吹打混匀，12,000 rpm 离心 10 min。并重复操作多次，直至超滤管中没有蓝色，表明未标记的 FITC 被彻底清除干净；
5. 加 0.2 mL 1×PBS 至超滤管芯中，轻轻吹打。将超滤管倒置于另一个收集管（干净未参与反应的收集管）中，12,000 rpm 离心 1 min。收集管中得到的溶液，即为标记后的抗体。
6. 向标记后的抗体中加入保存液，-20°C 保存。

标记偶联比率的计算

$$F/P = \frac{MW}{389} \times \frac{A_{495}/195}{[A_{280} - (0.35 \times A_{495})]/E_{0.1\%280}} = \frac{A_{495} \times C}{A_{280} - (0.35 \times A_{495})}$$

$$\text{其中 } C = \frac{MW \times E_{0.1\%280}}{389 \times 195}$$

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 490 nm (PH13.0) 情况下 1 mg/mL 的吸光值。

(0.35×A₄₉₅)是 FITC 在 280 nm 情况下吸光值的校正系数。

E_{0.1%}是 1.0 mg/mL 的蛋白在 280 nm 的吸光值。

注意事项

1. 选购之前客户需要根据待标记物的分子量大小和标记量选择最适宜的型号。

最大标记体积	标记物最小分子量	可标抗体
0.5 mL	3 kDa	0.2 - 20 mg
4.0 mL	3 kDa	1.0 - 40 mg
15 mL	3 kDa	5.0 - 60 mg
0.5 mL	10 kDa	0.2 - 20 mg
4.0 mL	10 kDa	1.0 - 40 mg
15 mL	10 kDa	5.0 - 60 mg
0.5 mL	30 kDa	0.2 - 20 mg
4.0 mL	30 kDa	1.0 - 40 mg
15 mL	30 kDa	5.0 - 60 mg
0.5 mL	50 kDa	0.2 - 20 mg
4.0 mL	50 kDa	1.0 - 40 mg
15 mL	50 kDa	5.0 - 60 mg
0.5 mL	100 kDa	0.2 - 20 mg
4.0 mL	100 kDa	1.0 - 40 mg
15 mL	100 kDa	5.0 - 60 mg

2. 本试剂盒适用于所有含有 ϵ -氨基 (NH_2 -) 的大分子物质的标记, (蛋白, 抗体, 以及其他含有伯氨基 (NH_2 -) 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。

3. 本试剂盒中的 FITC 助溶剂为 DMSO , 使用完毕后要密封干燥保存。

4. 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。

5. 本试剂盒未开封前的有效期为 18 个月, 请在有效期内使用。

6. 本系列试剂盒提供的为超滤管分为不同的截留分子量和不同的最大容积, 客户需要根据自己要标记的物质的分子量大小和标记量选择适合的型号。