

# 快速FITC 抗体(蛋白)标记试剂盒

产品编号: MA0362 规格: 3T

## 产品内容:

产品组成	3T
FITC (异硫氰酸荧光素)	1mg*3
标记缓冲液	5ml
离心型纯化柱	6 套
2ml 离心管	6 个
纯化凝胶(50%)	12ml
说明书	1 份

## 产品简介:

美仑快速FITC 抗体(蛋白)标记试剂盒 (Quick FITC Antibody(protein) Labeling Kit)包含蛋白质标记染料和去除多余染料所需的全部组分。异硫氰酸荧光素 (FITC) 可以与蛋白质上的氨基, 巯基, 咪唑基, 酪氨酰基和羰基发生交联反应。然而, 只有伯胺和仲胺的衍生物才能产生稳定的标记产物。反应在pH 8-9下效率最高, 并且必须在无胺缓冲液如硼酸盐或碳酸盐/碳酸氢盐中进行。通常, 蛋白质与15至20倍摩尔数的FITC反应, 可导致几个FITC分子与一个蛋白质分子结合。装填有纯化树脂的离心柱简化了柱平衡、收集和监测重力流分的步骤。该系统能够有效去除多余的FITC, 从而准确测定染料与蛋白的比例 (F/P) 和蛋白浓度。

本试剂盒可用于标记和纯化3次1 mg (2mg/mL)或者6次0.5mg (2mg/mL)的IgG或其他蛋白质。

## 使用说明:

### A.蛋白质制备

注意: 如果标记缓冲液在储存期间沉淀, 则通过加热并涡旋使其溶解。

为获得最佳效果, 使用 1mg 蛋白质, 浓度为~2mg / mL。准备蛋白质如下:

- 在 PBS 中冻干的蛋白质: 在使用前, 用 0.5mL 标记缓冲液溶解 1mg 蛋白质。
- PBS 中的蛋白质: 可以直接用来标记。如果蛋白浓度 > 2mg/ mL, 则用标记缓冲液 (50mM 硼酸钠) 将浓度调节至 2mg/mL。

c. 其他缓冲液中的蛋白质：蛋白质必须在不含铵离子或伯胺（例如 Tris 或甘氨酸）的缓冲液中。如有必要，用 50mM 硼酸钠通过透析置换缓冲体系。

## B. 蛋白质标记

1. 将所有试剂置于室温下。

2. 向 FITC 试剂小瓶中加入 100ul DMSO, 并上下晃动 10 次，短暂涡旋直至所有染料溶解，此时 FITC 浓度为 10mg/ml。

注意：试剂必须完全溶解才能进行有效标记。

3. 向制备的 0.5mL 蛋白质溶液中加入 5ul 步骤 2 的 FITC 溶液（10mg/ml），上下晃动并短暂涡旋混匀。

4. 短暂离心，使样品汇集到收集管底部。

5. 将反应混合物在室温下避光孵育 60-120 分钟。

## C. 蛋白质纯化

1. 将两个离心型纯化柱底部的塑料塞拧下后，置于 2ml 收集管中。

2. 混匀纯化树脂，向两个离心型纯化柱内分别加入 600uL 悬液，可以通过弹击管壁的方法去除气泡。以~1,000×g 离心 30 秒以除去储存溶液。

3. 重复步骤二，加入悬液的同时重悬柱内的树脂，以~1,000×g 离心 30 秒再次去除纯化树脂的储存液，使之形成致密均一的纯化柱。丢弃用过的收集管并将柱子放入新的 2ml 圆底离心管中。

4. 向每个旋转柱中各加入 250-270 μL 标记反应物，注意不可吹起树脂。

5. 以~1000×g 离心柱 30-45 秒以收集纯化的蛋白质。合并两个离心管中的样品（总体积约 0.5mL），并丢弃使用过的离心柱。

6. 向标记的蛋白质添加 1%(w/v) BSA 和 0.02%(w/v)叠氮钠在 4° C 下避光可保存长达一个月。或者，将标记的蛋白质一次性分装避光储存在-20° C，避免反复冻融。

## D. FITC 与蛋白质比率计算

使用PBS对FITC标记物进行稀释，测量吸光度A280 和 A495

$$\text{Molar F/P} = \frac{2.77 * A_{495}}{A_{280} - (0.35 * A_{495})} \quad (\text{仅适用于FITC-IgG标记产物})$$

$$\text{IgG (mg/ml)} = \frac{A_{280} - (0.35 * A_{495})}{1.4} \quad (\text{仅适用于FITC-IgG标记产物})$$

其中1.4 是大多数IgG 在浓度为1.0 mg/ml（pH 7.0）的A280

3. 当用于除 IgG 以外的蛋白质标记，可以参考下列公式进行计算：

Molar F/P =

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

其中， $C = \frac{MW * E_{280}^{0.1\%}}{389 * 195}$  (C 是对某一蛋白质特有的常数)

MW 标记蛋白质相对分子质量.

389 FITC相对分子质量

195 结合  $E_{280}^{0.1\%}$  的 FITC 在 pH=13.0 时的  $A_{495}$

$A_{280} - (0.35 * A_{495})$  是对 A280 的吸光度校正

$E_{280}^{0.1\%}$  标记蛋白质在浓度为 1.0 mg/ml 的  $A_{280}$  (关于更多的  $E_{280}^{0.1\%}$  和 C 值，请参考表二)

## 保存条件

FITC 需要 -20°C 避光保存；其他组分 4°C 保存。

## 注意事项：

- FITC 对湿度敏感。即用即配 FITC 标记试剂并丢弃未使用的部分。
- 低浓度的叠氮化钠 ( $\leq 3\text{mM}$  或 0.02%) 或硫柳汞 ( $\leq 0.02\text{mM}$  或 0.01%) 不会显著干扰蛋白质标记；但是，20-50% 的甘油会降低标记效率。
- 避免使用含伯胺的缓冲液（例如 Tris，甘氨酸），因为它们与标记反应物竞争。

## 表一. 故障排除

问题	可能原因	解决办法
蛋白质没有标记	蛋白质缓冲液含有干扰标记的胺	通过透析或其他方法将缓冲液交换到 50mM 硼酸钠中
	FITC 变质	即用即准备标记试剂，不要将试剂存放在水溶液中

下游应用程序未成功	蛋白质没有标记	通过计算 FITC 与蛋白质的比率来确定蛋白质是否被标记
样品或缓冲液未流出	离心问题	确保离心机处于正常工作状态
产量低	离心不当	确保使用指定的离心速度
		在树脂顶部加入 40 $\mu$ L 合适的缓冲液, 重复离心步骤
	蛋白质不稳定	用 PBS 或其他合适的缓冲液平衡柱

表二. 相关参数

抗体	MW	$E_{280}^{0.1\%}$	C*
IgG1, IgG2	150,000	1.4	2.77
IgG3, IgG4			
IgA1, IgA2	160,000	1.32	2.78
IgD	165,000	1.7	3.70
IgE	185,000	1.53	3.73
IgM	900,000	1.18	14.0
F(ab') <sub>2</sub>	100,000	1.5	1.98
Fab'	50,000	1.5	0.99
Fc	50,000	1.2	0.79