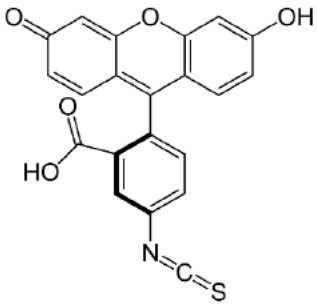
LinKine™ FITC 偶联试剂盒（尤其适合分子量为 6-20 KD 的样本）

Cat #: KTL0211 Size: 3×100 μg/1 mg

	FITC 偶联试剂盒（尤其适合分子量为 6-20 KD 的样本）		
REF	**货号：**KTL0211	LOT	**批号：**见产品标签
	适用样本：蛋白质、多肽及其它含游离氨基的配体		
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月		

原理

异硫氰酸荧光素（FITC）是荧光素衍生物，应用广泛例如流式细胞等；它由荧光素分子底环上的氢原子被异硫氰酸酯反应基团（-N=C=S）取代而形成，该衍生物可与亲核试剂反应，包括蛋白质的胺基和巯基。FITC 是制备绿色荧光偶联物最常用的荧光标记染料，其λEx/λEm 约为 492/520 nm。LinKine™ FITC Labeling Kit 可直接在蛋白质、多肽及其它含游离氨基的配体上标记 FITC。试剂盒中 Activated FITC solution 已预先活化，可直接用于偶联实验；LinKine™ FITC Labeling Kit 里的组分为即用型试剂，可直接用于 FITC 标记实验。



应用举例：偶联的直标一抗在免疫实验中无需二抗，免去繁琐的孵育和洗涤步骤，节省时间。

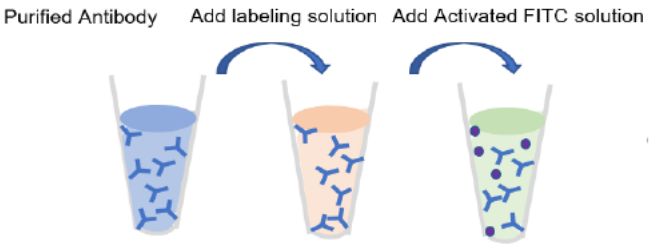


图 1：LinKine™ FITC Labeling Kit 原理图

包装清单

试剂盒组分	规格		储存条件
	3×100 μg	**1 mg**	
Activated FITC Solution	7.5 μL	25 μL	-20℃，避光保存
FITC Labeling Solution	15 μL	50 μL	-20℃保存
Purification Column (0.5 mL, 3 KD)	3	2	RT
说明书	1	1	RT

注意：该试剂盒所配纯化柱适用于分子量在 6 KD 到 20 KD 的样本。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

自备耗材

- 待标记样本
- 移液器和吸头
- 去离子水
- PBS (pH 7.4)

样本制备

待标记样本的初始浓度应高于 2 mg/mL，建议蛋白浓度达到 2.5 mg/mL 以上效果最佳，否则实验前需进行浓缩以提高浓度。待标记样本的组分（或储存缓冲液）应符合如下要求：

(1) 不含有氨基成分，否则会影响偶联效果。

(2) 少量 BSA 不会影响偶联效果，但建议使用 PBS 作为缓冲液。

(3) 若样本中含有可能干扰标记的物质，建议用 PBS 置换缓冲液，具体方法为：将样本加入超滤管中，加入 200-150 μL PBS，12,000 g、4℃、离心 10 min，弃掉滤液；再次补齐 PBS，12,000 g、4℃、离心 10 min；离心后取出超滤管内芯，倒置于干净外管中，4,000 g、4℃、离心 2 min，收集置换缓冲液后的样本。

待标记样本的缓冲液应满足如下要求：

PH	6.5-8.0
无胺缓冲液	MES，PBS，HEPES
螯合剂（e. g. EDTA）	✓可含有螯合剂
甘油（Glycerol）	含量 < 50%
牛血清白蛋白（BSA）	含量 < 0.1%
甘氨酸（Glycine）	✗不能含有
含氨基成分	✗不能含有

实验步骤

1. 偶联物制备

不同规格建议的最适标记样本量和标记体系如下：

试剂盒规格	最适标记的样本量	最适的标记体系
1 mg	1 mg	500-750 μL
3×100 μg	3×100 μg	3×50-3×75 μL

注意：请根据实际样品量，相应放大或缩小试剂盒各组分在反应体系中的体积。

以下操作步骤是以 3×100 μg 规格为例，其它规格的试剂用量请进行等比调整。如果需要调整体积，请保持样本量不变更改标记体系中 FITC labeling solution、Activated FITC solution 和去离子水的体积。

(1) 向待标记样本溶液中加入 15 μL FITC labeling solution，用移液器温和混匀。

(2) 吸取 7.5 μL Activated FITC solution 至步骤(1)反应液中，加去离子水至 150 μL（注：此体积为标记体系），温和混匀，37℃避光静置 1 h。

注：步骤(1)/(2)属于标记步骤。

(3) 向步骤(2)反应液中加入适量 PBS（定容至约 500 μL），温和混匀，将溶液移至纯化柱，12,000 g、4℃、离心 10 min。

(4) 弃滤液，加适量 PBS（定容至约 500 μL）到纯化柱，4℃、12,000 g、离心 10 min。

(5) 取出纯化柱倒置于干净离心管中，4℃、4,000 g、离心 2 min，离心管收集到的溶液即为偶联产物。

注：步骤(3)/(4)/(5)属于纯化步骤。

2. 偶联物储存

偶联产物 4℃避光条件下可稳定保存一个月。若需长期储存，请加入等体积甘油分装并于-20℃下避光保存，避免反复冻融。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.

结果计算

1. 偶联物浓度的计算：

C (mg/mL) = {[A_{280}-(A_{max}×CF)]/1.4}×稀释因子

其中： C 是指实验收集的偶联物浓度；稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数（详见备注）； A_{280} 和 A_{max} 分别是指在 280 nm 处的吸光度以及在最大吸收波长（FITC 的最大吸收波长为 492 nm）处的吸光度；CF 是校正因子，FITC 的 CF 值为 0.254；1.4 则是指 IgG（mL/mg）的消光系数，FITC 的消光系数为 7300。

2. 偶联物标记程度（degree of labeling, DOL）的计算:

DOL = (Amax×Mwt×稀释因子)/(ε×C)

其中：Amax 指在最大吸收波长处的吸光度（FITC 的最大吸收波长为 492 nm）；稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数；C 是指实验收集的偶联物浓度；Mwt 是指待标记样本的分子量；ε 是荧光染料的消光系数，FITC 的消光系数为 7300。

备注：过柱洗脱的偶联物直接用于吸光度检测可能浓度过大，因此需要稀释到适当浓度（蛋白测定仪的浓度范围）。稀释倍数（即稀释因子）需要从起始样本质量以及洗脱得到的偶联物的总体积来进行预估，如未经稀释则稀释因子为 1。

常见问题

问 1：浓缩后样本浓度仍低于 2 mg/mL?

答 1：如果浓缩后样本浓度仍小于 2 mg/mL 可适当调整标记体系的体积，但最终浓度应大于 1 mg/mL。步骤(1)中 FITC labeling solution 的体积应为标记体系体积的 10%，步骤(2)中可不添加去离子水，Activated FITC solution 的体积保持不变，您也可以根据自己实验进行适当调整。

问 2：待标记样本分子量大小不同，如何选择合适的纯化柱?

答 2：本产品配备的超滤管适用于分子量为 6 KD-20 KD 的样本。若您需要偶联的样本分子量大于 20 KD，为保证偶联最佳效果，需另行配备大小合适的超滤管。

问 3：待标记样本分子量与 FITC 相近?

答 3：如果样本分子量与 FITC 相近，可在进行完此说明书对应的标记步骤后加入 30 μL 0.5 μM NH_4Cl，37℃下孵育 10 min，以淬灭游离的 FITC，无须进行此说明书对应的纯化步骤。

注意事项

1. 不同批次号、不同的厂家的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
2. 混合或复溶组分时，避免产生气泡。如有未使用完的试剂，请及时密封保存于-20℃。
3. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。
4. 保持好的实验习惯，穿戴好手套、实验服、口罩、防目镜等防护工具后再开始实验。

相关产品

Catalog No.	Product Name
KTL0521	LinKine™ AbFluor™ 488 偶联试剂盒（尤其适合分子量 6-20 KD 的样本）
KTL0541	LinKine™ AbFluor™ 594 偶联试剂盒（尤其适合分子量 6-20 KD 的样本）
KTL0121	LinKine™ 生物素 偶联试剂盒（尤其适合分子量 6-20 KD 的样本）
KTL0531	LinKine™ AbFluor™ 555 偶联试剂盒（尤其适合分子量 6-20 KD 的样本）
KTL0561	LinKine™ AbFluor™ 647 偶联试剂盒（尤其适合分子量 6-20 KD 的样本）
KTL0581	LinKine™ AbFluor™ 680 偶联试剂盒（尤其适合分子量 6-20 KD 的样本）

免责声明

本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

Not for further distribution without written consent.Copyright © Abbkine, Inc.