

螢速標® FluProLab®

蛋白螢光素標記套組使用說明

Protein-NH2 Labeling Kit-Fluorescein

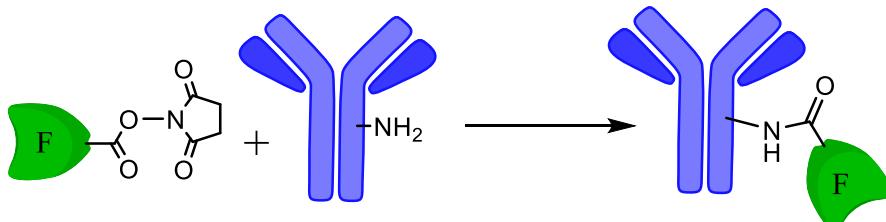
Product Information

快速使用指引

- 存放條件：在 4 °C冷藏下避光存放。正常存放條件下，本產品可存放逾一年。
- 試劑 A 開封後，請在-20 °C下，密封避光冷凍保存。
- 反應溫度與時間：37 °C / 10~30 分鐘。
- 螢光素須以 500 nm 光源激發，觀察 525 nm 螢光放光。

一、產品簡介

本套組以琥珀醯亞胺酯基(NHS ester)活化螢光素(Fluorescein)，用以標記抗體或蛋白，作為免疫染色或是細胞蛋白質示蹤之應用。活化過的螢光素，可直接與目標抗體蛋白或其他含一級胺(伯胺)基的大分子形成共價鍵。本套組包含離心透析管，以去除未反應的螢光素，和樣品中其他可能干擾的小分子，例如Tris緩衝液，和其他胺類化合物，這些物質會干擾檢測或標記反應。標記過程非常簡單：將NHS Fluorescein(試劑A)加入位於濾膜上方的蛋白質溶液中，並在37°C下孵育10-30分鐘。過量的未反應之螢光素分子可透過離心透析管去除。以螢光素標記後的蛋白，其激發波長和發射波長分別為500 nm和525 nm。此試劑盒包含標記所需的必要所有試劑，包括用於保存標記後的蛋白保存液。



圖一、琥珀醯亞胺酯基活化螢光素，標記抗體示意圖。

二、產品內容、運送與儲存：

名稱	說明	3 tests	運送&儲存
試劑 A	NHS-Fluorescein	綠標棕色塑膠管 X3	
試劑 B	沖洗緩衝液	4 mL · 紅標藍蓋半透明塑膠管 X1	
試劑 C	反應緩衝液	1 mL · 黃標白蓋半透明塑膠管 X1	
試劑 D	無水 DMSO	150 μL · 藍標綠蓋半透明塑膠管 X3	
試劑 E	蛋白保存液	1 mL · 紫標綠蓋半透明塑膠管 X1	
離心透析管		X3	4 °C 冷藏 避光

※本產品每一反應可標記分子量大於 50,000 之蛋白，重量約為 50-200 μg。

※收到本產品後，請取出試劑 A，在-20 °C密封避光冷凍保存。其餘試劑在 4 °C下保存即可。

※請勿以試劑 E 溶解蛋白，計算螢光素與蛋白標記比例(步驟 2.2.5)，試劑 E 會影響計算結果。請先使用試劑 B 溶解蛋白，計算出標記比例後，再進行步驟 2.2.6。

三、產品使用步驟：

1. 未提供實驗材料：

- 1.1 體積可調式單管移液槍。
- 1.2 細胞培養之培養箱。
- 1.3 微量離心管。
- 1.4 微量離心機。

2. 開始實驗：

2.1 實驗前注意事項：

- 2.1.1 若欲標記的蛋白溶液中含有分子量超過 10,000 之蛋白，如血清蛋白(serum albumin)、膠原蛋白(gelatin)...等，請務必純化此蛋白溶液，否則該干擾蛋白會影響標記反應進行。
- 2.1.2 假如欲標記之蛋白溶液含有不溶的物質，請離心後取上清液，進行標記。
- 2.1.3 從冷藏環境中取出本產品時，在本產品所附之離心透析管管壁，偶爾會出現凝結水珠，此為正常現象，並不會影響標記效果。

2.2 進行實驗：

2.2.1 置換蛋白溶液中的緩衝液：

欲標記之蛋白溶液中，其所使用之緩衝液，可能含有 Tris 等干擾物質，請移除。將 100 μL 的沖洗緩衝液(**試劑 B**)加入套組所附之離心透析管中，添加欲標記之蛋白溶液 25~100 μL (蛋白濃度勿超過 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，使欲標記之總蛋白濃度控制在 50-200 μg)。反覆抽吸數次，均勻混合兩溶液。在 $8000 \times g$ 下離心 10 分鐘。再次添加 100 μL 的沖洗緩衝液(**試劑 B**)，反覆抽吸數次，重新懸浮蛋白。在 $8000 \times g$ 下離心 10 分鐘，以完全去除干擾物質。

註 1：若離心後仍有溶液停留在透析膜上方，可再延長離心 5 分鐘。

註 2：若欲標記蛋白溶液的濃度過低，可重複此步驟，收集足夠(50-200 μg)之蛋白。

註 3：離心透析管下方的空間約為 300 μL 。請在下方液體液面快觸及內套管管底前，適時移除下方液體。

2.2.2 配置 NHS-Fluorescein 工作液：

取出本套組，在室溫下靜置 30 分鐘以上。吸取 100 μL 無水 DMSO(**試劑 D**)，加入 NHS-Fluorescein(**試劑 A**)管中，反覆抽吸和 vortex 數次，直到染劑完全溶解。NHS-Fluorescein 對水相當敏感，請立即進行以下標記反應步驟。未使用完之螢光素/DMSO 工作液請棄置，以隔夜或長時間未使用之工作液進行標記反應，可能會導致標記失敗。

2.2.3 進行標記反應：

將 100 μL 的反應緩衝液(**試劑 C**)加入步驟 2.2.1 之離心透析管中，反覆抽吸數次，重新懸浮蛋白。加入步驟 2.2.2 之染劑/DMSO 溶液 5-20 μL ，反覆抽吸數次，均勻混合兩溶液。在 37 度培養箱中，孵育 30 分鐘。

註 1：若欲標記之蛋白總量接近 200 μg ，可添加 20 μL 的螢光素/DMSO 工作液。視欲標記之蛋白總量，調整螢光素/DMSO 工作液添加的體積。

2.2.4 去除未反應之螢光素：

將 100 μL 的沖洗緩衝液(**試劑 B**)加入離心透析管中，反覆抽吸數次，均勻混合兩溶

液，在 $8000 \times g$ 下離心 10 分鐘。再次添加 200 μL 的沖洗緩衝液(試劑 B)，反覆抽吸數次，重新懸浮蛋白。此清洗步驟可反覆 2-3 次，確保未反應之螢光素，完全去除。

2.2.5 計算螢光素與蛋白標定比例：

添加 200 μL 沖洗緩衝液(試劑 B)，反覆抽吸十次以上，確保已標記之蛋白完全溶解，轉移此溶液到凍存管中(產品未提供)。測量此溶液在 280 nm 和 500 nm 的吸收度，以下列公式計算：

$$\text{每蛋白分子標定螢光素分子比例} = \frac{A_{500}/60,000}{(A_{280} - A_{500} \times 0.22)/\epsilon \text{ of protein}}$$

A_{500} ：螢光素在 500 nm 的吸光度。

A_{280} ：蛋白質在 280 nm 的吸光度。

ϵ ：蛋白質在 280 的消光係數。若此蛋白為 IgG，此數值為 216,000。螢光素的消光係數為 60,000。

註 1：因為蛋白保存液(試劑 E)含有微量的廣效抗菌劑，會影響吸收度測量，導致錯誤的計算結果。若您需計算螢光素與蛋白標記比例，請勿在此步驟使用蛋白保存液(試劑 E)回收已標記蛋白，請改用沖洗緩衝液(試劑 B)。

2.2.6 回收已標記之蛋白：

在離心後，透析膜上方無液體的狀態下，添加 200 μL 蛋白保存液(試劑 E)，反覆抽吸十次以上，確保已標記之蛋白完全溶解與懸浮，轉移此溶液到凍存管中(產品未提供)。

註 1：本套組提供之蛋白保存液(試劑 E)含有高濃度甘油(不含 NaN_3)，可在 -20 °C 下保存蛋白長達一年。若在 -80 °C 可存放更久。

註 2：您可以在此步驟使用您實驗室常用的蛋白保存劑與保存方法，或是，將此標記之蛋白分裝，以避免日後使用時，反覆凍融。

電話 Phone: 0926-159317

電郵 Email: polycreatives@outlook.com

聯絡人 Contact: Peter Hsu

