

## FITC 异硫氰酸荧光素

### 产品信息

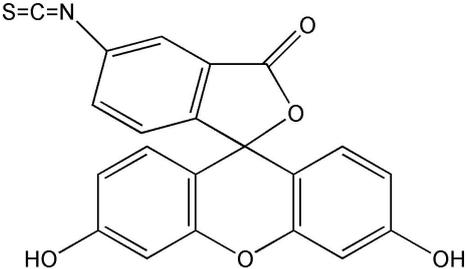
产品名称	产品编号	规格
FITC 异硫氰酸荧光素	60514ES60	100 mg
FITC 异硫氰酸荧光素	60514ES76	500 mg

### 产品描述

FITC, 英文全称 Fluorescein Isothiocyanate, 中文名称异硫氰酸荧光素, 具有高吸收率、优良的荧光量子产率和良好的水溶性等特点, 是生物学中应用最为广泛的一种绿色荧光素衍生物, 其异硫氰酸基团可与蛋白的氨基末端或者伯胺反应从而实现包括抗体, 凝集素在内的蛋白标记。除了用作蛋白质标记物, 还可用作蛋白质荧光示踪剂, 标记抗体用以快速鉴定病原体, 以及用于蛋白质和多肽 (HPLC) 的微量测序。FITC 为黄-橙色粉末, 最大激发波长为 494 nm。一旦激发, 在最大发射波长 520 nm 处呈黄-绿色荧光。

FITC 有两种异构体, 异构体 I (Isomer I) 和异构体 II (Isomer II), 二者在光谱性质上基本没有差异 (无论是波长还是光强度), 但是前者更易纯化, 所以相对便宜, 应用也较为广泛。对于大部分应用, 混合型的 FITC 已能很好的满足实验要求。本品 Isomer I 含量  $\geq 90\%$ , 适合用于蛋白质标记。

### 产品性质

英文别名 (English Synonym)	5-Fluoresceinisothiocyanate; Isothiocyanatobenzoic acid; 5-Isothiocyanatofluorescein;
CAS 号 (CAS NO.)	3326-32-7
分子式 (Formula)	$C_{20}H_{11}O_5 \cdot NCS$
分子量 (Molecular Weight)	389.4
熔点 (Melting Point)	$> 360^\circ C$
外观 (Appearance)	橙色固体
Ex/Em	494/520 nm
纯度 (Purity)	$\geq 90\%$
溶解性 (Solubility)	溶于丙酮 (1mg/ml)、DMSO (5mg/ml)、乙醇, 微溶于水 ( $< 0.1mg/ml$ )
结构式 (Structure)	

### 运输和保存方法

冰袋运输。4°C 干燥避光保存, 2 年有效。

### 注意事项

为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用方法

### 1. 标记蛋白

1) 制备溶于 0.1 M 碳酸钠缓冲液 (pH 9) 的待交联蛋白样品, 浓度 $\geq 2$  mg/mL。

**【注】:** a) 勿将碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液存放于 0-5°C 超过 1 周, 其 pH 值会发生变化, 建议现配现用。

b) 待标记的蛋白必须是未被污染蛋白, 且溶解蛋白的缓冲液里不能含有叠氮钠或胺类试剂, 如 Tris、甘氨酸, 因为这些试剂会抑制标记反应。如果缓冲液里含有上述试剂, 则需将该蛋白溶液在 4°C 下于 PBS, pH 7.4 透析过夜; 透析过程中如果 pH 值过高 (>8.0-8.5) 会损害某些蛋白。

2) 溶解 FITC 于无水 DMSO 配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液。

**【注】:** 于标记实验前新鲜配置 FITC 溶液, 避光。

3) 对于 1 mL 蛋白溶液加入 50  $\mu$ L FITC 溶液, 可按照每次 5  $\mu$ L 的量边加边轻轻搅拌蛋白溶液;

4) 待所需 FITC 加入完毕, 将反应液于 4°C 避光孵育 8 h;

5) 加入  $\text{NH}_4\text{Cl}$  使其终浓度至 50 mM, 4°C 终止反应 2 h;

6) 加入二甲苯青至浓度 0.1%, 甘油至浓度 5%;

7) 通过大小孔径合适的凝胶过滤层析分离排除未被结合的 FITC, 分离范围在 20, 000 至 50, 000 (球蛋白例如抗体)。待凝胶柱平衡后, 将以上反应混合液从柱顶注入, 打开凝胶柱, 待其全部流入柱床后, 加入 PBS 缓冲液。

此时, 可以形成两条带: a, 快速移动带, 也就是 FITC-蛋白偶联物, 先被洗脱, 通常于室内光下可看到; b, 慢速移动带, 也就是未结合蛋白的 FITC 和二甲苯青。仅仅在 PBS 缓冲液清洗后被洗脱出来。

8) 于 4°C 避光储存上述偶联物, 加入 0.1% (w/v) 叠氮化钠作为一种防腐剂。若蛋白浓度较低 (<1 mg/mL), 可加入 1% BSA 作为一种蛋白稳定剂。

9) 偶联物中荧光素和蛋白的比值 (F/P) 可通过测定 495 nm 和 280 nm 处的吸光值来鉴定, F/P 应位于 0.3-1.0。小于该比例则信号太低, 高于该比例则背景太高。

### 2. 荧光素/蛋白摩尔比 (F/P) 的测定

F/P 摩尔比即荧光素蛋白偶联物中 FITC 与蛋白质的摩尔比。为了计算该值, 首先需测定该偶联物在 280nm 和 495nm 的吸光值: 将已标记蛋白样品置于石英比色皿中, 测得  $A_{280}$  和  $A_{495}$ , 注意  $A_{280}$  的值需在 0.2-1.4 之间, 如在该范围外, 需调整相应标记样品浓度。

#### 2.1 对 FITC-IgG 标记物

F/P 摩尔比计算公式为:  $\text{Molar F/P} = [2.77 \times A_{495}] / [A_{280} - (0.35 \times A_{495})]$

FITC-IgG 偶联物浓度计算公式为:  $\text{IgG (mg/ml)} = [A_{280} - (0.35 \times A_{495})] / 1.4$

**【注】:** 该处 1.4, 指的是大多数物种 IgG 以浓度为 1mg/ml 在 pH7.0 的条件下测得的  $A_{280}$  为 1.4。

#### 2.2 对于其他 FITC-蛋白质 (非 IgG) 偶联物

F/P 摩尔比计算公式为

$$\text{Molar F/P} = \frac{\text{MW}}{389} \times \frac{A_{495}/195}{[A_{280} - (0.35 \times A_{495})] / E^{0.1\%}} = \frac{A_{495} \times C}{A_{280} - (0.35 \times A_{495})}, \quad \text{此处,} \quad C = \frac{\text{MW} \times E^{0.1\%}_{280}}{389 \times 195}$$

**【注】:** C 对一种蛋白质而言是一常数;

MW 是蛋白质分子量;

389 是 FITC 的分子量;

195 是 FITC 偶联物在 pH13, 490 nm 处的吸光值  $E^{0.1\%}$ ;

$(0.35 \times A_{495})$  是基于 FITC  $A_{280}$  的校正因子;

$E^{0.1\%}$  是某一蛋白 (1.0 mg/mL) 在 280 nm 处的吸光值