异硫氰酸荧光素酯 说明书

货号：IF0080

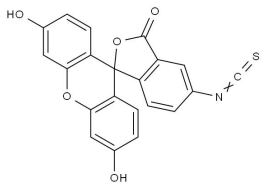
保存：Powder:2-8℃，2 years;Insolvent(母液):-20℃，6 months;-80℃，1 year

产品简介

异硫氰酸荧光素酯（FITC），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 能与各种抗体蛋白结合，结合后的抗体不丧失与一定抗原结合的特异性，并在碱性溶液中仍有强烈绿色荧光，加酸后析出沉淀，荧光消失，微溶于丙酮、乙醚和石油醚。

产品参数



Ex/Em：488nm/525nm

CAS：3326-32-7

分子式：$C_{21}H_{11}NO_5S$

分子量：389.38

纯度：HPLC≥97%

外观：Light yellow to orange Solid

溶解性：Soluble in DMSO ≥10mg/mL;Soluble in Ethanol ≥1mg/mL;Soluble in Water ＜1mg/mL

使用说明（仅供参考）

制备 1mg/mL 的 FITC 溶液

用无水 DMSO 配制 1mg/mL 的 FITC 溶液。例如：取 1mg FITC 粉末于 1mL 无水 DMSO 中，得到 1mg/mL 的 FITC 溶液。

注：a. FITC 要现配现用，避光。

b.未使用的储存液建议分装储存在-20℃，避免反复冻融

c. 发现较难溶解时可以用超声处理或适当加热以促进溶解

d. 吸湿的 DMSO 对产品的溶解度有显著影响，请使用新开封的 DMSO

标记蛋白

1. 制备溶于 0.1M 碳酸钠缓冲液（pH9）的待交联蛋白样品，浓度≥2mg/mL。

注：a 勿将碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液存放于 0-5℃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℃下于 PBS，pH7.4 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. 对于 1mL 蛋白溶液加入 50μL FITC 溶液，可按照每次 5μL 的量边加边轻轻搅拌蛋白溶液；
3. 待所需 FITC 加入完毕，将反应液于 4℃避光孵育 8h；
4. 加入 NH_4Cl 使其终浓度至 50mM，4℃终止反应 2h；
5. 加入二甲苯青至浓度 0.1%，甘油至浓度 5%；
6. 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。
7. 于 4℃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（<1mg/mL），可加入 1%BSA 作为一种蛋白稳定剂。
8. 偶联物中荧光素和蛋白的比值（F/P）可通过测定 495nm 和 280nm 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。

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 A280 和 A495，注意 A280 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。

1. 对 FITC-IgG 标记物

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

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

【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. 对于其他 FITC-蛋白质（非 IgG）偶联物

F/P 摩尔比计算公式为：

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

此处，$C=MW*E^{0.1\%}{}_{280}/(389*195)$

注：C：对一种蛋白质而言是一常数；

MW：蛋白质分子量；

389：FITC 的分子量；

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

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

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

注意事项

1. FITC 对光及湿度敏感。即用即配 FITC 溶液并丢弃未使用的部分。
2. 低浓度的叠氮化钠 (≤3 mM 或 0.02％) 或硫柳汞 (≤0.02 mM 或 0.01％) 不会显著干扰蛋白标记；但是 20-50％ 的甘油会降低标记效率。
3. 避免使用含伯胺 (例如 Tris，甘氨酸) 或铵离子的缓冲液，它们与待标记蛋白竞争反应。

4. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
6. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。请勿存放于普通住宅区。

相关产品

IH0060 Hoechst 33258

IH0070 Hoechst 33342

ID2250 DAPI dihydrochloride

IP5030 碘化丙啶

IE31207 溴化乙锭(1mg/ml in DMSO)