

异硫氰酸荧光素酯 FITC

货号: F8070

规格: 50mg

保存: -20℃保存, 有效期1年。

产品参数:

CAS: 3326-32-7

英文名称: FITC; Fluorescein-5-isothiocyanate

分子式: C₂₁H₁₁NO₅S

分子量: 389.38

外观(性状): 橘黄色粉末

纯度: ≥90%

级别: Conjugation Grade

溶解性: 5mg/ml in DMSO

危险代码: R: 42/43 S: 22-36/37-45

Ex/Em: 491/516 nm

产品说明:

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。

使用说明(仅供参考):

一、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. 溶解FITC于无水DMSO配制成浓度为1mg/mL的溶液。

【注】: 于标记实验前新鲜配置FITC溶液, 避光。

3. 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;





- 待所需 FITC 加入完毕，将反应液于 4°C 避光孵育 8h；
- 加入 NH₄Cl 使其终浓度至 50mM，4°C 终止反应 2h；
- 加入二甲苯青至浓度 0.1%，甘油至浓度 5%；
- 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。
- 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 (<1mg/mL)，可加入 1%BSA 作为一种蛋白稳定剂。
- 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。

二、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：
$$\text{Molar F/P} = \frac{2.77 \times A_{495}}{A_{280} - (0.35 \times A_{495})}$$

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

【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 A₂₈₀ 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：

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

【注】：C：对一种蛋白质而言是一常数；

MW：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×A₄₉₅)：基于 FITC A₂₈₀ 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：

- 产品信息仅供参考，如有疑问请致电 400-968-6088 咨询。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。

