

Fluorescein Isothiocyanate Isomer I (FITC) 异硫氰酸荧光素

产品编号	产品名称	包装规格
NBS7601-100mg	Fluorescein Isothiocyanate Isomer I (FITC)	100mg
NBS7601-500mg	Fluorescein Isothiocyanate Isomer I (FITC)	500mg
NBS7601-1g	Fluorescein Isothiocyanate Isomer I (FITC)	1g
NBS7601-5g	Fluorescein Isothiocyanate Isomer I (FITC)	5g

产品简介:

异硫氰酸荧光素 (Fluorescein Isothiocyanate), 缩写 FITC, 是生物学应用最广泛的一种绿色荧光素衍生物, 其异硫氰酸基团能与蛋白上的氨基末端和首胺反应, 从而将荧光素标记到蛋白上, 包括抗体和凝集素。FITC 的生物应用包括蛋白的荧光标记, 蛋白的荧光示踪, 以及荧光抗体的病原体快速鉴定技术。FITC 的最大吸收波长为 495nm, 呈黄-橙色; 最大发射波长为 525nm, 呈黄-绿色。

本品为 FITC 的 I 型异构体 (Isomer I), 纯度 $\geq 95\%$, 适用于蛋白标记。

产品特性:

- 1) CAS NO: 3326-32-7
- 2) 同义名: Fluorescein isothiocyanate isomer I; Fluorescein 5-isothiocyanate;
- 3) 分子式: $C_{21}H_{11}NO_5S$
- 4) 分子量: 389.38g/mol
- 5) 外观: 橙色粉末
- 6) 纯度: $\geq 95\%$ (HPLC)
- 7) Ex/Em: 492/518 nm
- 8) 溶解性: 溶于丙酮 (1mg/ml), DMSO (5mg/ml), 微溶于水 ($< 0.1\text{mg/ml}$)

保存条件:

2-8°C 干燥避光保存, 有效期 2 年。

产品使用：

1. FITC 标记蛋白

1) 制备溶于 0.1M 碳酸钠缓冲液 (pH 9.0) 的待标记蛋白溶液, 浓度 $\geq 2\text{mg/ml}$ 。

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

【注意】：待标记蛋白必须是未被污染蛋白, 且蛋白溶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 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 1mg/ml 的溶液。

【注意】：建议于每次标记实验前新鲜配置 FITC 溶液, 避光保存。

3) 对于 1ml 蛋白溶液加入 50 μl FITC 溶液, 可按照每次 5 μl 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 8h;

5) 加入 NH_4Cl 使其终浓度至 50mM, 4°C 终止反应 2h;

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-蛋白标记物, 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 ($< 1\text{mg/ml}$), 可加入 1% BSA 作为一种蛋白稳定剂。

9) 标记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。

2. 荧光素/蛋白摩尔比 (F/P) 的测定

F/P 摩尔比即蛋白荧光标记物中 FITC 与蛋白质的摩尔比。为了计算该值, 首先需测定该标记物在 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。

注意事项：

1. FITC 有两种异构体: 异构体 I 和异构体 II, 前者的异硫氰酸基团连接在苯环的 C4 位置,

后者的异硫氰酸基团连接在苯环的 C5 位置, 两种异构体在光谱上如波长或强度上难以区分。然而, 异构体 I 比较容易分离和纯化, 因此成本比较低, 这也是为什么异构体 I 更普遍用于标记用的原因。FITC 的两种异构体混合物适合大部分实验。

2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究, 不得用于医学诊断及其他用途!