



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

异硫氰酸荧光素 说明书

产品描述

异硫氰酸荧光素 FITC, 英文全称 Fluorescein Isothiocyanate, 是生物学中应用最为广泛的一种绿色荧光素衍生物。FITC 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。FITC 的异硫氰酸基团可与蛋白质上的氨基、巯基、咪唑、酪氨酰、羰基等基团相结合, 从而实现包括抗体, 凝集素在内的蛋白标记。FITC 除了用作蛋白质标记物, 还可用作蛋白质荧光示踪剂, 通过标记抗体而快速鉴定病原体, 或是用于蛋白质和多肽 (HPLC) 的微量测序。FITC 的最大激发波长为 494 nm。一旦激发, 在最大发射波长 520 nm 处呈黄-绿色荧光。

原液制备

1. 蛋白准备

为了获得最佳标记效果, 请将蛋白 (抗体) 浓度配制为 1 mg/mL。

- 1) 蛋白溶液 PH 值应为 8.5 ± 0.5 , 若 pH 低于 8.0, 则用 1 M 碳酸氢钠进行调整。
- 2) 若蛋白浓度低于 1 mg/mL, 标记效率会大大降低, 为了获得最佳标记效率, 建议最终蛋白质浓度范围为 1-10 mg/mL。
- 3) 蛋白必须在不含伯胺 (如 Tris 或甘氨酸) 和铵离子的缓冲液中, 否则会影响标记效率。

2. 染料准备

将无水二甲基亚砷加入 FITC 小瓶中, 制成 10 mM 储备溶液, 震荡摇匀。

注: FITC 要现配现用, 避光。

3. 染料用量计算

标记反应所需的 FITC 用量取决于要标记蛋白的用量, FITC 与蛋白的最佳质量比为 1:50 左右。

例: 假如所需标记蛋白 1 mL, 2mg/mL 的 IgG (MW=150,000), 用 1 mL DMSO 溶解一管 1 mg FITC, 则所需 FITC 体积为 40 μ L。

计算公式:

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

注:

C: 一种蛋白质常数; MW: 蛋白质分子量; 389: FITC 的分子量; 195: FITC 偶联物在 pH=13, 490 nm 处的吸光值 $E^{0.1\%}$; $(0.35 * A_{495})$: 基于 FITC A280 的校正因子; $E^{0.1\%}$: 蛋白 (1.0 mg/mL) 在 280 nm 处的吸光值。

使用说明

1. 标记反应

- 1) 取算好体积的新鲜配制的 50 μ L FITC 缓慢加入到 1 mL 蛋白样品溶液中, 轻轻摇匀混合, 然后短暂离心将样品收集在反应管底部。切忌剧烈混匀, 防止蛋白样品变性失活。
- 2) 将该反应小管置于避光处, 在室温条件下轻轻摇晃孵育 8 h, 每隔 30 分钟, 将反应小管轻轻颠倒几次, 以充分混合两种反应物, 提高标记效率。
- 3) 加入 5 M 的 NH_4Cl 至终浓度 50 mM, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应 2 h。

2. 蛋白纯化脱盐



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

以下方案以使用 Sephadex G-25 柱纯化染料蛋白偶联物为例。

- 1) 按照生产说明书制备 Sephadex G-25 柱。
- 2) 将反应混合物装入 Sephadex G-25 色谱柱顶部。
- 3) 当样品运行到顶部树脂表面下方时, 立即加入 PBS (pH 7.2-7.4)。
- 4) 向所需样品中加入更多的 PBS (pH 7.2-7.4), 完成柱纯化。结合物含有所需要的染料-蛋白质缀合物的组分。

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. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
5. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

