



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

异硫氰酸荧光素

货号: S19127

储存条件: 2-8℃, 避光

有效期: 36个月

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。

产品特性

Ex/Em: 492/518 nm

溶解性:溶于丙酮(1mg/ml), DMSO(5mg/ml), 微溶于水(<0.1mg/ml)

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。

使用方法

1.FITC标记蛋白

制备溶于0.1M碳酸钠缓冲液(pH9.0)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℃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℃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50ul FITC溶液, 可按照每次5μl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℃避光孵育8h;

5)加入NH₄Cl使其终浓度至50mM, 4℃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℃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。

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, 高于该比例测背景太高。

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。