

## Fluorescein Isothiocyanate Isomer I (FITC)

### 异硫氰酸荧光素

#### 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≥90%，适用于蛋白标记。

#### 产品组成

名称	编号	FS1217	FS1217	Storage
Fluorescein Isothiocyanate Isomer I (FITC) 异硫氰酸荧光素		100mg	500mg	4°C干燥避光保存
使用说明书		1 份		

#### 基本特性

CAS: 3326-32-7

同义名: Fluorescein isothiocyanate isomer I; Fluorescein 5-isothiocyanate; 5-FITC (isomer I); 荧光素异硫氰酸酯异构体 I; 荧光素 5-异硫氰酸酯;

分子式:  $C_{21}H_{11}NO_5S$

分子量: 389.38 g/mol

纯度: ≥95% (HPLC)

外观: 黄色至橙色或黄棕色粉末

Ex/Em: 495/520 nm

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

储存条件: 2-8°C 密封干燥避光保存，有效期二年。

#### 使用方法

##### 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≥2mg/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 50μl 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 NH<sub>4</sub>Cl 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<sub>280</sub> 和 A<sub>495</sub>, 注意 A<sub>280</sub> 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。

### D 仅对 FITC-IgG 标记物

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

FITC-IgG 标记物浓度计算公式为:  $\text{IgG (mg/ml)} = [A_{280} - (0.35 \times A_{495})] / 1.4$  **【注意】** 此处 1.4, 指的是大多数物种 IgG 以浓度为 1mg/ml 在 pH 7.0 的条件下测得的 A<sub>280</sub> 为 1.4。

### 2) 其他 FITC-蛋白质 (非 IgG) 标记物

F/P 摩尔比计算公式为

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

**【注意】**: C 对一种蛋白质而言是一常数;

Mw 是蛋白质分子量;

389 是 FITC 的分子量;

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

( $0.35 \times A_{495}$ ) 是基于 FITC A280 的校正因子;

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

## 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) 本品对光、湿度和热敏感, 请注意密封干燥、避光和低温保存。

3) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。