

产品说明书

产品名称: Sulfo-Cy5-E Maleimide

产品规格: 1 mg

产品货号: BN10068

应用范围: 荧光标记染料、巯基标记染料

产品参数

外观: 可溶于水、DMSO 或 DMF 的黑绿色固体

Ex/Em: 647/665 nm

分子量: 879.12

消光系数: 250,000

可用于替代: Alexa Fluor 657, TRITC, DyLight 640 等

贮存条件

-20℃避光保存, 可以储存 12 个月

产品介绍

花菁染料 Sulfo-Cy5-E 是一种远红外荧光标记染料, 该染料具有高度亲水性和水溶性, 含有游离的、未活化的单官能团羧酸。而 Sulfo-Cy5-E Maleimide 是 Sulfo-Cy5-E 染料的硫醇反应形式。Maleimide 与硫醇基团反应形成硫醚偶联产物。反应可以在 pH=7 的胺中进行。在中性 pH 环境中, Maleimide 基团不与组氨酸或精氨酸反应。

菁染料是性能优良的荧光染料, 摩尔吸光系数在荧光染料中是无可比拟的, 其琥珀酰亚胺酯是常用的脂肪氨基标记试剂, 广泛用于蛋白、抗体、核酸及其他生物分子的标记和检测。通过改变次甲基链的长度, 可改变其荧光发射波长, 每增加一个双键, 按照 Huoffman 规则正好红移约 100 nm。

水溶性菁染料 Cy3 和 Cy5 已成为基因芯片的普遍荧光标记物; 另外, Cy5, Cy5.5 和 Cy7 的吸收在近红外区背景非常低, 是荧光强度高、稳定性较好的长波长染料。特别适合于活体小动物体内成像代替放射性元素。

使用方法 (以标记IgG抗体为例)

1. 实验材料

- 无水 DMSO
- 10-100 mM 磷酸盐 (例如 PBS), Tris 或 HEPES 缓冲液, pH 7.0-7.5
- 交联葡聚糖 G-25
- (可选) 用 Tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) 还原蛋白质中二硫键以产生游离巯基。
- NaN₃, BSA

2. 标记方法和步骤

2.1 准备标记抗体

a) 在室温下, 将抗体溶于缓冲液中, 使终浓度为 50-100 μM (IgG 为 7.5-15 mg/mL)。

b) 任选步骤: 如果要让蛋白质中的二硫键释放出更多的硫醇基团, 则可以在此阶段加入约 10 倍摩尔数的过量的 TCEP。将反应溶液孵育约 30 min。还原反应和随后的标记反应最好在惰性气体 (N₂ 或 Ar) 存在下进行, 以防止二硫键重新形成。

2.2 准备染料储备液

取出 Sulfo-Cy5-E Maleimide 染料, 恢复至室温。制备 10 mM 染料储备液。对于 1 μmol 染料: 向小瓶中加入 100 μL 无水 DMSO 即可。短暂涡旋, 完全溶解染料, 然后进行短时间离心, 使染料集中于管子底部。

注: 1) 如果要用少量的蛋白质进行标记反应, 染料储备液可能需要稀释至更低浓度, 以保证量取体积的准确性。

2) 未使用的储备液可避光、干燥储存于 -20℃, 以备后续使用。

如果使用无水 DMSO 制备溶液, 染料可稳定至少一个月。

3) 染料储备溶液也可以用 dH₂O 或含水缓冲液中制备。然而, 因为染料会随着时间的推移而水解, 所以水溶性的储存液需要现配现用, 不能保存后再使用。

2.3 标记反应步骤

a) 在搅拌或涡旋蛋白质溶液的同时, 加入一定量的染料储备溶液, 以产生染料、蛋白摩尔比为 10-20 的混合液。例如, 对于 50 μM 的 IgG, 应添加染料至染料最终浓度为 0.5-1 mM。

b) 在室温下避光搅拌反应 2 h 或 4℃ 过夜。

注: 进行标记反应的同时, 进行步骤 2.4a 制备葡聚糖柱。

2.4 从反应液中分离标记蛋白

a) 用 PBS 缓冲液 (pH~7.4) 平衡葡聚糖柱 (10 mm × 300 mm)。

b) 将步骤 2.3b 中的反应溶液装载到柱上, 并用 PBS 缓冲液洗脱柱。从柱中洗脱的第一条带对应于抗体缀合物。

注: 对于小规模标记反应, 为了避免产物过度稀释, 可以使用超滤装置去除结合物中游离染料。10K 超滤管可用于 IgG 蛋白; 具有不同分子量的蛋白需要不同的超滤管。

3. 确定 DOL

3.1 确定蛋白浓度

染料标记的抗体浓度可通过以下公式计算:

$$C(\text{mg/mL}) = \{[A_{280} - (A_{\text{max}} \times C_f)] / 1.4\} \times \text{稀释因子}。$$

■ C 是指实验收集的 YF 标记的抗体浓度;

■ 稀释因子是指在吸光度测量时的稀释倍数;

■ A₂₈₀ 和 A_{max} 分别是指在 280 nm 处的吸光度以及在最大吸收波长 (~647 nm) 处的吸光度;

■ C_f 是校正因子, Sulfo-Cy5-E Maleimide 的 C_f 值为 0.13;

■ 1.4 则是指 IgG (mL/mg) 的消光系数;

注: 过柱洗脱的蛋白溶液直接用于吸光度检测可能浓度过大, 因此需要稀释到大约 0.1 mg/mL。稀释倍数 (即稀释因子) 需要从起初抗体数量 (比如 5 mg) 以及收集的洗脱蛋白液的体积来进行预估。

3.2 DOL 的估算

DOL 通过下式计算:

$$\text{DOL} = (A_{\text{max}} \times \text{Mwt} \times \text{稀释因子}) / (\epsilon \times C)$$

■ A_{max}, 稀释因子, C 值在 3.1 中已经明确;

■ Mwt 是指 IgG 的分子量 (~150,000);

■ ε 是 Sulfo-Cy5-E Maleimide 的摩尔吸光系数/消光系数。

注意事项

1. 产物如需长期储存, 我们建议添加 BSA 和 NaN₃, 并使其终浓度分别为 5-10 mg/mL 和 0.01-0.03%, 以防变性和微生物污染。

2. 标记好的抗体溶液应 4℃ 避光保存。如果加入终浓度为 50% 的甘油, 则可储存在 -20℃。在这些条件下, 产物可稳定保存一年或更长时间。