

产品说明书

产品名称: Cy5.5-E SE [Cyanine 5.5-ethyl, succinimidyl ester]

产品货号: BN15076

产品规格: 1 mg

应用范围: 荧光标记染料

产品参数

外观: 可溶于无水 DMSO, DMF 的绿色固体

Ex/Em: 675/690 nm

贮存条件: -20°C 避光保存

保质期: 12 个月

分子量: 822

消光系数: 210,000

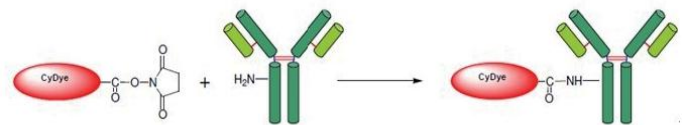
可用于直接替代: Alexa Fluor 680 等

产品介绍

菁染料是一类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 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, 是荧光强度较高、稳定性较好的长波长染料。特别适合于小动物活体成像, 代替放射性元素。

菁染料和生物分子的比例在 F/P=4~12 之间时荧光强度较好, F/P 值过高荧光探针会自我淬灭并影响生物分子的生物活性, 标记生物分子常使用单琥珀酰亚胺酯, 但是用双琥珀酰亚胺酯修饰的 Cy Dye SE 并没有发现交联。Cy Dye SE 标记抗体在 pH (8.5~9.4) 时 10 分钟 F/P 可达 5~6, 而在 pH 7.0 时几乎不反应。我们用不同比例的 Cy3 标记 anti-glutathione-S-transferase (GST) 多克隆抗体发现用 1:1、5:1、10:1 和 20:1 标记时得到的 F/P 值分别是 0.28:1、1.16:1、



2.3:1 和 4.6:1。

菁染料琥珀酰亚胺酯(Cy Dye SE)的标记

操作方法

1. Cy5.5-E SE 标记蛋白 (常规方法)

(1) 制备染料储存液

室温预热一管 1 mg 的 Cy5.5-E SE, 在管中加入 0.122 mL 的无水 DMSO 或 DMF (不含胺), 配制浓度为 10 mM 的染料储存液。适当条件下, 可以涡旋以便充分溶解染料。如果使用更微量的蛋白进行标记反应, 那么染料需要稀释至更低浓度。

注: 剩余的染料储存液应于 -20°C 低温存放, 以备后续使用。如果使用无水 DMSO 配制染料储存液, 那么染料至少可以保存一个月。

(2) 计算染料用量

$$\text{Cy5.5-E SE 染料用量 [mg]} = 8 \times \text{标记蛋白质量} \times \text{Cy5.5-E SE 染料分子量} / \text{标记蛋白分子量}$$

■ 8, 染料蛋白摩尔比, 是一个实验经验值, 适用于常规的蛋白、多肽标记;

(3) 确定反应体积

染料标记可以在不同标记规模下进行, 从 nmole 到 g 水平均可, 当标记量较少时, 采用小体积进行 (如 10-20 μL), 蛋白浓度控制在 1-10 mg/mL 效果较好。

(4) 用 1/10 体积的 DMF 或无水 DMSO 溶解反应所需的

Cy5.5-E SE 染料。

(5) 用 9/10 体积的 pH 8.3-8.5 的缓冲液重悬待标记蛋白。推荐使用 pH 8.3 的 0.1 M 碳酸氢钠溶液，或者 0.1 M 磷酸盐缓冲液。注意 pH 控制在 8.3-8.5 之间。避免使用含有胺的缓冲液（有时可以使用 Tris，但不推荐使用）。

注意：当进行大规模标记（几百毫克 SE 酯）时，注意到由于 SE 酯的水解，混合物随时间趋于酸化。需要监测 pH 值，或使用更浓的缓冲液。

(6) 将染料加入蛋白溶液中，并涡旋混匀，冰上过夜或室温反应至少 4 h。

(7) 选用适当方法纯化染料-蛋白共轭物

凝胶过滤是一种普遍使用的大分子物质纯化方法，另外，也可以选择沉淀或色谱法分离提纯，针对蛋白或核酸的纯化，也可选择乙醇或丙酮沉淀的方法。

(8) 计算染料-蛋白共轭物浓度，F/P 值

染料-蛋白共轭物浓度的确定可通过以下公式计算：

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

- C 是指染料-蛋白共轭物浓度；
- 稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数；
- A_{280} 和 A_{max} 分别是指在 280 nm 处的吸光度以及在最大吸收波长处的吸光度；
- C_f 是校正因子；

■ ϵ 则是指蛋白 (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）以及蛋白液洗脱的总体积来进行预估。

F/P 计算：

如 Cy5.5 在 678 nm 的摩尔吸光系数为 250000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，所用蛋白在 280 nm 处的摩尔吸光系数为 170000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ；Cy5.5 在 280 nm 处的吸收是 678 nm 处的 18%。按以下公式计算 F/P 值。

$$[\text{Cy5.5 dye}] = (A_{678})/250000$$

$$[\text{peptide}] = [A_{280} - (0.18 \times A_{678})]/170000$$

$$\text{F/P final} = [\text{dye}]/[\text{peptide}]$$

$$= \{0.68 \times A_{678}\} / \{A_{280} - (0.18 \times A_{678})\}$$

注意事项

1. 未开封的粉末在避光干燥-20℃存放 12 月。任何溶解后的 Cy SE 粉末最好立即使用。
2. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。