

磺酸基-Cy5-乙基 马来酰亚胺

1 产品基本信息

产品名称（中文）：磺酸基-Cy5-乙基 马来酰亚胺

产品名称（英文）：Sulfo-Cy5-E Maleimide

产品编号：MS1170

产品规格：1 mg

2 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，是荧光强度较高、稳定性较好的长波长染料，适合于活体小动物体内成像代替放射性元素。

适用范围：

蛋白标记

3 产品参数

外观：可溶于水、DMSO 或 DMF 的黑绿色固体

Ex/Em (MeOH) = 646/661 nm

分子式：C₃₉H₄₆N₄O₉S₂

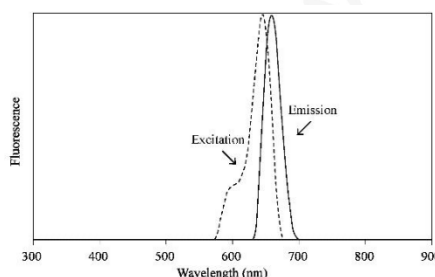
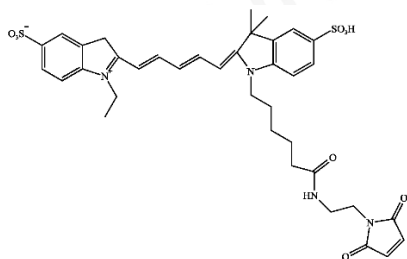
分子量：778.9

消光系数：271,000

效能等同于：Alexa Fluor 657, TRITC, DyLight 640 等

分子结构图：

光谱图：



4 储存与运输

储存条件：-20 °C 避光保存

运输条件：冰袋运输

5 使用方法（仅供参考）

1. 实验材料（自备）

1. 耗材

(1) 2 mL 离心管

(2) 超滤管

2. 试剂

(1)PBS (2)无水 DMSO (3)还原剂或 TCEP 或 DTT

2 操作步骤

1. 准备抗体

(1)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)。

任选步骤: 如果要想让蛋白质中的二硫键释放出更多的巯基, 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 (N_2 或 Ar) 存在下进行, 以防止二硫键重新形成。

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, 染料储备溶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°C , 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 ddH_2O 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。

3. 标记反应步骤

(1)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。

(2)在室温下避光搅拌反应 2 h 或 4°C 过夜。

注: 进行标记反应的同时, 进行步骤 4(1)制备葡聚糖柱。

4. 从反应液中分离标记蛋白

(1)用 PBS 缓冲液($\text{pH}\sim 7.4$)平衡葡聚糖柱(10 mm \times 300 mm)。

(2)将步骤 3(2)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。10kDa 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。

5. 确定 DOL

(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:

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

1)C 是指实验收集的 YF 标记的抗体浓度。

2)稀释因子是指在吸光度测量时的稀释倍数。

3) A_{280} 和 A_{max} 分别是指在 280nm 处的吸光度以及在最大吸收波长($\sim 647 \text{ nm}$)处的吸光度。

4) C_f 是校正因子, Sulfo-Cy5-E Maleimide 的 C_f 值为 0.13。

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) 需要从起始抗体数量 (比如 5 mg) 以及收集的洗脱蛋白液的体积来进行预估。

(2)DOL 的估算

DOL 通过下式计算:

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

1) A_{max} , 稀释因子, C 值在 5(1)中已经明确;

2) Mwt 是指 IgG 的分子量(~150,000);

3) ϵ 是 Sulfo-Cy5-E Maleimide 的摩尔吸光系数。

6 注意事项

- 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。
- 产物如需长期储存, 我们建议添加 BSA 和 NaN_3 , 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。
- 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。
- 本产品仅限于科研, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。