

## LS Dye Succinimidyl Ester (SE) (LS 琥珀酰亚胺酯)

### 1 产品介绍

LS SE (or NHS ester) 是我司生产的具有氨基反应活性的一类荧光染料。该类染料的 SE 基团可以与氨基基团反应生产稳定的酰胺键。相比于市面上其他同类染料，LS 是稳定性更强、水溶性更好、荧光强度更优的新一代荧光染料。

### 2 产品货号

货号	名称	外观颜色	Abs <sub>max</sub> / E <sub>m</sub> (nm)	A <sub>280</sub> /A <sub>max</sub> Or C <sub>f</sub> (protein)	Extinction coefficient(ε)	Optimal DOL( IgG)	MW
MS1145	LS405 SE (LS405 琥珀酰亚胺酯)	淡黄色	407/448	0.13	41,000	4-6	701.1

### 3 规格或纯度

1 mg

### 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 (以标记 IgG 抗体为例)

#### 1. 实验材料

(1) IgG: IgG 不可含有能与染料反应的胺类化学物质, 如氨基酸、Tris、BSA、明胶等。如果 IgG 中含有此类化学物质, 应用 pH~7.4 的 PBS 缓冲液预先透析处理。叠氮类化合物的存在不会影响标记反应。

(2) 无水 DMSO

(3) NaHCO<sub>3</sub>

(4) 葡聚糖凝胶 G-25 透析柱

(5) PBS 缓冲液 (pH~7.4)

(6) NaN<sub>3</sub>

(7) BSA

#### 2. 标记方法和步骤

##### (1) 准备标记抗体

用 0.1 M 的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (pH~8.3) 稀释抗体, 使抗体终浓度为 2.5 mg/mL。如果产品预先用磷酸盐缓冲液稀释, 如 PBS 缓冲液 (不含胺基类化合物), 那么可以直接在该缓冲液中加入约 1/10 体积 1M 的 NaHCO<sub>3</sub> 母液, 使 NaHCO<sub>3</sub> 终浓度为 0.1 M。

注: 蛋白浓度为 2.5 mg/mL 时, 标记效率大概为 35%, 蛋白浓度低于 2.5 mg/mL 也可用于标

记，但标记效率会降低。当蛋白浓度高于 5 mg/mL 时，标记效率可能更高。由于缓冲液和蛋白纯度存在差异性，因而更精确的标记效率由实操条件决定。如果蛋白浓度过低，可以通过超滤法进行浓缩。

## (2) 准备染料储存液

室温预热一管 1  $\mu$ mole 的 LS SE，在管中加入 0.1 mL 的无水 DMSO，充分涡旋溶解染料，配制浓度为 10 mM 的染料储存液。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：a. 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。

b. 染料也可以用去离子水配制，但是由于染料在水中会缓慢水解，所以水配制的储液最好现配现用。

## (3) 标记反应步骤

a. 搅拌或涡旋混匀蛋白溶液，逐步滴加 15-25  $\mu$ L 的染料储存液（10 mM），使染料/蛋白的摩尔比在 9:1 至 15:1 的范围内。LS SE 标记 IgG 抗体的 DOL（结合于每个蛋白分子上的染料数量）范围请参考上表。

b. 在室温下搅拌反应 1 h，微量标记时也可在摇床上振荡孵育 1 h。

注：在进行结合反应的同时，进行步骤 2(4)，平衡葡聚糖凝胶 G-25 透析柱。

## (4) 从反应液中分离标记蛋白

a. 用 PBS 缓冲液（pH~7.4）平衡葡聚糖凝胶 G-25 透析柱（10 mm  $\times$  300 mm）。

b. 将步骤 3(b)反应溶液加入柱子，并用 1  $\times$  PBS 缓冲液洗脱。首先洗脱出来的着色带是染料-蛋白结合物。

注：a. 对于小规模标记反应，为了避免过度稀释产物，可以使用超滤装置去除结合物中的自由染料。

b. 当结合反应完成后，如不及时分离染料-蛋白结合物，可以加入 50  $\mu$ L 1M 赖氨酸终止反应。多数情况下，不需要此操作，因为剩余的未反应的染料在反应最后已经被充分水解。

## 3. 确定 DOL

### (1) 蛋白浓度的确定

抗体浓度可通过以下公式计算：

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

a. C 是指实验收集的抗体浓度；

b. 稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数；

c. A<sub>280</sub> 和 A<sub>max</sub> 分别是指在 280 nm 处的吸光度以及在吸收波长处的吸光度；

d. C<sub>f</sub> 是校正因子，LS SE 染料的 C<sub>f</sub> 值请参考上面表格；

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。

### (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. A<sub>max</sub>，稀释因子，C 值在 3(1)中已经明确；

b. Mwt 是指 IgG 的分子量(150,000);

c.  $\epsilon$  是 LS SE 的摩尔吸光系数, 参考第一页表格;

d. 标记 LS SE 的 IgG 抗体最适 DOL 值, 请参考第一页表格, DOL 值会波动, 但也能得到很好的实验效果。

## 6 注意事项

- 荧光染料激发与发射波长会受到溶剂的影响, 使用不同溶剂, 则激发与发射波长可能会发生变化。
- 标记的蛋白如需长期储存, 推荐加入 5-10 mg/mL BSA 和 0.01-0.03%  $\text{NaN}_3$ , 以防止蛋白变性和微生物滋生。放置于 4°C 避光保存。若加入了终浓度为 50% 的甘油, 可放 -20°C 保存。可稳定保存一年以上。
- 操作过程注意避光, 搅拌速度应适当以避免产生气泡。
- 层析柱装柱时, 尽量使柱体均匀, 柱面平整, 无气泡、裂隙。
- 上样时注意, 当柱顶缓冲液与凝胶平面相切时再加样品, 洗脱时, 当样品走至与凝胶平面相切时再加洗脱液。
- 影响标记效率的其他因素还包括: 温度、反应时间、pH、荧光染料与蛋白的量等, 需注意控制。
- 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。