

Sulfo-Cyanine5.5 NHS Ester 磺化 Cy5.5 NHS 酯 (水溶性)

产品信息:

产品名称: Sulfo-Cyanine5.5 NHS Ester 磺化 Cy5.5 NHS 酯 (水溶性)

规格:

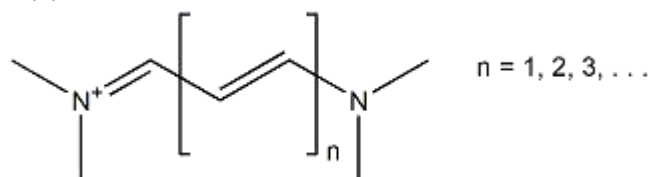
目录号	产品名称	规格
X12211-1mg	Sulfo-Cyanine5.5 NHS Ester 磺化 Cy5.5 NHS 酯 (水溶性)	1mg
X12211-5mg	Sulfo-Cyanine5.5 NHS Ester 磺化 Cy5.5 NHS 酯 (水溶性)	5mg

储存运输:

分子式	C ₄₅ H ₄₄ N ₃ K ₃ O ₁₆ S ₄
分子量	1128.40 g/mol
纯度	≥95%
外观	蓝色至深蓝色固体
溶解性	溶于水, DMF, DMSO
Ex/Em	~678/695 nm
消光系数	250,000 L · mol ⁻¹ · cm ⁻¹
A ₂₈₀ /A _{max}	18%
运输条件	冰袋运输
储存条件	-20°C避光干燥保存, 2年有效期

产品说明:

活花菁类染料 (Cyanine Dyes) 是一种在两个氮原子间含聚亚甲基桥键且携带一非定域电荷的分子【见下图】。



归其结构特征, 花菁素具有极其高的消光系数通常高于 100,000 L · mol⁻¹ · cm⁻¹。不同的替代基允许控制发光团的性能比如吸光波长, 光稳定性和荧光强度。例如, 通过选择不同长度的聚亚甲基桥键能够控制吸光和荧光波长: 花菁素越长, 吸光和发射波长更高, 高达至近红外区。

在生命科学领域广受欢迎的花菁类染料由美国卡耐基梅隆大学 (CMU) 的 Alan Waggoner 教授和同事于二十世纪 90 年代早期研发应用。这些染料呈现出低的生物分子非特异性结合, 并由其巨大的消光系数和良好的量子产量产生明亮的荧光。目前商业化可提供各种反应性衍生物, 比如点击化学用的 N-羟基琥珀酰亚胺酯, 马来酰亚胺, 叠氮化物和其他衍生物。目前花菁染料常以两种异构体的形式供应: 一种非磺化的花菁类染料和磺化的花菁类染料, 对于许多应用, 两种是可以互相替换的, 因其光谱属性基本相同。两种染料都可用于 DNA 和蛋白质等生物分子的标记。两者的区别在于溶解度: 磺化染料具水溶性, 可以

在水环境中标记，无需有机共溶剂，且在水中不易聚集。

Sulfo-Cyanine5.5 是一种水溶性，远红外发射的荧光团。因含 4 个磺基，该染料在中性 pH 中带负电荷，且有非常高的亲水性。

Sulfo-Cyanine5.5 NHS Ester (Sulfo-Cyanine5.5 SE)是 Sulfo-Cyanine5.5 的氨基反应活化酯。特别适合于要求纯水溶性环境或无任何有机溶剂反应体内的抗体、敏感蛋白和其他物质的荧光标记。标记后的分子适用于小动物活体成像研究。

使用方法：

储【注意】：Cy 染料和生物分子的比例 (F/P) =4~12 之间荧光强度最高。F/P 过高，荧光探针会自我淬灭并且影响生物分子的活性。CyDye NHS 在 pH 8.5~9.4 内标记抗体 10min，F/P 可达 5~6。但在 pH 7.0 内几乎无反应。我司(懋康生物)内部使用 Cy3 NHS 标记 Anti-GST 抗体发现按 1:1, 1:5, 1:10, 和 1:20 标记得到的 F/P 分别为 0.28:1, 1.16:1, 2.3:1 和 4.6:1。

一、水溶性 Cy3 NHS 标记 Anti-GST 抗体【其它 CyDye NHS 参考此方法进行并做适当摸索】

商业化购买的抗体如果含有其他蛋白(如血清白蛋白，明胶等)，或溶于带氨基的缓冲液，会影响标记。需在标记前对抗体进行纯化。

1. 于 1L 0.15M NaCl 溶液中透析 Anti-GST (0.5ml, 3mg/ml)，室温或 4°C 透析 4h。
2. 换用 1L 新鲜的 0.15M NaCl 溶液，4°C 透析过夜。
3. 第二天再换用 1L 0.1M NaHCO₃ (pH 8.3)，4°C 透析 4h。
4. 【可选】用 0.22μm 低吸附滤膜过滤透析后的抗体溶液。
5. 用 0.1M NaHCO₃ (pH 8.3) 稀释少量的抗体，于 280nm 测其紫外吸收值并计算标记抗体的总量 (IgG 抗体摩尔吸光系数为 170,000 at 280nm)。
6. 用 DMSO 配制 Cy3 NHS (Mw:765.95)，浓度为 10mg/ml。根据 CyDye NHS 和抗体的使用比值 (比如 1:20) 来计算所需要染料的体积。然后慢慢将其加入到抗体溶液中，同时于暗处低速搅拌，室温 45min。
7. 用 1L 0.15M NaCl 溶液，常温或 4°C 避光透析 4h，以除去未标记上的 Cy3 NHS。
8. 换用新鲜的 1L 0.15M NaCl 溶液，4°C 避光透析过夜。
9. 换用 1L 0.01M PBS/0.01% NaN₃ 溶液室温或 4°C 避光透析 4h，然后在 4°C 避光再次透析过夜。
10. 【可选】用 0.22μm 低吸附滤膜过滤透析后的抗体溶液。
11. 用 0.01M PBS/0.01% NaN₃ 溶液整数倍稀释标记抗体，测定 280nm (蛋白) 和 552nm (Cy3) 处的紫外可见吸光度。
12. 产品冷冻干燥成粉末或置于 0.01M PBS/0.01% NaN₃ 溶液中，-20°C 避光保存。

【F/P 计算】：

Cy3 在 552nm 下的摩尔吸光系数为 150,000 L·mol⁻¹·cm⁻¹，此蛋白在 280nm 的摩尔吸光系数为 170,000 L·mol⁻¹·cm⁻¹，不同蛋白的摩尔吸光系数不同。Cy3 本身在 280nm 处的吸收是 552nm 处的 8%。按照以下公式计算 F/P 值。

$$[Cy3] = A_{552}/150000; [Antibody] = [A_{280} - (0.08 \times A_{552})]/170000$$

$$F/P_{final} = [Cy3]/[Antibody] = [1.13 \times A_{552}]/[A_{280} - (0.08 \times A_{552})]$$

二、水溶性 Cy5 NHS 标记 (D-ser2) -Leu-Enkephalin 【其它 CyDye NHS 参考此方法进行并做适当摸索】

1. 低温保存的 Cy5 NHS 置于室温回温至少 20min。往 1mg 粉末内加入 400μl 高品质无水 DMSO 充分溶解。同样，低温保存的玻璃瓶装的 (D-ser2) -Leu-Enkephalin (YSGFLT, 0.75mg) 室温回温后加入 400μl 高品质无水 DMSO 充分溶解。将 400μl Cy5 NHS 加入 400μl 多肽内。【染料与多肽通常质量比 1:1】。

2. 再加入 15 μ l 三乙胺, 常温避光搅拌反应混合物, 过夜。【若多肽稳定性较弱, 则于 4 $^{\circ}$ C 反应过夜】。
3. 用 HPLC 纯度多肽。使用 C18 柱子 (25cm \times 10mm), 每次上样注入 2 \times 400 μ l, 30min 梯度洗脱从 0.1% TFA 水溶液到 MeCN:H₂O (0.1% TFA)=70: 30, 流速 4ml/min。 (对不同的多肽选择不同的合适 HPLC 梯度流动相)
4. 收集适当的色带峰, 标记多肽的保留时间比未标记的多肽长。
5. 产品冷冻干燥成粉末或置于水溶液中, -20 $^{\circ}$ C 避光保存。必要时可用质谱表征。
6. CyDye 标记的蛋白/多肽稳定性取决于蛋白本身。例如标记的 IgG 在 4 $^{\circ}$ C 可避光保存 2 月, 更长保存需加入等体积甘油 -20 $^{\circ}$ C 避光保存。

【F/P 计算】:

Cy5 在 650nm 下的摩尔吸光系数为 250,000 L \cdot mol⁻¹ \cdot cm⁻¹, 此蛋白在 280nm 的摩尔吸光系数为 170,000 L \cdot mol⁻¹ \cdot cm⁻¹, 不同蛋白的摩尔吸光系数不同。Cy5 本身在 280nm 处的吸收是 650nm 处的 5%。按照以下公式计算 F/P 值。

$$[\text{Cy5}] = A_{650}/250000; [\text{Peptide}] = [A_{280} - (0.05 \times A_{650})]/170000$$

$$F/P_{\text{final}} = [\text{Cy5}] / [\text{Peptide}] = [0.68 \times A_{650}] / [A_{280} - (0.05 \times A_{650})]$$

注意事项:

1. Sulfo-Cyanine5.5 NHS Ester 水溶液的稳定性很弱, 建议现配现用。Sulfo-Cyanine5.5 NHS Ester DMSO 溶液的稳定性相对高, 建议置于 -20 $^{\circ}$ C 避光保存, 1 个月内稳定。
2. Sulfo-Cyanine5.5 NHS Ester 具水溶性, 除非标记实验严格要求纯水溶性环境, 建议用 DMSO 溶解配制成母液后使用。一般情况下, Cy 系列染料在含有机溶剂体系内的标记效率相对高些。
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅供科研使用, 不可用于临床诊断应用或其他用途。