

水溶性Cy5-N-羟基琥珀酰亚胺酯

货号: PMK0907

保存: -20°C干燥避光保存, 有效期12个月。

规格: 1 mg

用途: 广泛用于蛋白、抗体、核酸及其他生物分子的标记和检测

产品简介:

水溶性的SulfoCy5 SE=Cy5 NHS=Cy5琥珀酰亚胺酯 (琥珀酰亚胺酯SE(Succinimidyl esters) = N-羟基琥珀酰亚胺NHS(N-Hydroxy succinimide))

菁染料是性能优良的荧光标记染料, 摩尔吸光系数在荧光染料中是最高的, 其琥珀酰亚胺酯是最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Hoeffman规则正好红移约100nm。

菁染料Cy3和Cy5已成为基因芯片的首选荧光标记物;另外, Cy5, Cy5.5和Cy7的吸收在近红外区背景非常低, 是荧光强度最高、最稳定的长波长染料。特别适合于活体小动物体内成像代替放射性元素。

菁染料琥珀酰亚胺酯 (CyDye NHS) 的标记:

菁染料和生物分子的比例F/P=4~12之间荧光强度最高, 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, 标记生物分子最好是用单琥珀酰亚胺酯, 但是用双修饰的CyDye NHS并没有发现交联。CyDye NHS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。

操作步骤:

1. 水溶性Cy3 NHS标记anti-GST多克隆抗体

市场上买到的抗体如果含有其它蛋白(例如serum albumin或gelatin等)或带氨基的缓冲液会影响标记, 在标记前需纯化。

- (1) 在1 L 0.15 M NaCl 溶液中透析anti-GST抗体(浓度为 0.5 mL at 3 mg/mL), 常温透析4小时。
- (2) 在4°C用新鲜的1 L 0.15 M NaCl 溶液再透析过夜。
- (3) 第二天用1 L 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.3)透析4小时。
- (4) 用0.22 μm注射器过滤头过滤抗体溶液。
- (5) 用0.1 M NaHCO₃ 稀释少量的抗体, 在280nm处测其紫外吸收值计算标记抗体的总量 (IgG antibody摩尔吸光系数170 000 M⁻¹ cm⁻¹ at 280 nm)。
- (6) 用DMSO配置Cy3 NHS (MW 765.95) 溶液浓度为10 mg/mL; 计算所需体积以得到想要的CyDye NHS 和抗体的比值(例如20:1), 然后慢慢将其加入到抗体溶液中, 同时在暗处常温缓慢搅拌45分钟。
- (7) 用1 L 0.15 M NaCl 溶液常温避光透析4小时除去未标记上的Cy3。
- (8) 在4°C用新鲜的1 L 0.15 M NaCl 溶液再避光透析过夜。
- (9) 用1 L of 0.01 M PBS/ 0.01% 叠氮化钠溶液常温避光透析4小时, 在4°C常温避光再次透析过夜。

产品说明书

(10) 用0.22 μm注射器过滤头过滤抗体溶液。

(11) 用0.01 M PBS/0.01 % 叠氮化钠整数倍稀释标记抗体溶液，测量280nm（蛋白）和552nm（Cy）处的紫外吸光度。

(12) 产品冷冻干燥成粉末或在0.01 M PBS/ 0.01% 叠氮化钠溶液中，-20℃避光储存。

F/P计算： Cy3在552nm摩尔吸光系数为150 000 M⁻¹ cm⁻¹；此蛋白在280nm的摩尔吸光系数为170 000 M⁻¹ cm⁻¹；不同蛋白的摩尔吸光系数不一样，Cy3 染料本身在280nm的吸收是552nm处的8%。按以下公式计算F/P值。

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

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

2. 水溶性Cy5 NHS标记 (D-ser 2)-leucine-enkephalin

(1) Cy5 NHS 1.0 mg 溶解于400 μL DMSO后，加入到1mL 的玻璃瓶中盛有(D-ser2)-leucine-enkephalin acetate (YSGFLT, 0.75 mg) 的400 μL DMSO溶液。（Dye 和peptide 投料比是 1:1）

(2) 然后加入15 μL三乙胺，常温避光搅拌反应混合物过夜。

(3) 用HPLC 纯化蛋白，使用蛋白C18柱子(25 cm×10 mm)，每次上样注入2×400 μL，30分钟梯度洗脱从 0.1% TFA水溶液到MeCN:H₂O (0.1% TFA) =70:30，流速4mL /min。（对不同的蛋白选择不同的合适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。

(5) 产品冷冻干燥成粉末或在水溶液中，-20℃避光储存；必要时可用质谱表征。

(6) CyDye标记的蛋白稳定性取决于蛋白本身。例如标记的IgG在4℃可避光保存2月；更长期的保存需加入等体积的甘油-20℃避光保存。

F/P计算： Cy5 在650 nm 的摩尔吸光系数为250 000 M⁻¹ cm⁻¹，所用蛋白在280 nm处的摩尔吸光系数为 170 000 M⁻¹ cm⁻¹；Cy5在280nm处的吸收是650nm处的5%。按以下公式计算F/P值。

$$[\text{Cy5 dye}] = (A_{650})/250 000 [\text{peptide}] = [A_{280} - (0.05 \times A_{650})]/170 000$$

$$\text{F/P final} = [\text{dye}]/[\text{peptide}] = \{0.68 \times A_{650}\} / \{A_{280} - (0.05 \times A_{650})\}$$

3. 水溶性 CyDye SE标记OLIGO

氨基封端的OLIGO可以标记CyDye SE，但是非常困难；标记前因为OLIGO经氨水脱保护，请务必洗涤掉所有的残余氨水。然后将样品真空干燥；然后溶于0.25 ml 的0.5 M NaCl 溶液中，用Sephadex G-50脱盐，用5.0 mM borate 缓冲液平衡到pH=8.0，然后用以上硼酸缓冲液冲下OLIGO。然后浓缩至干的样品溶于 0.1 M carbonate buffer (pH 8.5-9.0)；在0.5mL碳酸缓冲液中30 nmoles的OLIGO加入到CyDye SE的玻璃瓶中室温避光，密闭搅拌反应60min。反应物经Sephadex G-50或 RP-HPLC过柱纯化，冷冻干燥后避光保存。

4. 活体成像领域

SPF级 BALB/C裸鼠，6-8 周龄，18-20克，实验前24 h 自由进食、饮水。

于实验裸鼠腹腔内注射 2%戊巴比妥钠 300 μL (215 mg/ kg) 麻醉动物。将裸鼠俯卧位平放于小动物多光谱活体成像系统的记录暗箱中。实验时将 Cy7 或 Cy7 标记的生物分子或药物 DMSO 稀释后，于裸鼠尾静脉注射 200 μL (0.5 mg/g) [最佳用量和时间需要客户根据自己的仪器和药物试剂等条件优化]，每 5min 记录 1 张动物在体内发射荧光的成像图片，分析荧光药物的分布情况。对照鼠不注射药物，进行同时记录。记录结束后迅速解剖裸鼠的心、肝、脾、肺、肾等脏器，进行成像。

产品说明书

Cy7 检测时激发波长700~770 nm 带通，发射波790 nm 长通。液晶可调谐滤光片扫描范围 780~950 nm，扫描步进 10 nm。曝光时间为 500 ms。

不同的药物代谢时间不一样，注射入裸鼠体内，荧光立即分布全身，然后逐步向膀胱聚集，呈现显著的肾排泄的特点一般 4~6 小时，快得只有 30 分钟；如果是骨骼等部位靶点的 Cy7 标记药物，有客户反映一周后活体成像系统仍能检测到荧光成像。

器官切片观察：将解剖的器官迅速放置于 4%多聚甲醛固定 4 小时以上，0%，20%，30%PBS蔗糖依次沉底，20 μm 切片，多聚赖氨酸洗过的载玻片贴片，晾干，DAPI 染色。共聚焦显微镜观察，激光器为氩氛 633 nm。

注意事项：

未开封的粉末在避光干燥-20℃存放12月。CyDye NHS水溶液现配现用不能储存。任何溶解后的CyDye NHS粉末最好立即使用；无水的DMSO溶液-20° C保存最多2个星期。

相关产品：

PMK1300 考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液

PMK053 GAPDH mAb-HRP conjugated

PMK0312 抗体稀释液

PMK1700 PBST缓冲液

PMK1020 IPTG 溶液 (50mg/ml)

PMK1010 30%丙烯酰胺(29:1)

PMK1070 5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液

PMK0012 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒



更多产品详情了解，请关注公众号：