

Sulfo-Cyanine3 NHS Ester 磺化 Cy3 NHS 酯 (水溶性)

产品信息:

产品名称: Sulfo-Cyanine3 NHS Ester 磺化 Cy3 NHS 酯 (水溶性)

规格:

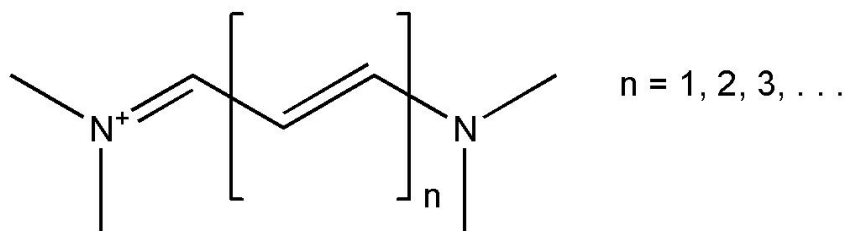
目录号	产品名称	规格
X12207	Sulfo-Cyanine3 NHS Ester 磺化 Cy3 NHS 酯 (水溶性)	1mg
X12208	Sulfo-Cyanine3 NHS Ester 磺化 Cy3 NHS 酯 (水溶性)	5mg

特性说明:

CAS 号	N/A
分子式	$C_{35}H_{40}N_3KO_{10}S_2$
分子量	765.18 g/mol
溶解度	溶于水, DMF, DMSO
纯度	$\geq 95.00\%$
Ex/Em	$\sim 548/562$ nm
摩尔吸光系数	$150,000 L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$
A 280 /A max	8%
光谱相似染料	Alexa Fluor [®] 555, DyLight [™] 555
运输条件	冰袋运输
储存条件	-20°C 避光干燥保存, 2 年有效

产品描述:

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 $100,000 L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ 。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-Cyanine3 NHS Ester (Sulfo-Cyanine3 SE) 是 Cyanine3 的水溶性、胺反应活化酯，能够在纯水溶性环境或无任何有机溶剂反应体内进行蛋白和多肽的有效标记。非常适合具极低水溶性和易变性蛋白的标记。

使用方法

【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 170,000L·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。

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

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

二、水溶性 Cy5 NHS 记标记 (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 250,000L \cdot mol⁻¹ \cdot cm⁻¹, 此蛋白在 280nm 的摩尔吸光系数为 170,000L \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。

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

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

注意事项:

- 1) Sulfo-Cyanine3 NHS Ester 水溶液的稳定性很弱, 建议现配现用。Sulfo-Cyanine3 NHS Ester DMSO 溶液的稳定性相对高, 建议置于-20 $^{\circ}$ C 避光保存, 2 周稳定。
- 2) Sulfo-Cyanine3 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。