

AF 系列染料琥珀酰亚胺酯

产品	英文描述	包装	储存
AF 系列荧光染料，琥珀酰亚胺活化酯	AF dye series, succinimidyl esters (SE ester, NHS esters)	1mg, 3mg, 5mg	-20°C, 干燥储存，避光。溶剂溶解后应尽快使用。

产品简介

AF 系列，即 Alexa Fluor 系列染料是一类非常著名的高性能荧光染料。AF 染料由 19 种染料组成，荧光涵盖了全部可见光区以及近红外 1 区的波谱范围。从化学结构上看，虽然 AF 系列包含有香豆素、罗丹明、花青素等各种荧光母核的染料，但是它们都有一个共同特点：都是高度磺化的染料，水剪性强、荧光很亮、对 pH 不敏感 (pH 4-10)，因此是一类高性能的蛋白标记染料。

和 sulfo-Cy 系列水溶性染料相比，AF 染料具有更多的磺化官能团，比如 Sulfo-Cy5 含有 2 个磺酸根基团，但是对应的 AF647 染料含有 4 个磺酸根基团，足足多了 1 倍。大量的磺酸根离子不仅赋予了 AF 染料更高的水溶性，更重要的是大大提高了标记染料的荧光性能。磺酸化可以提高染料本身的消光系数和量子产率 (两者直接与染料的荧光亮度正相关)，也可以强化染料标记产物的荧光性能。比如普通染料在标记蛋白质后，由于处于蛋白表面的染料倾向于疏水性聚集，染料荧光会淬灭变弱；而 AF 染料因为多磺酸化的高水溶性和负电荷排斥作用，蛋白表面的染料倾向于分散而不是聚集，产物的荧光强度会随着标记的程度倍增，另外 AF 染料标记的蛋白质也更稳定，更容易保存。

琥珀酰亚胺酯 (succinimidyl esters)，也常叫做 se 或 NHS 活化酯，是最常见的活化官能团，可和氨基反应，生成稳定，无毒的酰胺键。AF 染料琥珀酰亚胺酯以干燥固体的形式实现稳定储存，可随时与溶剂 (有机溶剂或者水) 复溶后对氨基官能团进行染料标记。标记反应可以在有机溶剂中进行，也可以在缓冲盐中或者缓冲盐和有机溶剂的混合溶剂中进行，可根据标记对象的水溶性和稳定性决定。NHS 活化酯主要和伯氨基反应，比如多肽 N 端和蛋白质中的赖氨酸侧链氨基，与其它氨基的反应活性都比较小，比如和苯氨基、苯酚、醇羟基都不反应。另外，NHS 活化酯优于其它氨基标记基团，比如异硫氰酸酯 (isothiocyanate)，因为 NHS 反应活性更强，选择性高，并且生成的酰胺键和肽键结构一样，很稳定，比异硫氰酸酯生成的异硫氰酸酰胺 (如 FITC 标记) 要牢靠。

表 1. AF 系列染料的光学特性。

Cyanine	产品货号	Ex/Em	ϵ	Φ	类似染料
AF350	D10129	346/445	19000	0.73	7-AMCC
AF405	D10161	401/423	35000		
AF430	D10164	430/545	15000	0.23	
AF488	D10121	495/519	73000	0.92	FITC
AF532		532/553	81000	0.61	
AF555	D10158	556/571	155000	0.10	Cy3
AF568	D10107	578/603	88000	0.69	
AF594	D10111	590/617	92000	0.66	Texas Red

AF610		612/628	144000		
AF633		632/647	159000	0.29	
AF647	D10157	651/672	270000	0.33	Cy5
AF680		679/702	183000	0.36	Cy5.5

Ex/Em 荧光最大激发波长和荧光最大发射波长 (nanometer)

† 分子消光系数 Molar extinction coefficient ($M^{-1} cm^{-1}$)

重要产品信息

- 琥珀酰亚胺活化酯对湿气敏感，在含水条件下会缓慢水解为羧酸，失去对氨基的标记能力。活化酯一般在 -20°C 干燥保存，使用前请预先从冰箱中取出，平衡到常温后再打开瓶盖。NHS 活化酯用无水溶剂（如无水 DMSO、无水 DMF）溶解后也无法长时间保存，应尽快使用（尽量 24h 内），因为溶剂中残留的微量水分子也会让活化酯水解。
- 活化酯在水溶剂中水解的半衰期随 pH 而变化，在微碱性条件下半衰期约 0.5-1 h；在微酸性下，半衰期可长达 5 小时以上。NHS 活化酯与氨基的反应活性也与 pH 有关，一般碱性下反应快，酸性下反应活性弱，所以一般推荐是在中性或者微碱性缓冲液中进行标记反应，以达到最佳的水解速率和反应活性平衡。
- 常见添加剂，比如叠氮化钠 ($\leq 3mM$ or 0.02%) 或 thimerosal ($\leq 0.02mM$ or 0.01%)，对蛋白标记反应没有影响，但是 20-50% 的甘油会降低标记反应效率。此外，Tris、甘氨酸等带伯氨基的缓冲盐会让 NHS 活化酯试剂失活，严禁在此类溶液中进行标记反应。

标记步骤

下面是以标记蛋白质为例，讲述 NHS 活化酯染料的常规标记方法。对于特殊标记条件和要求，可以根据实验情况个体优化。

标记准备工作：

- **反应体系溶剂** AF 染料由于水溶性强，不需要有机溶剂助溶，可在水溶液中标记，避免有机溶剂对生物样品的刺激和伤害。如果希望短期保存染料，可以先将染料溶于少量无水 DMSO，然后取少量染料有机溶液，置于水溶液样品中，即混合溶剂（水溶液+少量有机溶剂），进行标记。NHS 活化酯在微碱性条件下反应的活性比较高，综合考虑反应速度和活化酯水解速度，一般选择在 pH 7.0-8.5 左右的 pH 值范围进行标记反应。最优化的反应缓冲盐是 50 mM 的硼酸钠溶液（50 mM Na_3BO_3 , pH 8.5）。除此以外，磷酸钠缓冲盐 PBS（0.1 M Na_3PO_4 , 0.15 M NaCl, pH 7.2-7.5）， $NaHCO_3$ 溶液（0.1M $NaHCO_3$, pH 8.3-9.0）也可以用于标记反应。带有氨基的缓冲液（e.g. Tris 或甘氨酸）会自身和 NHS 活化酯反应，所以不可使用，如果蛋白样品中含有这些缓冲盐，必须通过透析或者除盐柱将这些氨基盐除掉后才可以用于标记反应。
- **染料母液配制** AF 系列 NHS 活化酯染料对湿气很敏感。为了避免空气中水汽在低温样品表面凝结失活样品，低温冰箱中取出的活化酯在室内放置到室温后再打开瓶盖使用。NHS 活化酯染料不建议配置母液，而是应直接投入水溶液进行标记反应，直接在水溶液中进行标记反应不会影响标记效率。如果必须配置 AF 染料母液，一般推荐用无水 DMSO 溶解，母液浓度为 10mg/ml。母液也可以配制为 1mg/ml 或者其它浓度，以便更准确的移液操作。
- **染料标记比例** 为实现每个蛋白标记大于 1 个染料分子的目标，在反应体系中，染料/标记对象的摩尔比例一般是 2-5/1；个别情况可以升高到约 10/1，比如标记多肽的末端氨基（ α 位氨基活性差）。为提高标记效率，应尽可能在高浓度、小反应体积条件下中进行，比如标记蛋白质，蛋白质的浓度最好在 1-10mg/ml。水溶液中的标记反应，就是 NHS 活化酯的水解反应与氨基标记反应的赛跑，蛋白质浓度高时，NHS 活化酯更多机会碰撞到氨基（存在于蛋白质表面），反应机会多，效率就高。上述推荐比例仅仅是多荧[®]提供的参考比例，具体比例需

根据个人预实验摸索后决定，因为蛋白标记的效率与蛋白结构、反应体积、反应溶剂、实验温度、反应时间和纯化方式都有关系。标记后的蛋白以每个蛋白分子上偶联 1-4 个染料为最佳（视蛋白稳定性和大小而定），标记过多会影响蛋白的活性和稳定性，严重时会使蛋白变性沉淀。

标记反应步骤：

- 1) 将需要标记的蛋白质溶液转移到反应小管中。
- 2) 根据染料标记摩尔比例，将蛋白溶液与染料混合，用移液器上下轻轻打匀，或者轻微超声 1-2 秒，使染料完全溶解。常温下静置或轻微晃动，反应 3-5 小时，反应时间延长有助于提高标记效率，最多可以标记过夜（如果蛋白很稳定）。对于蛋白质等敏感材料，反应中的有机溶剂体积比最好控制在 5% 以下，不建议超过 10%。
- 3) 利用透析，或者除盐柱，除去未标记的游离染料分子。也可以采用硫酸铵沉淀法（大量蛋白样品时）或乙醇沉淀法（标记样品是核酸时）等方法纯化样品。透析时，为了快速的透出染料分子，请采用至少截留分子量 $> 10\text{KDa}$ 的透析袋，最好每 4 个小时更换透析液，重复更换 3 次。凝胶过滤法，比如除盐柱，也可以纯化蛋白标记，虽然这个方法比较快捷，但是效率可能会不如透析法。
- 4) 在避光条件下，将纯化后的蛋白样品溶液可短期储存在 4°C 冰箱。或者加入冷冻保护剂（比如甘油）、分装后放入 -20°C 冰箱，长期保存。

计算标记程度：

每种染料都有一个特定的消光系数 ϵ 。通过测定最大激发峰（即最大吸收峰）的吸收值，并结合这个 ϵ 参数，可以计算出染料分子的浓度，再除以蛋白的浓度就可以得到染料标记的程度（即每个蛋白平均标记了几个染料分子）。

- 1) 利用 BCA 或者其他蛋白质测定试剂盒测定标记后的蛋白质浓度，并根据蛋白质分子量，计算出样品蛋白质的摩尔浓度 C_{protein} 。
- 2) 查询首页的 AF 染料光学特性表，找到染料最大吸收峰的波长（即 λ_{ex} 的数值，比如 AF555 染料的是 555nm）。在紫外分光光度计上面，采用 1cm 光程的比色皿（高质量石英皿），测定最大吸收峰的吸收值 A_{max} 。染料对光的吸收很强，测量前一般要将少量样品取出进行稀释再测吸收值。根据吸收值，计算染料分子的摩尔浓度， $C_{\text{dye}} = (A_{\text{max}} \times \text{稀释倍数}) / \text{消光系数} \epsilon$ ，单位是 M (mol/L)。
- 3) 计算标记程度，即 $n = C_{\text{dye}} / C_{\text{protein}}$ 。注意，务必将蛋白质和染料的浓度换算成统一单位后再计算。