

BODIPY 系列染料琥珀酰亚胺酯

产品	英文描述	包装	储存
BODIPY 系列荧光染料, 琥珀酰亚胺活化酯	BODIPY dye series, succinimidyl esters (SE ester, NHS esters)	1mg, 5mg, 25mg	-20°C, 干燥储存, 避光。溶剂溶解后应尽快使用。

产品简介

BODIPY 特指一类非对称性的硼二吡咯 (boron-dipyrromethene) 荧光染料。这类染料也常被称为 BDP, Bodi Fluor 等, 其英文缩写来源于其母核 boron-dipyrromethene 的首字母缩写组合。BODIPY 染料谱带很窄, 荧光很亮, 光学性质在各种溶剂和 pH 下都较稳定, 性能很优异。为匹配常用荧光仪器的光源和滤片参数, 共有 12 种 BODIPY 染料被遴选出来, 作为常规染料用于标记、定量和仪器校准等各种用途中, 它们覆盖从绿光到近红外光几乎所有可见光光谱范围 (ex 493 ~ ex 650)。BODIPY 染料的命名规则分两类, 一种是 BODIPY 加最大激发/发射波长, 比如 BODIPY 581/591, 其中 581/591 (单位 nm) 是指该染料的 ex/em 峰值; 另外一种 BODIPY 加经典染料名, 比如 BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR 和 BODIPY TR, 以表明该 BODIPY 染料可以替代荧光素 (fluorescein)、罗丹明 6G (rhodamine 6G)、四甲基罗丹明 (tetramethylrhodamine) 和德州红 (Texas Red) 等。

从光学性质上讲, BODIPY 有诸多特点。首先, BODIPY 染料的消光系数和量子产率都非常高, 即使在含水溶液中量子产率也常常达到 0.8 以上, 因此荧光非常明亮, 白光下一般肉眼可辨。第二, 峰谱很窄, 但是 stokes 位移很小。窄光谱可以降低对其它联用染料的交叉干扰, 但很多 BODIPY 染料的 stokes 位移仅仅不到 10nm, 测荧光时容易引入激发光的干扰, 因此使用时往往规避使用最大峰, 庆幸的是有一些 BODIPY 染料, 比如 BODIPY TR 等 stokes 位移也很大。最后, 一些 BODIPY 染料 (比如 BODIPY FL) 具有相对较长的激发状态寿命 (通常为 5 纳秒或更长), 可用于基于荧光偏振的测定以及多光子激发的大型双光子截面。

BODIPY 染料属于典型的疏水性染料, 使用方式和用途与高水溶性 AF 染料和 sulfo-Cy 染料不同, 同时 BODIPY 染料的疏水性很独特, 与普通 Cy 染料也不同, 主要表现在其优良的亲脂性和电中性, 因此透膜性非常好, 常用于透膜探针, 适用于标记染色脂质、膜和其他各种亲脂性化合物。另外, 所有的 BODIPY 染料都是呈电中性的, 因此, 偶联后不会给标记对象引入额外电荷, 有时候这一点很重要, 比如在 DNA 测序中, BODIPY 染料对 DNA 片段的电泳不会产生干扰。得益于 BODIPY 染料的优异性能, 它们被用于标记酶的多肽底物、磷脂、多糖、核酸、蛋白、脂质体和纳米粒等等样品。在标记探针和小分子化合物时, 染料的标记反应往往是在有机溶剂中进行的, 根据染料和标记对象的溶解性, 可以选择氯仿、氯仿/甲醇混合液、乙腈、DMF 或者 DMF/水的混合液等。BODIPY 染料极性较小, 标记反应一般可以通过 TLC 监测, 产物也往往极性不大, 可以通过硅胶柱直接纯化 (视标记对象和产物极性而定, 必要时采用 HPLC 反相柱纯化)。

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。BODIPY 染料琥珀酰亚胺酯以干燥固体的形式实现稳定储存, 可随时与氨基官能团进行标记。标记反应可以在有机溶剂中进行, 也可以在含有机溶剂的缓冲盐混合溶剂中进行, 因为 BODIPY 主要用途是标记小分子探针, 所以很多时候是在有机溶剂中进行化学反应, 标记效率比在含水溶剂中高。在标记中, NHS 活化酯可与伯氨基反应, 也可与仲胺反应, 反应活性稍微小一些, 但是一般不与叔胺和羟基反应。在一些必须采用水为主要反应溶剂的标记反应中, BODIPY 染料往往被制备成 Sulfo-NHS 活化

酯。Sulfo-NHS (N-羟基磺基琥珀酰亚胺) 带磺酸根侧链，是一种水溶性更高的 NHS 活化酯，可提高标记染料的水溶性，有利水中标记，但是值得注意的是磺酸根是在离去的 NHS 上，不会对标记产物有影响。

表 1. BODIPY 系列染料的光学特性。

BODIPY	产品货号	Ex/Em	$\epsilon^\dagger$	Φ	类似染料
BODIPY 493/503	D10149	500/509	79000		
BODIPY FL	D10120	502/511	92000	0.97	FITC
BODIPY R6G	D10141	528/547	76000	0.96	Rhod 6G
BODIPY 530/550					
BODIPY TMR	D10140	544/570	55000	0.64	TMR
BODIPY 558/568	D10139	560/574	84400	0.68	Cy3
BODIPY 564/570					
BODIPY 576/589					
BODIPY 581/591					
BODIPY TR					Texas Red
BODIPY 630/650					
BODIPY 650/665					Cy5

Ex/Em 荧光最大激发波长和荧光最大发射波长 (nanometer)。Ex/Em 数字不是绝对的，是在特定仪器下，将染料溶在甲醇中测得的，在不同实验室中重复测量时可能会有偏差。

$\dagger$ 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。活化酯更不能在水溶剂中保存。
- 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。
- 荧光染料在白光下可以被激发，缓慢发生光漂白效应，因此应避免强光暴晒染料，尽量避光低温保存。

标记步骤

下面是以标记带 5'末端氨基的 RNA 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** BODIPY 染料的标记一般在混合溶剂（水溶液+有机溶剂）或者纯有机溶剂中进行，视标记对象而定。如果标记对象是 RNA、DNA 核酸或蛋白质等水溶性生物样品，可采用混合溶剂，缓冲水溶液助溶生物样品并提供适合标记反应的 pH 环境（中性偏碱）；有机溶剂助溶 BODIPY 染料。水溶液一般选择在 pH 8.5 左右的缓冲盐溶液，常用反应缓冲盐体系包括 50 mM 的硼酸钠溶液 (50 mM $Na_2B_4O_7$, pH 8.5)、磷酸钠缓冲盐 PBS (0.1 M Na_2HPO_4 , 0.15 M NaCl, pH 7.2-7.5)、 $NaHCO_3$ 溶液 (0.1M $NaHCO_3$, pH 8.3-9.0) 等。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，如果生物样品储存液中含

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。混合溶剂中的有机溶剂一般采用可和水混溶的有机溶剂，比如乙醇、乙腈、DMF 和 DMSO 等。混合溶剂中水溶液和有机溶剂的比例需视反应溶解情况而定，需挑选适合的比例让样品和染料都完全溶解，同时也要兼顾生物样品的稳定性，比如有些蛋白质样品不能耐受高浓度有机溶剂。如果标记对象是小分子或聚合物等耐有机溶剂材料，标记反应也可以在纯有机溶剂体系（比如甲醇、乙腈或者氯仿等）中进行，纯有机溶剂体系可以降低 NHS 活化酯的水解速度，从而在较低的染料/对象比例下实现高效标记（需加入有机碱比如三乙胺促进反应进行）。

- **染料母液配制** BODIPY 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而让 NHS 失活，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进行母液配制。染料一般用无水 DMF 或无水 DMSO 溶解（或者其它有机溶剂），推荐母液浓度为 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。如果采用氯仿配置染料母液（适用于纯有机溶剂标记反应），还需考虑溶解性问题，因为部分 BODIPY 染料，比如 BODIPY TR，在纯氯仿中溶解性有限，需加入少量甲醇或乙醇助溶，因为 NHS 活化酯不会与醇羟基反应，因此醇溶剂的加入不会影响活性。

- **染料标记比例** 为实现高效率标记，在混合溶剂反应体系中，染料/标记对象的摩尔比例一般是 5-10/1，高比例可以抵消部分 NHS 水解损失；纯有机溶剂体系中可以降低到约 3/1。为提高标记效率和速度，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。上述推荐比例仅仅是多美提供的参考比例，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 1-2 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) 将需要标记的末端氨基 RNA 溶液转移到反应小管中，用 PBS 溶液（pH 7.4）稀释至 100 μ L（终浓度 50 μ M）。该实验 RNA 为小片段 RNA，该用量已足够采用醋酸钠/乙醇沉淀法纯化，如果是大片段 RNA，可进一步降低浓度。
- 2) 用无水乙醇配置 BODIPY 染料母液，根据染料标记摩尔比例 10/1，加适量的染料母液（100 μ L）入反应小管中，用移液器上下轻轻打匀混匀。常温下静置或轻微晃动，反应 5 小时，反应时间延长有助于提高标记效率，最多可以常温标记过夜。此次标记，采用乙醇/PBS 水溶液的混合溶剂（v/v, 1/1），可保证 RNA 和染料的完全溶解，此混合液含有机溶剂乙醇比例较高，因为 RNA 结构较稳定，可耐受有机溶剂。对于蛋白质等敏感材料，反应中有机溶剂体积比应控制在 5%左右，如果有大量染料析出，可适量增加体积到 10%或更高些，但需时刻警惕蛋白变性。另外，如果样品较珍贵，或者想追求更高的标记效率（90%），可以考虑进一步提高染料/RNA 标记摩尔比例至 20/1 或更高。
- 3) 标记反应后，纯化的方法较多，对于疏水性 BODIPY 染料，透析法和脱盐柱法比较费劲，因为游离未反应或水解的染料分子不水溶，所以一般采用柱分离法（正相或反相），由于本实验标记对象是 RNA 核酸，可以采用更方便高效的醋酸钠/乙醇沉淀法纯化。具体方法如下：取 20 μ L 的醋酸钠溶液（3M, pH5.2）加入反应中（醋酸钠终浓度 0.3M，约 1/10 体积），混匀后再加入 3 倍体积的无水乙醇。再次混匀，-80 度冰箱放置 5-10 分钟，12000g 离心 2 分钟，移液枪小心吸走上清。再次快速离心一次，将壁上悬挂的残留液体离心到底部，用小枪头底部残留上清吸走，底部带颜色固体为产物，上清也带颜色，为游离的 BODIPY 染料。经过一次沉淀处理后，已除掉绝大部分游离染料，但是底部 RNA 固体中仍然包裹有少量游离染料，为此，用 PBS 缓冲液复溶 RNA 后，再次依照上述步骤沉淀一次。

- 4) 沉淀的固体再次用 100 μ L 的 PBS 复溶，在避光条件下，将纯化后的 RNA 样品储存在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中，一般无需冷冻保护剂。标记后的 RNA 溶液应可见明显颜色，视染料本身颜色深浅而定，比如 BODIPY 493/503 和 BODIPY FL 会较浅一些，而 BODIPY 650 等染料标记 RNA 会较深。

计算标记效率和浓度测定：

染料标记是标准的化学反应，对标记效率和产率的影响因素很多，标记完成后有必要测定标记效率和浓度。以上述 RNA 样品为例，可以通过测定 OD260 计算出 RNA 样品总浓度。同时，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（即已标上染料的 RNA 浓度），再除以 RNA 样品总浓度就可以得到染料标记的效率。需要注意的是染料消光系数值不是绝对的，各种来源的数据会有些不一样，另外，染料本身也在 OD260 贡献了吸收，因此该方法算出的标记程度仅是大概数据。

- 1) 取少量样品用 PBS 稀释，利用石英皿在紫外分光光度计上测出 OD260，计算出 RNA 核酸浓度 (ng/ μ L)，同时根据 RNA 的分子量，计算出 RNA 样品的摩尔浓度 C_{RNA} (mol/L)。
- 2) 查询 BODIPY 染料光学特性表，找到染料最大吸收峰的波长（即 Ex 的数值，比如 BODIPY FL 染料的是 502nm）。在紫外分光光度计上面，采用 1cm 光程的比色皿，测定最大吸收峰的吸收值 A_{max} 。染料对光的吸收很强，测量前一般仅取少量样品稀释后再测吸收值。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) 计算标记效率，即 $n = C_{\text{dye}} / C_{\text{RNA}}$ (%)。注意，务必将 RNA 和染料的浓度换算成统一单位后再计算。

常见问题
