Cyanine 系列染料琥珀酰亚胺酯

产品	英文描述	包装	储存
Cy 系列荧光染料，琥珀酰亚胺活化酯	Cy dye series, succinimidyl esters (se ester, NHS esters)	1mg, 3mg, 5mg, 25mg	-20℃，干燥储存，避光。溶剂溶解后应尽快使用。

产品简介

Cyanine 系列，即花青素系列染料是最常用的荧光染料之一。它荧光很亮，对 pH 不敏感，另外它的荧光母核依赖不同长度的亚甲基桥链实现各种波长的荧光激发和发射，从而可以实现从可见光到近红外光区的荧光覆盖，供研究者灵活选择，比如 Cy3 为黄红色荧光染料，在普通荧光显微镜下肉眼可见，Cy7.5（即 ICG 结构）可用于小动物的近红外体内成像。

Cyanine 系列染料包括普通 Cy 染料和水溶性 Cy 染料，它们具有相同的荧光性质。普通 Cy 染料水溶性较差，但价格便宜，适用于高分子材料、纳米端、小分子等各种标记对象；水溶性 Cy 染料，即 sulfo-Cy，是磺酸化的 Cy 染料，每个染料分子至少含 2 个磺酸离子，水溶性很强，特别适用于标记蛋白质等对疏水结构敏感的标记对象，可用于替代 Alexa Fluor®、DyLight®等染料。

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。Cy 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，可根据染料的水溶性和标记对象的稳定性决定。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），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. Cy 系列染料的光学特性。

Cyanine	产品货号	Ex/Em	ε†	Φ	类似染料
Cy2	D10145	484/504	150000	0.12	
Cy3	D10010	554/566	150000	0.31	TAMRA
Sulfo-Cy3	D10016	550/566	162000	0.10	AF555
Cy3.5	D10011	591/604	116000	0.35	ROX
Sulfo-Cy3.5	D10019	584/604	139000	0.11	AF594
Cy5	D10012	640/664	250000	0.20	BODIPY650/665
Sulfo-Cy5	D10017	649/672	271000	0.28	AF647
Cy5.5	D10013	680/698	198000	0.20	
Sulfo-Cy5.5	D10020	678/706	211000	0.21	AF680
Cy7	D10014	740/770	199000	0.30	
Sulfo-Cy7	D10018	748/774	240600	0.24	
Cy7.5	D10015	784/814	223000	0.10	
Sulfo-Cy7.5	D10021	788/797	222000	0.21	
ICG	D10144	786/822	218000	0.04	

© Duofluor Inc. 2020 – All rights reserved

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℃ 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（≤ 3mM or 0.02%）或 thimerosal（≤ 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** 标记一般在混合溶剂（水溶液+少量有机溶剂）中进行。sulfo-Cy 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。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 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, pH7.2-7.5）, $NaHCO_3$ 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。如果标记对象是高分子、小核酸等耐有机溶剂材料，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** Cy 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进行母液配制。染料一般用无水 DMF 或无水 DMSO 溶解，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。如果对一些特别敏感的蛋白质样品，推荐使用 sulfo-Cy 系列染料，这样可以将染料直接加入反应水溶液体系中，回避使用有机溶剂。
- **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，在混合溶剂反应体系中，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。

© Duofluor Inc. 2020 – All rights reserved

2) 根据染料标记摩尔比例，加适量的染料母液入反应小管中，用移液器上下轻轻打动混匀。常温下静置或轻微混动，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，反应中有机溶剂体积比控制在 5%左右，如果有大量染料析出（疏水性 Cy 染料），可适量增加体积到 10%或更高，如果是磺化染料，也可以在水中直接标记。

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或乙醇沉淀法等方法纯化样品（硫酸铵沉淀法沉淀蛋白适用于蛋白浓度很高的情况，最好 10 mg/ml 以上）。透析时，为了快速的透出染料分子，请采用至少截留分子量 > 10KDa 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 Cy 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 Cy3 染料的是 554nm）。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_{dye} = (A_{max} x 稀释倍数)/消光系数ε，单位是 M（mol/L）。

3) 计算标记程度，即 $n = C_{dye}/C_{protein}$ 。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。

© Duofluor Inc. 2020 – All rights reserved