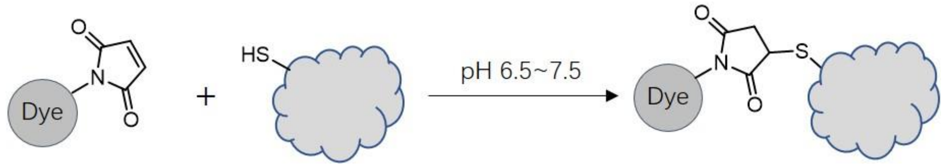
Cyanine 系列染料马来酰亚胺

产品	英文描述	包装	储存
Cy 系列荧光染料，马来酰亚胺	Cy dye series, modified with maleimide	1mg, 5mg, 25mg	-20°C，避光储存。

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。



马来酰亚胺（maleimide）是生物标记反应中常用的反应基团，它可以和巯基（-SH）通过亲和加成反应生成稳定的巯醚（thioester）结构从而实现标记。尽管马来酰亚胺与氨基（比如赖氨酸精氨酸侧链）也有反应性，但在中性或微酸性缓冲液中，马来酰亚胺选择性标记巯基（马来酰亚胺与巯基反应速度比氨基快>1000 倍）。通过控制标记反应中缓冲盐的 pH，Cyanine 染料马来酰亚胺可以很好的选择性标记蛋白质中的巯基，标记反应迅速，选择性高，产率好。关于官能团对巯基的选择性，马来酰亚胺要比另一种常用的巯基标记试剂碘代乙酰胺（Iodoacetamides）要好，碘代乙酰胺除了可以和精氨酸侧链氨基反应外，还可以与组氨酸（Histidine）、甲硫氨酸（Methionine）反应。

马来酰亚胺的标记对象巯基是一种在生物分子中广泛存在的天然官能团，在蛋白中以半胱氨酸（cysteine）和双硫键的形式广泛存在，这为马来酰亚胺染料提供了广泛的应用场景。正因为如此，马来酰亚胺/巯基（maleimide/thiol）标记已成为仅次于 NHS/氨基标记的最常用生物连接反应（bioconjugation）之一。需要注意的是由于蛋白中大部分巯基都是以双硫键的形式存在的，所以标记前都需要用还原剂（比如 DTT、TCEP）处理样品，让巯基以活性巯基（-SH）的方式与马来酰亚胺反应。

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
Cy3	D10034	554/566	150000	0.31	TAMRA
Sulfo-Cy3	D10040	550/566	162000	0.10	AF555
Cy3.5	D10035	591/604	116000	0.35	ROX

© Duofluor Inc. 2020 – All rights reserved

Sulfo-Cy3.5	D10041	584/604	139000	0.11	AF594
Cy5	D10036	640/664	250000	0.20	BODIPY650/665
Sulfo-Cy5	D10042	649/672	271000	0.28	AF647
Cy5.5	D10037	680/698	198000	0.20	
Sulfo-Cy5.5	D10043	678/706	211000	0.21	AF680
Cy7	D10038	740/770	199000	0.30	
Sulfo-Cy7	D10044	748/774	240600	0.24	
Cy7.5	D10039	784/814	223000	0.10	
Sulfo-Cy7.5	D10045	788/797	222000	0.21	

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

- 马来酰亚胺对湿气不敏感，因此，Cyanine 系列马来酰亚胺染料可以配成有机溶液或者水溶液在-20℃冰箱长期保存。虽然马来酰亚胺比 NHS 活化酯稳定，但是它仍然属于比较脆弱的化学官能团，不要将它长时间放置于室温或者 4℃环境，不要将它储存在偏酸性或偏碱性缓冲液中，优先储存于 DMF、DMSO 等有机溶剂中。
- 马来酰亚胺标记后生成的巯醚键比较稳定，但是马来酰胺巯醚中的酰胺键存在发生可逆水解的可能，水解的比例很小，并且一般仅仅一个酰胺键水解开环，所以标记的染料不会丢失，不影响标记效果。如果 Cyanine 马来酰亚胺标记的是蛋白 N 头端的 Cyanine 巯基，巯醚产物可能会发生重排反应（Chemistry, 2020 Dec 4; 26(68):15867-15870），了解更多请到 www.duofluor.com 多荧®文档中心。
- 马来酰亚胺在中性缓冲盐中可以和叠氮化合物发生 1,3 环加成反应，反应速度较慢，但也可在十几个小时后反应完全，因此马来酰亚胺可与叠氮化物短暂共处，但不可混合保存。

标记步骤

下面是以标记蛋白质为例，讲述马来酰亚胺对巯基的常规标记方法。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** 马来酰亚胺的标记可以在纯有机溶剂中，也可以在缓冲盐水溶液中进行，更多的是在混合溶剂（水溶液+少量有机溶剂）中进行。反应溶剂的选择往往根据标记对象决定，如果巯基是在小分子化合物或者疏水性纳米粒表面，就可以在有机溶剂比如甲醇、DMF 中进行；如果是标记生物大分子，推荐在水溶液或者混合溶液中进行（一般 10-100 mM 磷酸盐、Tris、HEPES 等缓冲盐）。Sulfo-Cy maleimide 由于水溶性强，不需要有机溶剂助溶，可在纯水溶液中标记，避免有机溶剂对生物样品的刺激和伤害；普通 Cy 系列马来酰亚胺则需要有机溶剂的助溶（一般 DMF 和 DMSO）才可以标记生物分子。马来酰亚胺在 pH 6.5~7.5 时对巯基的选择性最强。在该 pH 下，蛋白质的氨基都处于质子化状态，反应性较低，不会和马来酰亚胺发生亲和加成反应，而巯基在该条件下不受影响，反应速度比氨基快>1000 倍，因此在这种微酸性和中性条件下，染料几乎都是标记在蛋白质巯基上。
- **巯基活化或双硫键还原** 蛋白质中的巯基很多以氧化形式（即双硫键）存在，它们不具有亲和性，不能和马来酰亚胺反应。为了提高标记效率，在标记前往往利用还原剂（比如 DTT、TCEP）对蛋白样品进行还原处理。如果用的是 DTT，标记染料前需要将 DTT 除去，因为 DTT 本身含有巯基，也会和染料的马来酰亚胺反应。一般可以用透析法或者凝胶除盐柱法除去 DTT。

© Duofluor Inc. 2020 – All rights reserved

TCEP 也可以与马来酰亚胺反应（ACS Omega 2017, 2, 9, 5785–5791），但是反应速率较慢，一般不影响标记，因此 TCEP 还原双硫键后可以直接加入马来酰亚胺染料标记，但是必须注意 TCEP 的使用浓度不宜过高，一般以 0.5 mM 以下为宜，太高会让标记效率大大降低。TCEP 也和碘代乙酰胺兼容，但是会和 Bimanes 等卤烷类巯基标记试剂反应。活化后的样品应该尽快使用，以免被空气中氧气氧化。

- **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 10-20/1。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。

标记反应步骤：

1) 将需要标记的蛋白质用缓冲液稀释到蛋白浓度为 50-100μM，缓冲液可为 10-100 mM 的磷酸缓冲液、Tris、HEPTES 缓冲液均可。缓冲液 pH 严格控制在 pH 6.5-7.5 之间，以保证马来酰亚胺对巯基官能团的高选择性。
2) 如果蛋白中的巯基是游离的，可直接进行第 3 步。如果想还原双硫键进行标记，或者活化巯基以便提高反应效率，可以向蛋白溶液中加入 10x 蛋白浓度的 TCEP，以活化巯基。如果采用 DTT 或者 2-ME 活化巯基，需要透析或沉淀或凝胶分离除去还原剂。
3) 将马来酰亚胺染料用有机溶剂（DMF 或者 DMSO）或者水溶液（仅适用于 Sulfo-Cy）稀释到 1-10mM。取 10-20 当量的染料加入到蛋白溶液中。由于有机溶剂容易致使蛋白变性，所以反应体系中有机溶剂含量不要超过 10%（体积比）。如果染料为普通 Cy 染料，可能会有沉淀出现，这一般是由于染料的低水溶性而析出了。
4) 反应在常温下孵育 2 小时或者 4 度过夜，孵育时可在翘班摇床上轻微摇晃，同时锡箔纸包裹避光。反应结束后，高速离心除去未溶解染料或其它沉淀物，取上清进行下一步纯化。如果蛋白质本身比较稳定，可以标记反应更长时间，甚至常温孵育过夜，以期达到最大的标记效果。
5) 采用透析法除去未反应的染料小分子，或者用凝胶柱分离，比如 Sephadex G15 或者 G-25，除去染料分子，得染料标记蛋白。

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）。注意，由于 BCA 仅仅能测出相对浓度，可能和实际真实数值有较大差距，所以根据下面公式得到的蛋白/染料比可能会有出入。

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，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，$C_{dye} = (A_{max} \times$ 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