

## 罗丹明系列染料琥珀酰亚胺酯

| 产品                 | 英文描述                                                            | 包装             | 储存              |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|
| 罗丹明系列荧光染料，琥珀酰亚胺活化酯 | Rhodamine dye series, succinimidyl esters (SE ester, NHS ester) | 1mg, 5mg, 25mg | -20°C, 干燥储存，避光。 |

### 产品简介

罗丹明染料是一类 3',6'双胺化的咕吨类 (Xanthene) 荧光染料。和羧化咕吨类染料 (荧光素) 一样，罗丹明具有很高的量子产率，消光系数也挺高，因此罗丹明类染料都非常明亮，很多染料溶液的荧光在白光下即肉眼可见。罗丹明的荧光具有良好的 pH 稳定性，在 pH 4~9 的生理条件下基本都稳定输出明亮的荧光。因为胺化染料很容易结构多样化，因此罗丹明具有非常繁多的化学结构，不同结构往往会具有不同的吸收波长和发出不同颜色的荧光，因此可选用的罗丹明类染料非常多，基本可以覆盖全部可见光光谱，使其成为非常常用的荧光标记染料。罗丹明染料通过和其它染料搭配，可以实现各种多重染色，标记，追踪，常常用于 DNA 测序，荧光免疫，微阵列的各种生物实验中。罗丹明特别适合于核酸分子和高分子的标记，比如各种 DNA 引物和葡聚糖 (dextran) 片段等的标记，可能是由于其良好的化学稳定性，可耐受各种化学反应条件 (如固相合成)。大多数罗丹明水溶性较差，标记蛋白时容易产生蛋白聚集，荧光淬灭等问题，需注意甄别或选择其它水溶性荧光分子。

文献中已报道的罗丹明类染料结构非常多，科研工作者根据颜色和荧光性能挑选了 10 多种作为常用罗丹明标记染料，出现于各种文献和技术资料中。这些罗丹明染料主要分为两类，一类是在氧杂蒽母环上胺基的衍生，比如罗丹明绿 (Rhodamine green)，罗丹明 6G (Rhodamine 6G)，四甲基罗丹明 (Tetramethylrhodamine, TAMRA) 和 X-罗丹明 (X-rhodamine, ROX)，这些染料随着胺基衍生结构的复杂化，荧光颜色逐渐红移，染料荧光主要以绿色、黄色和红色为主，适用于各种常见荧光实验；另一类是氧杂蒽母环下苯基底环的磺化衍生，以 Rosamine 为代表，包括罗丹明红 (Rhodamine red) 和 德州红 (Texas red)。罗丹明标记主要是利用底环上的苯甲酸或苯磺酸官能团，可衍生出 NHS 活化酯、氨基、马来酰亚胺、叠氮等各种活性标记基团。但是在合成路线中，第一类罗丹明会异构成 5 位或 6 位苯甲酸异构体，因此这类罗丹明标记染料常常以 5/6 位异构混合物或者单独异构纯的方式售卖。第二类罗丹明也有类似的异构问题，主要是标记官能团在底环 2 位或 5 位苯磺酸的非定点磺酰化造成。因此两类罗丹明类染料都存在异构体的问题，但是同种罗丹明的异构体具有近似的荧光性质和反应活性，使用起来没有区别，仅仅是产物在 HPLC 色谱柱分离上会不同，混合异构罗丹明可能会出现两个产物峰，而异构纯罗丹明是单个峰。另外，异构纯的合成成本更高，价格更贵些。

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。罗丹明染料琥珀酰亚胺酯以固体的形式实现稳定储存，可随时与有机溶剂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/有机溶剂的混合溶剂中进行，根据标记对象的溶剂相容性决定。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，比如和苯胺基、酚羟基、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. 罗丹明系列染料的光学特性。

| 罗丹明       | 产品货号   | Ex/Em (nm) | $\epsilon^\dagger$ | $\Phi$ | 类似染料                 |
|-----------|--------|------------|--------------------|--------|----------------------|
| Rhod G    | D10076 | 503/528    | 76000              | 0.79   | FITC, BODIPY FL, Cy2 |
| Rhod 6G   | D10080 | 525/547    | 116000             | 0.95   |                      |
| TAMRA     | D10083 | 543/572    | 95000              | 0.1    | Cy3, BODIPY TMR      |
| Rhod B    | D10088 | 543/580    |                    |        | Cy3, BODIPY TMR      |
| Rhod Red  | D10096 | 561/578    | 117000             |        |                      |
| ROX       | D10089 | 568/595    | 91000              | 1.0    | Cy3.5, AF568         |
| Texas Red | D10107 | 595/613    | 85000              | 0.79   | AF594                |

Ex/Em 荧光最大激发波长和荧光最大发射波长 (nanometer)

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

## 重要产品信息

- 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），因为溶剂中残留的极微量水也会让活化酯缓慢水解。
- 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。
- 很多标记对象，即伯胺基团，是以铵离子盐 ( $R-NH_3^+$ ) 的形式存在的，其本身不具备亲和反应性，不能和 NHS 活化酯反应，必须被弱碱（比如三乙胺）或中性缓冲液中和后才会反应，因此反应体系中必须保证弱碱的用量或者缓冲液的缓冲强度。
- 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。
- 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。活化酯固体一般可在  $-20^\circ C$  下长期保存，使用前请预先从冰箱中取出，平衡到常温后再打开瓶盖。

## 标记步骤

下面是以标记高分子葡聚糖 amino-dextran (40 kDa) 为例，讲述罗丹明 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** 标记反应可以采用纯有机溶剂体系（比如 DMSO，染料和 dextran 都可以很好的溶解于 DMSO）或者有机溶剂/缓冲液混合体系（比如 DMF/PBS，利用 DMF 助溶染料）。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。由于 dextran 本身很稳定，可耐受有机溶剂，本示例采用较高有机溶剂比例的 DMF/PBS (v/v=1/2) 体系，以保证反应体系中染料的完全溶解。

• **染料母液配制** 染料的 NHS 活化酯对湿气很敏感。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。染料 NHS 活化酯不建议配置母液，而是单次直接使用，如果母液有剩余，可短暂保存于低温冰箱。罗丹明母液可以用 DMF、DMSO、乙腈、甲醇等有机溶剂溶解，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。

• **染料标记比例** 为实现每个高分子标记大于 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 5-10/1；个别情况可以降低到约 3/1。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，比如标记大分子 dextran，dextran 的浓度最好在 1-10mg/ml，或者更高。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，dextran 浓度高时，NHS 活化酯更多机会碰撞到氨基，反应机会多，效率就高。上述推荐比例仅仅是多荧<sup>®</sup>提供的参考比例，具体比例需根据个人预实验摸索后决定，因为标记的效率与对象结构、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。标记后以每个对象分子上偶联 1-4 个染料为最佳（视标记对象分子大小和实验需要而定），标记过多可能会影响稳定性或者荧光淬灭，严重时可能会沉淀。

#### 标记反应步骤：

- 1) 将 50mg amino-dextran 溶于 500  $\mu$ L 的 PBS 中，将 dextran 溶液转移到反应小管中，用试剂检测溶液 pH 值，以确保其为 pH ~ 7.4。
- 2) 根据染料/dextran 标记摩尔比例，取准确体积的染料母液，补加 DMF 至 250 $\mu$ L，与上述步骤 1 中 dextran 溶液混合，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。常温下静置或翹班摇床轻微晃动（更佳），避光反应 1-5 小时，反应时间延长有助于提高标记效率，可标记过夜。注意：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%，反应时间也可视情况缩短。
- 3) 利用透析法，除去未标记的游离染料分子。透析前需对反应样品进行预处理：加入 1.5 ml 的 PBS 或者去离子水，反应会出现沉淀，该沉淀为游离的罗丹明染料，加水后因为水溶性不足而沉淀出来，而标记产物 Rhod-dextran 水溶性强不会析出。10,000g 高速离心后取上清加入透析袋中透析。为了快速的透出染料分子，请采用至少截留分子量 > 10KDa 的透析袋常温透析，最好每 4 个小时更换透析液，重复更换 3 次。随着透析袋内 DMF 溶剂分子的透出，可能会有更多的游离罗丹明染料分子沉淀出来，离心取上清换透析袋再透析，直到样品没有沉淀、无染料透出为止。凝胶过滤法，比如除盐柱，也可以纯化标记产物，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 dextran 样品储存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱，可至 1 个月。或者放入 -20 $^{\circ}$ 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 $\epsilon$ 。通过测定最大激发峰（即最大吸收峰）的吸收值，并结合这个 $\epsilon$ 参数，可以精确计算出染料分子的浓度，再除以 dextran 的浓度就可以得到染料标记的程度（即每个高分子平均标记了几个染料分子）。

- 1) 根据投料量估算出 dextran 浓度，并根据 dextran 分子量，计算出 dextran 样品的摩尔浓度  $C_{\text{dextran}}$ 。
- 2) 查询首页的罗丹明染料光学特性表，找到染料最大吸收峰的波长（即  $\lambda_{\text{ex}}$  的数值，比如 Rhod G 染料的是 503nm）。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  $A_{\text{max}}$ 。染料对光的吸收很强，测量前一般要将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  $n = C_{\text{dye}}/C_{\text{dextran}}$ 。注意，务必将 dextran 和染料的浓度换算成统一单位后再计算。