

产品说明书

产品名称: Cy5-E, SE [Cyanine 5-ethyl, succinimidyl ester]

产品货号: BN15045

产品规格: 1 mg

应用范围: 荧光标记染料

产品参数

外观: 可溶于有机溶剂、如 DMSO, DMF 的紫色固体

Ex/Em: 646/662 nm

贮存条件: -20°C 避光保存

保质期: 12 个月

分子量: 721

消光系数: 250,000

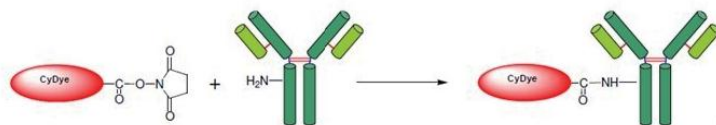
可用于直接替代: Alexa Fluor 647, TRITC, DyLight 549 等

产品介绍

菁染料是性能优良的荧光染料, 摩尔吸光系数在荧光染料中是无可比拟的, 其琥珀酰亚胺酯是常用的脂肪氨基标记试剂, 广泛用于蛋白、抗体、核酸及其他生物分子的标记和检测。通过改变双键的长度, 可改变其荧光发射波长, 每增加一个双键, 按照 Huoffman 规则正好红移约 100 nm。

水溶性菁染料 Cy3 和 Cy5 已成为基因芯片的普遍荧光标记物; 另外, Cy5, Cy5.5 和 Cy7 的吸收在近红外区背景非常低, 是荧光强度高、稳定性较好的长波长染料。特别适合于活体小动物体内成像代替放射性元素。

菁染料和生物分子的比例 F/P=4~12 之间荧光强度较好, F/P 值过高荧光探针会自我淬灭并影响生物分子的生物活性, 标记生物分子普遍使用单琥珀酰亚胺酯, 但是用双修饰的 Cy Dye SE 并没有发现交联。Cy Dye SE 标记抗体在 pH (8.5~9.4) 时 10 分钟 F/P 可达 5~6, 而在 pH 7.0 几乎不反应。我们用不同比例的 Cy3 标 anti-glutathione-S-transferase (GST) 多克隆抗体发现用 1:1, 5:1, 10:1 和 20:1 标记时得到的 F/P 值分别是 0.28:1, 1.16:1, 2.3:1 和 4.6:1。



菁染料琥珀酰亚胺酯(Cy Dye SE)的标记

操作方法

1. Cy dye SE 标记蛋白 (常规方法)

(1) 制备染料储存液

室温预热一管 1 mg 的 Cy dye SE, 在管中加入 0.122 mL 的无水 DMSO 或 DMF (不含游离), 配制浓度为 10 mM 的染料储存液。适当条件下, 可以涡旋以便充分溶解染料。如果使用更微量的蛋白进行标记反应, 那么染料需要稀释至更低浓度。

注: 1) 剩余的染料储存液应于 -20°C 低温存放, 以备后续使用。如果使用无水 DMSO 配制染料储存液, 那么染料至少可以保存一个月。

(2) 计算染料用量

$$\text{Cy dye SE 染料用量}[\text{mg}] = 8 \times \text{标记蛋白质量} \times \text{Cy dye SE 染料分子量} / \text{标记蛋白分子量}$$

■ 8, 染料蛋白摩尔比, 是一个实验经验值, 适用于常规的蛋白、多肽标记;

(3) 确定反应体积

染料标记可以在不同标记规模下进行, 从 nmole 到 g 水平均可, 当标记量较少时, 采用小体积进行 (如 10-20uL), 蛋白浓度控制在 1-10mg/mL 效果较好。

(4) 用 1/10V 的 DMF 或无水 DMSO 溶解反应所需的 Cy dye SE 染料。

(5) 用 9/10 体积的 pH 8.3-8.5 的缓冲液重悬待标记蛋白。

推荐使用 pH 8.3 的 0.1 M 碳酸氢钠溶液，或者 0.1 M 磷酸盐缓冲液。注意 pH 控制在 8.3-8.5 之间。避免使用含有胺的缓冲液（有时可以使用 Tris，但不推荐使用）。

注意：当进行大规模标记（几百毫克 SE 酯）时，注意到由于 SE 酯的水解，混合物随时间趋于酸化。需要监测 pH 值，或使用更浓的缓冲液。

（6）将染料加入蛋白溶液中，并涡旋混匀，冰上过夜或室温反应至少 4h。

（7）选用适当方法纯化染料-蛋白共轭物

凝胶过滤式普遍使用的一种大分子物质的方法，另外，也可以选择沉淀或色谱法分离提纯，针对蛋白或核酸的纯化，也可选择乙醇或丙酮沉淀的方法。

（8）计算染料-蛋白共轭物浓度，F/P 值

染料-蛋白共轭物浓度的确定

可通过以下公式计算： $C(\text{mg/mL}) = \{[A_{280} - (A_{\text{max}} \times C_f)] / \epsilon\} \times$ 稀释因子。

- C 是指染料-蛋白共轭物浓度；
- 稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数；
- A_{280} 和 A_{max} 分别是指在 280 nm 处的吸光度以及在吸收波长处的吸光度；
- C_f 是校正因子，YF® SE 染料的 C_f 值请参考上面表格；
- ϵ 则是指蛋白（mL/mg）的消光系数；

注：过柱洗脱的蛋白溶液直接用于吸光度检测可能浓度过大，因此需要稀释到大约 0.1 mg/mL。稀释倍数（即稀释因子）需要从起初抗体数量（比如 5 mg）以及蛋白液洗脱的总体积来进行预估。

F/P 计算：

如 Cy5 在 650 nm 的摩尔吸光系数为 $250000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，所用蛋白在 280 nm 处的摩尔吸光系数为 $170000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ；Cy5 在 280 nm 处的吸收是 650 nm 处的 5%。按以下公式计算 F/P 值。

$$[\text{Cy5 dye}] = (A_{650})/250000$$

$$[\text{peptide}] = [A_{280} - (0.05 \times A_{650})]/170000$$

$$\begin{aligned} \text{F/P final} &= [\text{dye}]/[\text{peptide}] \\ &= \{0.68 \times A_{650}\} / \{A_{280} - (0.05 \times A_{650})\} \end{aligned}$$

2. 水溶性 Cy Dye SE 标记 OLIGO

氨基封端的 OLIGO 可以标记 Cy Dye SE，但是非常困难，标记前因为 OLIGO 经氨水脱保护，请务必洗涤掉所有的残余氨水。然后将样品真空干燥；然后溶于 0.25 ml 的 0.5 M NaCl 溶液中，用 Sephadex G-50 脱盐，用 5.0 mM borate 缓冲液平衡到 pH=8.0，然后用以上硼酸缓冲液冲下 OLIGO。然后浓缩至干的样品，溶于 0.1 M carbonate buffer (pH 8.5-9.0)；在 0.5mL 碳酸缓冲液中 30 nmoles 的 OLIGO 加入到 Cy Dye SE 的玻璃瓶中室温避光，密闭搅拌反应 60min。反应物经 Sephadex G-50 或 RP-HPLC 过柱纯化，冷冻干燥后避光保存。

注意：Oligonucleotides 和 oligopeptides 由于太小经常会留在过滤膜上或在冻存管内贴壁成膜，而无法标记。

3. 活体成像领域

SPF 级 BALB/C 裸鼠，6~8 周龄，18~20 g，实验前 24 h 自由进食、饮水。于实验裸鼠腹腔内注射 2%戊巴比妥钠 300 μL (215 mg/kg) 麻醉动物。将裸鼠俯卧位平放于小动物多光谱活体成像系统的记录暗箱中。实验时将 Cy7 -E SE 或 Cy7 -E SE 标记的生物分子或药物 DMSO 稀释后，于裸鼠尾静脉注射 200 μL (0.5 mg/g) [合适的用量和时间需要客户根据自己的仪器和药物试剂等条件优化]，每 5min 记录 1 张动物在体内发射荧光的成像图片，分析荧光药物的分布情况。对照鼠不注射药物，进行同时记录。记录结束后迅速解剖裸鼠的心、肝、脾、肺、肾等脏器，进行成像。

Cy7 -E SE 检测时激发波长 700~770 nm 带通，发射波长 790 nm 长通。液晶可调谐滤光片扫描范围 780~950 nm，扫描步进 10 nm。曝光时间为 500 ms。

不同的药物代谢时间不一样，注射入裸鼠体内，荧光立即分布全身，然后逐步向膀胱聚集，呈现显著的肾排泄的特点一般 4-6 小时，快得只有 30 分钟；如果是骨骼等部位靶点的 Cy7 -E SE 标记药物，有客户反映一周后活体成像系统仍能检测到荧光成像。

器官切片观察：将解剖的器官迅速放置于 4% Paraformaldehyde 固定 4 小时以上，0%，20%，30%PBS 蔗

糖依次沉底，20 μ m 切片，多聚赖氨酸洗过的载玻片贴片，
晾干，DAPI 染色。共聚焦显微镜观察，激光器为氦氖 633
nm。

注意事项

1. 未开封的粉末在避光干燥-20 $^{\circ}$ C 存放 12 月。任何溶解后的
Cy SE 粉末最好立即使用。
2. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧
光淬灭。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。