

Cyanine5 NHS Ester Cy5 NHS 酯 (脂溶性)

产品编号	产品名称	包装规格
NBS5914-1mg	Cyanine5 NHS Ester Cy5 NHS 酯 (脂溶性)	1mg
NBS5914-5mg	Cyanine5 NHS Ester Cy5 NHS 酯 (脂溶性)	5mg

产品简介:

花菁类染料 (Cyanine Dyes) 是一种在两个氮原子间含聚亚甲基桥键且携带一非定域电荷的分子。归其结构特征, 花菁素具有极其高的消光系数通常高于 $100,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。不同的替代基允许控制发光团的性能比如吸光波长, 光稳定性和荧光强度。例如, 通过选择不同长度的聚亚甲基桥键能够控制吸光和荧光波长: 花菁素越长, 吸光和发射波长更高, 高达至近红外区。

在生命科学领域广受欢迎的花菁类染料由美国卡耐基梅隆大学 (CMU) 的 Alan Waggoner 教授和同事于二十世纪 90 年代早期研发应用。这些染料呈现出低的生物分子非特异性结合, 并由其巨大的消光系数和良好的量子产量产生明亮的荧光。目前商业化可提供各种反应性衍生物, 比如点击化学用的 N-羟基琥珀酰亚胺酯, 马来酰亚胺, 叠氮化物和其他衍生物。

目前花菁染料常以两种异构体的形式供应: 一种非磺化的花菁类染料和磺化的花菁类染料, 对于许多应用, 两种是可以互相替换的, 因其光谱属性基本相同。两种染料都可用于 DNA 和蛋白质等生物分子的标记。两者的区别在于溶解度: 磺化染料具水溶性, 可以在水环境中标记, 无需有机共溶剂, 且在水中不易聚集。

Cyanine5 是一种脂溶性的, 红色发射波长的荧光染料, 与各种仪器兼容, 包括许多荧光显微镜、成像仪、扫描仪和荧光酶标仪。Cyanine5 NHS Ester 是 Cyanine5 的胺反应活化酯, 用于标记多肽、蛋白和寡核苷酸的氨基基团, 其标记体系内需要少量的有机共溶剂 (比如 DMF 和 DMSO)。Cyanine5 NHS Ester 非常适用于低成本标记可溶性蛋白以及各种多肽和寡核苷酸。也适用于有机溶剂内对小分子的标记。对于要求更严格的靶标比如易降解蛋白, 当反应体系不能使用 DMF 或 DMSO 时, 建议使用水溶性的 Sulfo-Cyanine5 NHS Ester (货号: NBS5905)。

产品特性:

1) 同义名: Cyanine5 NHS ester; Cy5 NHS ester; Cy5 SE; Cyanine5 N-hydroxysuccinimide ester; Cy5 琥珀酰亚胺酯; Cy5 NHS 酯;

- 2) 纯度: $\geq 95\%$
- 3) 外观: 深蓝色粉末或固体
- 4) 溶解性: 溶于 DMF, DMSO, 几乎不溶于水
- 5) Ex/Em: $\sim 646/664$ nm
- 6) 消光系数: $250,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
- 7) 光谱相似染料: Alexa Fluor® 647, DyLight™ 649

保存条件:

-20°C 避光干燥保存, 2 年有效。

产品使用:

【注意】: Cy 染料和生物分子的比例 (F/P) = 4~12 之间荧光强度最高。F/P 过高, 荧光探针会自我淬灭并且影响生物分子的活性。CyDye NHS 在 pH 8.5~9.4 内标记抗体 10min, F/P 可达 5~6。但在 pH 7.0 内几乎无反应。我司内部使用 Cy3NHS 标记 Anti-GST 抗体发现按 1:1, 1:5, 1:10, 和 1:20 标记得到的 F/P 分别为 0.28:1, 1.16:1, 2.3:1 和 4.6:1。

一、水溶性 Cy3NHS 标记 Anti-GST 抗体【其它 CyDye NHS 参考此方法进行并做适当摸索】

商业化购买的抗体如果含有其他蛋白 (如血清白蛋白, 明胶等), 或溶于带氨基的缓冲液, 会影响标记。需在标记前对抗体进行纯化。

1. 于 1L 0.15M NaCl 溶液中透析 Anti-GST (0.5ml, 3mg/ml), 室温或 4°C 透析 4h。
2. 换用 1L 新鲜的 0.15M NaCl 溶液, 4°C 透析过夜。
3. 第二天再换用 1L 0.1M NaHCO₃ (pH 8.3), 4°C 透析 4h。
4. 【可选】用 0.22 μ m 低吸附滤膜过滤透析后的抗体溶液。
5. 用 0.1M NaHCO₃ (pH 8.3) 稀释少量的抗体, 于 280nm 测其紫外吸收值并计算标记抗体的总量 (IgG 抗体摩尔吸光系数为 170,000 at 280nm)。
6. 用 DMSO 配制 Cy3 NHS (MW:765.95), 浓度为 10mg/ml。根据 CyDye NHS 和抗体的使用比值 (比如 1:20) 来计算所需要染料的体积。然后慢慢将其加入到抗体溶液中, 同时于暗处低速搅拌, 室温 45min。
7. 用 1L 0.15M NaCl 溶液, 常温或 4°C 避光透析 4h, 以除去未标记上的 Cy3 NHS。
8. 换用新鲜的 1L 0.15M NaCl 溶液, 4°C 避光透析过夜。
9. 换用 1L 0.01M PBS/0.01% NaN₃ 溶液室温或 4°C 避光透析 4h, 然后在 4°C 避光再次透析过夜。
10. 【可选】用 0.22 μ m 低吸附滤膜过滤透析后的抗体溶液。
11. 用 0.01M PBS/0.01% NaN₃ 溶液整数倍稀释标记抗体, 测定 280nm (蛋白) 和 552nm

(Cy3) 处的紫外可见吸光度。

12. 产品冷冻干燥成粉末或置于 0.01M PBS/0.01% NaN₃ 溶液中, -20℃避光保存。

【F/P 计算】:

Cy3 在 552nm 下的摩尔吸光系数为 150,000L·mol⁻¹·cm⁻¹, 此蛋白在 280nm 的摩尔吸光系数为 170,000 L·mol⁻¹·cm⁻¹, 不同蛋白的摩尔吸光系数不同。Cy3 本身在 280nm 处的吸收是 552nm 处的 8%。按照以下公式计算 F/P 值。

$$[\text{Cy3}] = A_{552}/150000; [\text{Antibody}] = [A_{280} - (0.08 \times A_{552})]/170000$$

$$F/P_{\text{final}} = [\text{Cy3}] / [\text{Antibody}] = [1.13 \times A_{552}] / [A_{280} - (0.08 \times A_{552})]$$

二、水溶性 Cy5 NHS 标记 (D-ser2) - Leu-Enkephalin 【其它 CyDye NHS 参考此方法进行并做适当摸索】

1. 低温保存的 Cy5 NHS 置于室温回温至少 20min。往 1mg 粉末内加入 400μl 高品质无水 DMSO 充分溶解。同样, 低温保存的玻璃瓶装的 (D-ser2) - Leu-Enkephalin (YSGFLT, 0.75mg)室温回温后加入 400μl 高品质无水 DMSO 充分溶解。将 400μl Cy5 NHS 加入 400μl 多肽内。【染料与多肽通常质量比 1:1】。

2. 再加入 15μl 三乙胺, 常温避光搅拌反应混合物, 过夜。【若多肽稳定性较弱, 则于 4℃反应过夜】。

3. 用 HPLC 纯度多肽。使用 C18 柱子 (25cm×10mm), 每次上样注入 2×400μl, 30min 梯度洗脱从 0.1% TFA 水溶液到 MeCN:H₂O (0.1% TFA)=70: 30, 流速 4ml/min。(对不同的多肽选择不同的合适 HPLC 梯度流动相)

4. 收集适当的色带峰, 标记多肽的保留时间比未标记的多肽长。

5. 产品冷冻干燥成粉末或置于水溶液中, -20℃避光保存。必要时可用质谱表征。

6. CyDye 标记的蛋白/多肽稳定性取决于蛋白本身。例如标记的 IgG 在 4℃可避光保存 2 月, 更长保存需加入等体积甘油-20℃避光保存。

【F/P 计算】:

Cy5 在 650nm 下的摩尔吸光系数为 250,000L·mol⁻¹·cm⁻¹, 此蛋白在 280nm 的摩尔吸光系数为 170,000 L·mol⁻¹·cm⁻¹, 不同蛋白的摩尔吸光系数不同。Cy5 本身在 280nm 处的吸收是 650nm 处的 5%。按照以下公式计算 F/P 值。

$$[\text{Cy5}] = A_{650}/250000; [\text{Peptide}] = [A_{280} - (0.05 \times A_{650})]/170000$$

$$F/P_{\text{final}} = [\text{Cy5}] / [\text{Peptide}] = [0.68 \times A_{650}] / [A_{280} - (0.05 \times A_{650})]$$

注意事项:

1. Cyanine5 NHS Ester 是脂溶性的, 先用有机溶剂如 DMSO, DMF 配制成母液后, 再加入水溶性反应溶液内。纯有机溶剂的母液置于-20℃避光保存, 最好 2 周内用完, 避免反

复冻融。水溶性反应液必须现配现用，尽快用完。

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装规格
NBS5900-1mg	<u>Sulfo-Cyanine3 Carboxylic Acid 磺化 Cy3 羧酸（水溶性）</u>	1mg
NBS5901-1mg	<u>Sulfo-Cyanine5 Carboxylic Acid 磺化 Cy5 羧酸（水溶性）</u>	1mg
NBS5902-1mg	<u>Sulfo-Cyanine5.5 Carboxylic Acid 磺化 Cy5.5 羧酸（水溶性）</u>	1mg
NBS5903-1mg	<u>Sulfo-Cyanine7 Carboxylic Acid 磺化 Cy7 羧酸（水溶性）</u>	1mg
NBS5904-1mg	<u>Sulfo-Cyanine3 NHS Ester 磺化 Cy3 NHS 酯（水溶性）</u>	1mg
NBS5905-1mg	<u>Sulfo-Cyanine5 NHS Ester 磺化 Cy5 NHS 酯（水溶性）</u>	1mg
NBS5906-1mg	<u>Sulfo-Cyanine5.5 NHS Ester 磺化 Cy5.5 NHS 酯（水溶性）</u>	1mg
NBS5907-1mg	<u>Sulfo-Cyanine7 NHS Ester 磺化 Cy7 NHS 酯（水溶性）</u>	1mg
NBS5908-1mg	<u>Cyanine3 Carboxylic Acid Cy3 羧酸（脂溶性）</u>	1mg
NBS5909-1mg	<u>Cyanine5 Carboxylic Acid Cy5 羧酸（脂溶性）</u>	1mg
NBS5910-1mg	<u>Cyanine5.5 Carboxylic Acid Cy5.5 羧酸（脂溶性）</u>	1mg
NBS5911-1mg	<u>Cyanine7 Carboxylic Acid Cy7 羧酸（脂溶性）</u>	1mg
NBS5912-1mg	<u>Cyanine7.5 Carboxylic Acid Cy7.5 羧酸（脂溶性）</u>	1mg
NBS5913-1mg	<u>Cyanine3 NHS Ester Cy3 NHS 酯（脂溶性）</u>	1mg
NBS5914-1mg	<u>Cyanine5 NHS Ester Cy5 NHS 酯（脂溶性）</u>	1mg
NBS5915-1mg	<u>Cyanine5.5 NHS Ester Cy5.5 NHS 酯（脂溶性）</u>	1mg
NBS5916-1mg	<u>Cyanine7 NHS Ester Cy7 NHS 酯（脂溶性）</u>	1mg
NBS5917-1mg	<u>Cyanine7.5 NHS Ester Cy7.5 NHS 酯（脂溶性）</u>	1mg