

Super Flour 647, succinimidyl ester

产品介绍

Super Flour 647, SE 是一种可标记蛋白或其他具有胺基的生物分子的深红色荧光染料。功能类似于 Alexa Fluor 647, Cy5 及 DyLight™ 649, 但因其有着更高的量子范围和极好的水溶性, 使得它有更好的蛋白染色效果。此外, ALEXA FLUOR 647, SE 有超强的光稳定性, 因而更适用于共聚焦和单分子成像检测。Super Flour 647, SE 的这些性质使其成为最好的蛋白和核酸染料。

产品包装: 1 mg

储存条件: -20°C 避光干燥可保存12个月。

应用范围: 标记蛋白 / 抗体 / 胺基化合物

产品参数

Ex/Em: 650/665 nm; 分子量: ~1259; 消光系数: 240000;

可用于直接替代: Cy5, Alexa Fluor 647 and DyLight 649 等

使用方法 (以标记 IgG 抗体为例)

1、实验材料

IgG: IgG 不可含有可与染料反应的胺类化学物质, 如: 氨基酸, Tris 等。如果 IgG 中含有此类化学物质, 必须用 pH~7.4 的 PBS 缓冲液预先透析处理。叠氮类化合物的存在 不会影响标记反应。

Super Flour 647, SE; NaHCO₃; 葡聚糖凝胶 G-25 透析柱; PBS 缓冲液 (pH~7.4); NaN₃; BSA

2、标记方法和步骤

2.1 准备标记抗体 用 2mL 0.1 M NaHCO₃ 溶液 (pH~8.3) 稀释 5mg 抗体。如果产品预先用磷酸盐缓冲液稀释, 如 PBS 缓冲液 (不含胺基类化合物), 那么可以直接在该缓冲液中加入约 1M 的 NaHCO₃ 母液, 调整 NaHCO₃ 工作浓度至 ~0.1 M。低于 2.5 mg/mL 浓度的蛋白也可用于标记, 不过此浓度下标记效率会降低。当蛋白浓度高于 5 mg/mL 时, 标记效率可能更高。由于缓冲液和蛋白纯度存在差异性, 因而更精确的标记效率由实际操作条件决定。如果标记蛋白浓度稀释过低, 可以通过超滤法进行浓缩。

2.2 准备染料储存液

室温预热一管 1mg Super Flour 647, SE, 在管中加入 0.1 mL 的无水 DMSO, 配制浓度为 10mM 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。用无 DMSO 配制染料储存液, 染料至少可以保存一个月。

2) 染料也可以用水配制, 但是由于染料在水中会缓慢水解, 所以在结合反应开始前, 水配制的储存液最好现配现用。

2.3 标记反应步骤

a) 搅拌或涡旋混匀蛋白溶液, 逐步滴加 30-50 μL 的染料储存液 (10 mM), 使染料/蛋白的摩尔比在 9 : 1 至 15 : 1 的范围内。如步骤 2.1 所述, 蛋白稀释浓度越高, 染料/蛋白的摩尔比越高, 这也意味着标记效率更低。标记 Super Flour 的 IgG 抗体最佳的 DOL (结合于每个蛋白分子上的染料数量) 值在 3-6 范围内。

b) 在室温下搅拌反应 1 小时。

注: 在进行结合反应的同时, 进行步骤 2.4, 平衡葡聚糖凝胶 G-25 透析柱。

2.4 从反应液中分离标记蛋白

a) 用 PBS 缓冲液 (pH~7.4) 平衡葡聚糖凝胶 G-25 透 析柱 (10 mm × 300 mm) 。

b) 将步骤 2.3 反应溶液加入柱子, 并用 1 × PBS 缓冲液洗脱。首先洗脱出来的着色带是染料-蛋白结合物。

注: 1) 对于小规模标记反应, 为了避免过度稀释产物, 可以使用超滤装置去除结合物中的自由染料。

2) 当结合反应完成后, 如不及时分离染料-蛋白结合物, 可以加入 50 μL 1M 赖氨酸终止反应。多数情况下, 不需要此操作, 因为剩余的未反应的染料在反应最后已经被充分水解。

3、确定 DOL (结合于每个蛋白分子上的染料数量)

3.1 蛋白浓度的确定 抗体浓度可通过以下公式计算: $C(\text{mg/mL}) = \{[A_{280} - (A_{\text{max}} \times CF)] / 1.4\} \times \text{稀释因子}$ 。

✓ C 是指实验收集的抗体浓度;

✓ 稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数 (可从下面备注中获得);

✓ A_{280} 和 A_{max} 分别是指在 280nm 处的吸光度以及在最大吸收波长 (~650 nm) 处的吸光度;

✓ CF 是校正因子, Super Flour 647, SE 的 CF 值为 0.03;

✓ 1.4 则是指 IgG (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 0.1mg/mL。稀释倍数 (即 稀释因子) 需要从起初抗体数量 (比如 5mg) 以及蛋白 液洗脱的总体积来进行预估。

3.2 DOL 的估算

DOL 通过下式计算: $\text{DOL} = (A_{\text{max}} \times M_{\text{wt}} \times \text{稀释因子}) / (\epsilon \times C)$

注意: A_{max} , 稀释因子, C 值在 3.1 中已经明确; M_{wt} 是指 IgG 的分子量 (150,000); ϵ 是 Super Flour 647, SE 的摩尔吸光系数; 标记 Super Flour 647, SE 的 IgG 抗体最佳的 DOL 值在 3-6 范围内, 有时会上下略有波动。

注意事项

1、该产品长期储存浓度为 5~10 mg/mL。储存溶液中推荐加 BSA 和叠氮化钠, 其浓度分别为 0.01~0.03%, 以防止变性和微生物滋生。

2、操作过程注意避光, 搅拌速度应当以避免产生气泡。

3、层析柱装柱时, 尽量使柱体均匀, 柱面平整, 无气泡、裂隙。

4、上样时注意, 当柱顶缓冲液与凝胶平面相切时再加样品; 洗脱时, 当样品走至与凝胶平面相切时再加洗脱液。

5、影响标记效率的其他因素还包括: 温度、反应时间、pH 值、搅拌速度、荧光染料与蛋白的量等, 需注意控制。

6、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套和必要的生化实验室装备操作。