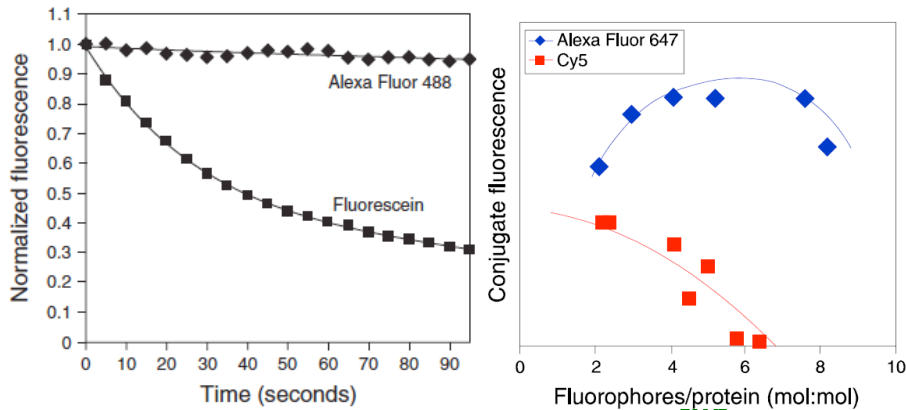




Super Fluor 488, 555, 647, 680, 750 SE活化酯

产品介绍

Super Fluor系列(效果同Alexa Fluor 系列)荧光探针, 可与胺基反应。拥有卓越的荧光亮度与光稳定性, 具有更强的荧光强度, 更广的pH应用范围(pH 4~10), 更好的抗淬灭性。在生物荧光领域已逐渐替代FITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7等荧光染料。



池敏博士

表 Super Fluor 488, 555, 647, 680, 750 SE活化酯的性质参数

Super Fluor	488	555	647	680	750
活化酯分子量	~900	~1250	~1300	~1150	~1300
最大吸收波长(nm)	494	555	647	680	750
摩尔吸光系数(M ⁻¹ cm ⁻¹)	71 000	150 000	239 000	184000	240 000
最大发射波长(nm)	524	565	665	702	775
A _{280nm} / A _{max}	11%	8%	3%	5%	4%

原料准备: 活性染料 1mg; NaHCO₃ 100mg; 抗体纯化树脂P-30/Sephadex G25M/透析袋; 空柱 5 个; 收集管 5 个;

注意: 纯化的蛋白buffer 中不得含有铵离子或伯铵, 因为它们会与蛋白质竞争结合活性染料。不纯的抗体或者含BSA 或明胶的抗体标记效果不好。低浓度的NaN₃(<3mM)或thimerosal(<1mM)不影响偶联效果。

活性染料稳定性与储存: 未开封的粉末干燥避光-20℃可存放12月。其水溶液现配现用, 溶解后的染料立即使用; 无水DMSO溶液-20℃保存最多2个星期。

一、实验步骤:

1) 蛋白溶解: 用0.1 M NaHCO₃ 溶解至终浓度为2mg/ml

将1ml 去离子水加入84mg NaHCO₃瓶中, 配成1M碳酸氢钠溶液。振荡或吹打至完全溶解。该溶液pH~8.3, 2~6℃保存可用2星期; 若抗体是溶液, 将抗体稀释至2mg/ml, 再加入1/10 体积的上述碳酸氢钠溶液; 若抗体是冻干粉, 将1M 碳酸氢钠溶液用10 倍去离子水稀释成0.1M 后, 用其将抗体溶成2mg/mL的溶液;

2) 染料溶解: 染料固体粉末从冰箱放入干燥器中慢慢升至常温后, 用无水DMSO将染料配置浓度为1 mg/mL。

3) 标记: 在1mL蛋白溶液中缓慢加入适量染料溶液(蛋白:染料摩尔比=1:20~50; 质量比可在以下范围内优化 10~200ug Super dye每毫克IgG抗体)。同时在暗处常温缓慢搅拌1小时(也可以直接将蛋白溶液直接加入染料的固体粉末的试剂瓶中, 同时在暗



处常温缓慢搅拌1小时)。

- 4) 纯化：选择下面三种方式纯化后，产品冷冻干燥成粉末或在0.01 M PBS/2mM叠氮化钠溶液中，-20°C避光储存。
- 5) 贮存：标记好的蛋白贮存于2~6°C，避光。若纯化的蛋白偶联物浓度小于1mg/ml，加入BSA 或其他稳定蛋白1~10mg/ml。在2mM NaN₃存在的情况下，2~6 度可保存几个月。保存更长时间，则需分装后-20°C保存。避免反复冻融，避光保存。

纯化方法1. 透析法：

- 1) 简单纯化可用100 mL 0.15 M NaCl 溶液常温避光透析4次,每次4小时除去未标记上的染料。
- 2) 在4°C用新鲜的1 L 0.15 M NaCl 溶液再避光透析过夜。
- 3) 用100 mL of 0.01 M PBS/ 0.01% NaN₃溶液常温避光透析4小时，在4°C常温避光再次透析过夜。
- 4) 用0.22 μm注射器过滤头过滤抗体溶液。

纯化方法2. P-30柱子

- 1) 0.5g p-30凝胶加入9mL PBS(pH=7.4)室温过夜放置；次日，弃上清；真空抽滤5min；
- 2) 加入9mL PBS,轻柔震荡均匀，放置20min后，去除上清液
- 3) 再重复2
- 4) 将树脂柱放入一个13×100mm玻璃管柱中，每个柱子加入1.5mL(不要多加)，填的均匀不能有气泡。具体方法是：搅动纯化树脂(组分C),加入1.0mL悬浮液至空柱中静置；全部下沉后再加入0.5mL树脂至床体积为~1.5ml盖上盖子，室温保存。
- 5) 将树脂柱上下端的口打开，放入10mL离心管中,水因重力自然流下，用垂直转子1100g 离心3min，rpm与相对离心力g的换算公式如下：相对离心力g=(1.12×10⁻⁵)(rpm)²(半径cm)；离心后静置待缓冲液全部流出，弃去缓冲液，保留收集管（若没有垂直转子，角转子也可）；
- 6) 换上干净的离心管，将标记的蛋白反应液200μl逐滴加入树脂柱的中心部位，使溶液被吸入胶床中；
- 7) 将树脂柱放入空的收集管中，1100g 离心5min；
- 8) 离心后收集管内是标记好的蛋白，溶在100μL PBS(pH7.2, 含2mM的NaN₃)，未结合的染料保留在柱中，弃去树脂柱。
注意事项：配置柱子时，用较细的小瓶，每个小瓶配置2个柱子。便于去除水分。填柱子时，加到1.5mL，尽量不要多加，离心时间按照说明书1000g/3min，不要更改。

纯化方法3. PD-10 column (Sephadex G25M)

3.1. 装填柱层析分离吸附柱

- 1) 提前用去离子水浸泡葡聚糖(Sephadex)过夜(1g配5mL水)，使其溶胀，打开孔状结构。
- 2) 湿法装柱：(装填过程中确保PBS(10mM, pH=7.4)液面比Sephadex高，以防混入空气而产生气泡)先在柱子 (13×100mm) 内注入3/4左右的PBS，而后加入Sephadex /PBS溶液；分批次、缓慢加入柱子内，最后用塑料滴管吸取，沿着柱子四壁旋转，逐步、缓慢地加入，装填至近满，留下约3cm的空间以待注入荧光标记蛋白溶液；
- 3) 在装填的整个过程中打开活塞(淋出液用大烧杯承接)，同时用玻璃棒+橡胶塞从下到上轻轻敲打柱子，使Sephadex装填紧密，注意使柱子内不得有气泡，不得有断层，使柱子竖直，确保顶部端面水平；(滴加Sephadex时应旋转加入，不得直接滴加，以免激起柱顶层)
- 4) 装填完柱子后，用塑料滴管吸取PBS，沿管口四壁旋转着缓慢加入，使PBS过一遍柱子，而后将PBS注入Sephadex顶部，以隔绝空气，以免在柱内产生气泡，关闭末端活塞；

3.2过柱层析分离吸附柱(避光)

- 1) 打开柱子末端活塞，缓慢放出柱子顶层的PBS，待PBS液面刚与Sephadex柱子端面相平时，立即关闭活塞；
注意不要使PBS液面低于Sephadex柱子端面，以免混入空气而在柱子内产生气泡；立即用塑料滴管吸取荧光蛋白溶液，沿柱子四壁旋转，缓慢加入(全部加完,不要搅动Sephadex随时保持其端面水平)



- 待荧光蛋白溶液全部加完后，打开活塞，使荧光蛋白溶液流入柱子中；
当荧光蛋白溶液的液面刚刚完全进入柱子时，立即用塑料滴管加入PBS(缓慢沿管子四壁旋转加入)，在荧光蛋白溶液过柱子的过程中注意随时添加PBS，确保Sephadex端面不与空气接触；
- 用烧杯承接最初的淋出液，几分钟后带颜色的溶液便从柱子顶部往下流，而后分作三段：
柱子下端(靠近活塞)：荧光标记的蛋白，带颜色，流速较快；
柱子中间：空白无颜色部分，两者的过渡区域；
柱子上端：未与蛋白反应的染料，带颜色，流速较慢；
- 待下端带颜色的荧光蛋白溶液的前沿进入活塞时，立即用5mL冻存管(锡箔纸避光)承接此淋出液(此即荧光蛋白溶液)，直至荧光蛋白溶液的尾部进入活塞口为止。
- 用10倍柱体积的PBS洗掉未反应的染料，使柱子再生后重复使用。长时间储存柱子可用含0.05%NaN₃的PBS溶液平衡柱子后，密闭封严在2~8℃储存。

二. 计算标记比例F/P值：

对于IgG 等大多数抗体来说，摩尔吸光系数为203000，F/P值在4~9 之间是最合适。

1. Super Flour 488标记蛋白F/P值计算：

- 用PBS 精确倍数稀释定量的少许纯化过的偶联蛋白，在1cm比色皿中测定280nm和494nm的光吸收；
- 计算样品中的蛋白浓度：蛋白摩尔浓度=(A₂₈₀-(A₄₉₄×0.11))×稀释倍数/203000
- 计算标记比例： 每摩尔蛋白结合的染料摩尔数=A₄₉₄×稀释倍数/(71000×蛋白摩尔浓度)

2. Super Flour 555标记蛋白F/P值计算：

- 用PBS 精确倍数稀释定量的少许纯化过的偶联蛋白，在1cm比色皿中测定280nm和555nm的光吸收；
- 计算样品中的蛋白浓度：蛋白摩尔浓度=(A₂₈₀-(A₅₅₅×0.08))×稀释倍数/203000
- 计算标记比例： 每摩尔蛋白结合的染料摩尔数=A₅₅₅×稀释倍数/(150000×蛋白摩尔浓度)

3. Super Flour 647标记蛋白F/P值计算：

- 用PBS 精确倍数稀释定量的少许纯化过的偶联蛋白，在1cm比色皿中测定280nm和650nm的光吸收；
- 计算样品中的蛋白浓度：蛋白摩尔浓度=(A₂₈₀-(A₆₅₀×0.03))×稀释倍数/203000
- 计算标记比例： 每摩尔蛋白结合的染料摩尔数=A₆₅₀×稀释倍数/(239000×蛋白摩尔浓度)

4. Super Flour 680标记蛋白F/P值计算：

- 用PBS 精确倍数稀释定量的少许纯化过的偶联蛋白，在1cm比色皿中测定280nm和680nm的光吸收；
- 计算样品中的蛋白浓度：蛋白摩尔浓度=(A₂₈₀-(A₆₈₀×0.05))×稀释倍数/203000
- 计算标记比例： 每摩尔蛋白结合的染料摩尔数=A₆₈₀×稀释倍数/(184000×蛋白摩尔浓度)

5. Super Flour 750标记蛋白F/P值计算：

- 用PBS 精确倍数稀释定量的少许纯化过的偶联蛋白，在1cm比色皿中测定280nm和750nm的光吸收；
- 计算样品中的蛋白浓度：蛋白摩尔浓度=(A₂₈₀-(A₇₅₀×0.04))×稀释倍数/203000
- 计算标记比例： 每摩尔蛋白结合的染料摩尔数=A₇₅₀×稀释倍数/(240000×蛋白摩尔浓度)

三、常见问题：

- 标记效率低——计算结果显示每摩尔145,000 MW 的蛋白标记的荧光团少于4摩尔，可能有以下原因：
 - 抗体缓冲液中含有痕量伯胺成分，与染料反应降低了标记效率。如果蛋白已经溶于含氨基的缓冲液(如Tris或氨基乙酸)，标记前用PBS透析。
 - 蛋白含量较低 (<1 mg/mL)会影响标记效率。



3) 标记步骤中加入碳酸氢钠的作用是将反应混合物的pH升高至~8, 因为在弱碱性环境中标记反应的效率最高。如果蛋白溶液的缓冲范围在低pH, 建议用0.1 M的NaHCO₃透析。

4) 研究显示pH升至9.0~9.4, 标记效率和标记速度(只需10min)明显改善。

5) 不同抗体与荧光团的反应速率不同, 染料标记后保留的生物活性程度也不同, 客户需根据自己的条件优化标记步骤。为增加标记率, 可以对同一样品进行再标记, 或减少蛋白的量加大染料量重新标记。有研究者在室温孵育1小时后再4℃孵育过夜, 情况有所改善。

2. 过标记——计算结果显示每摩尔145,000 MW 的蛋白标记的荧光团大于10摩尔。虽然过标记的蛋白也可以使用, 但可能会引起蛋白的聚集、降低抗体结合抗原的特异性, 这些都会造成非特异性结合。过标记还会引起荧光淬灭。可以增加蛋白或减少反应时间。

3. 未结合染料未去除——如果游离染料残留在偶联物溶液中, 使标记计算的值偏高。可用分离柱再次分离或透析去除。

4. 蛋白或蛋白偶联物无法洗脱——不要再加缓冲液, 只需再次离心一次或几次。

四. 小动物活体成像领域的应用



活体动物体内成像技术是指应用影像学方法, 对活体状态下生物过程进行组织、细胞和分子水平的定性和定量研究的技术。小动物活体成像是近年来在生物医药方面非常活跃和前沿的领域, 在研究细胞行为, 药物活性和代谢, 疾病的进展等方面取得了革命性的进步。分为生物发光成像(以Caliper和Xenon仪器为代表)和荧光成像(以KODAK和CRI仪器为代表)。

富百科提供近红外的荧光成像染料及其与小分子药物和生物大分子的荧光标记服务, 并提供生物发光底物虫荧光素(D-luciferin)和腔肠素coelenterazine。

1. 荧光成像的推荐步骤:

SPF级 BALB/C裸鼠, 6-8 周龄, 18-20克, 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300μL(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或Cy7标记的生物分子或药物最好溶于水(或甲醇/乙醇/乙二醇,有时DMSO 200ul能把小鼠杀死)稀释后,于裸鼠尾静脉注射200μL(浓度0.5 mg/mL)[最佳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; 如果是骨骼和鼻腔等部位靶点的Cy7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%多聚甲醛固定4小时以上, 0%, 20%, 30%PBS蔗糖依次沉底, 20μm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。



2. 荧光成像常见问题

1) 什么类型的小鼠适合活体成像? 毛发对光有散射, 建议用裸鼠。

2) 给裸鼠注射的最佳和最大注射试剂体积?

试剂的体积用量根据所采取的方式不同而不同, 下面是体重 25g 的裸鼠注射量。

	Route	Recommended	Maximal
静脉注射	Intravenous (IV)	50–125 μ l	200 μ l
腹腔注射	Intraperitoneal (IP)	500 μ l	2 ml
皮下注射	Sub-cutaneous (SC)	100–250 μ l	1 ml

3) 注射针头的尺寸是多少? 推荐使用具有固定针头的 28–32 号结核菌素或胰岛素注射器(0.3 或 1mL)

4) 肿瘤成像需要注射多大剂量的标记抗体? 推荐起始用量 50 μ g 来优化最佳用量。

5) 未标记的染料在裸鼠体内如何代谢? 未标染料通过膀胱排泄, 静脉注射后最快能在 3min 检测到膀胱内的荧光信号。

6) 注射后多长时间开始成像?

成像时间和成像持续时间与注射试剂有关。血管示踪剂注射后马上即可成像并持续成像数小时。注射标记的抗体 IgG 到达靶点需要数小时, 而后才成像并持续成像数天。

6) Super Fluor dyes 的荧光寿命是多少?

Super Fluor 647 在 20°C 水中 τ =1 ns

Super Fluor 680 在 20°C 水中 τ =1.2 ns

Super Fluor 750 在 20°C 水中 τ =0.7 ns

7) 推荐小动物活体成像的网站。 <http://radiology.cme.stanford.edu>