

Cy3 NHS Ester Cy3-N-羟基琥珀酰亚胺酯

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Cy3 NHS Ester Cy3-N-羟基琥珀酰亚胺酯	40777ES03	1 mg

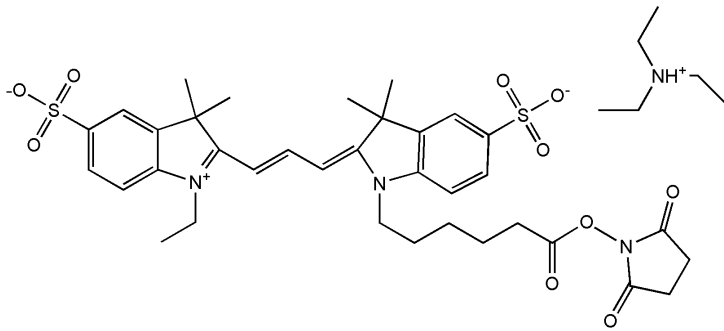
产品描述

Cyanine 3 (Cy3), 是花青素荧光染料家族的成员之一, 是化学合成的聚甲炔染料。目前 Cyanine 系列染料以两种异构体的形式供货, 一种是非磺化花青素 (non-sulfonated cyanines), 一种是磺化花青素 (sulfonated cyanine)。两者的光谱性质几乎一致, 因此大部分应用可相互替换, 比如, 都可用于标记 DNA 或蛋白等生物分子。两者的主要区别在于: 磺化染料是水溶性的, 在水相的标记反应体系内不需要使用有机共溶剂, 并且降低染料在水中聚集的可能性, 增强标记效率。

本 Cyanine 3 (Cy3) 是以磺化染料的形式供货, 易溶于水, $E_x=555\text{ nm}$, $E_m=565\text{ nm}$, 具有明亮荧光, 光稳定性强, pH 非敏感性等优点, 适用于标记多肽、蛋白以及核酸等生物分子, 以通过后续荧光成像以及其他荧光生物学方法分析目的蛋白。

本 Cy3 NHS ester, 即含 N-羟基琥珀酰亚胺 (N-Hydroxysuccinimide) 活化基团的 Cy3, 可直接与生化分子上的氨基 (-NH₂) 反应形成稳定的酰胺键, 主要是伯胺。

产品性质

英文别名 (English Synonym)	Cyanine 3, monosuccinimidyl ester
分子量 (Molecular Weight)	829.03
外观 (Appearance)	紫色粉末
Ex/Em	555 nm/565 nm
溶解性 (Solubility)	溶于 DMSO, DMF, 水
纯度 (Purity)	≥93%
结构式 (Structure)	

运输和保存方法

冰袋运输。-20℃干燥避光保存, 有效期 1 年。

注意事项

- 1) NHS ester 基团对湿度非常敏感, 务必干燥保存产品。使用前产品需放到室温回温至少 20 min。
- 2) NHS ester 基团的水解发生在水溶性缓冲体系属于竞争性反应。对蛋白/多肽 (浓度: 1-1 mg/mL) 伯胺的连接反应建议在 pH 7-9 范围内进行。使用不含氨基的缓冲体系, pH 7-9。比如 100 mM 磷酸钠, 150 mM 氯化钠, pH 7.5; 100 mM HEPES, pH 7.5。100 mM 碳酸钠/碳酸氢钠, pH 8-9; 或 100 mM 硼酸缓冲液, pH 8-9。
- 3) 不要使用含伯胺的任何缓冲液, 比如 Tris, 甘氨酸。
- 4) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用方法 (用 Cy3-NHS Ester 标记抗体)

【注意】: 可参考本方法进行多肽, 蛋白或者其他分子的标记, 需要根据具体的实验体系对合适的标记缓冲体系, 样本浓度, 染料浓度等参数做出合适的调整。

- 1) 用不含氨基的合适的缓冲液 (eg. 100 mM 磷酸钠, 150 mM NaCl, pH7.5) 溶解抗体使其浓度达到 1-5 mg/mL。【注】: 如抗体中有残留 Tris 或 glycine 污染, 则需透析或者脱盐到合适的缓冲液内。
- 2) 使用前, 用适量去离子水或者无水 DMSO 溶解 Cy3-NHS, 使其摩尔浓度为抗体摩尔浓度的 400 倍, 例如, 待标记的 IgG 浓度为 1 mg/mL (eg 6.7 μ M), 则溶解后 Cy3-NHS 的浓度为 2.7 mM; 如待标记的 IgG 浓度为 2.5 mg/mL, 则溶解后 Cy3-NHS 的浓度为 6.75 mM;
- 3) 向抗体中加入适量 Cy3-NHS 试剂, 以达到预期的标记效率。【注】: 当用 Cy 3 NHS ester 标记抗体或其他蛋白, 亮度最高的偶联物其染料/蛋白的比率为 4-12, 取决于特定的应用。过高比率会增加非特异性背景, 丧失抗体特异性结合, 导致聚集。建议根据应用优化标记比率。
- 4) 室温孵育 60min (或更长);
- 5) 利用合适缓冲液透析或脱盐柱去除未反应的试剂;
- 6) 分别在 280 nm 和 550 nm 检测 Cy3-抗体的吸光值;
- 7) 测定 Cy3 标记效率 (DOL) 和标记浓度。见下公式。

公式一. 利用下面公式计算 Cy3 标记效率 (DOL) 及其浓度 (mg/mL)
Eq.1 Number of Cy3 dye per protein=molarity Cy3 dye / molarity protein
Eq.2 [Molarity of Cy3 dye]= A_{555}/ϵ_{555}
Eq.3 [Molarity of protein]= A_{280C}/ϵ_{280}
Eq.4 mg/mL=[$A_{280}-(A_{555}\times 0.08)/(E_{1\%}/10)$] \times dilution factor
<p>【注】 上述参数如下:</p> <p>A_{555}=conjugate absorbance at 555\pm2 nm ϵ_{555}=molar extinction coefficient Cys dye =150000M⁻¹cm⁻¹ A_{280}= conjugate absorbance at 280nm A_{280C} =corrected conjugate absorbance at 280nm= $A_{280}-(A_{555}\times 0.08)$ ϵ_{280}= molar extinction coefficient protein(M⁻¹cm⁻¹)=$MWp\times E_{1\%}/10$</p>

应用举例

用高于抗体摩尔浓度 20 倍的 Cy3-NHS 标记 0.1 mL 山羊 IgG (浓度为 1 mg/mL)。标记后脱盐去除未标记染料, 在 PBS 中测定(1:5 稀释)测定其 A_{280} 和 A_{555} :

$$A_{280}=0.2906$$

$$A_{555}=0.9825$$

另: 山羊 IgG 分子量为 150kDa, $E_{1\%}=13.6$ or 204000M⁻¹cm⁻¹

计算 DOL 如下:

By Equation 2 Molarity of Cy3 dye= $0.9825/150000$ M⁻¹cm⁻¹=6.55 μ M

By Equation 3 Molarity of IgG = $0.2906-(0.9825\times 0.08)/204000$ M⁻¹cm⁻¹=1.039 μ M

By Equation 1 number of Cy3 per IgG= $6.55\mu\text{M}/1.039\mu\text{M}$ =6.3

则计算 Cy3-IgG protein 浓度为 (mg/mL):

By Equation 4 mg/mL=[$0.2906-(0.9825\times 0.08)/1.36$] $\times 5$ =0.78 mg/mL