

Cy 系列染料产品说明书

产品信息

产品货号	产品名称	规格	Ex/Em (nm)	Extinction coefficient(ϵ)
QH-30-3001	Cy3 NHS	1 mg/10 mg/100 mg/1 g	554/566	150000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
QH-30-3002	Cy3.5 NHS	1 mg/10 mg/100 mg/1 g	591/604	116000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
QH-30-3003	Cy5 NHS	1 mg/10 mg/100 mg/1 g	640/664	250000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
QH-30-3004	Cy5.5 NHS	1 mg/10 mg/100 mg/1 g	680/698	198000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
QH-30-3005	Cy7 NHS	1 mg/10 mg/100 mg/1 g	740/770	199000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
QH-30-3006	Cy7.5 NHS	1 mg/10 mg/100 mg/1 g	784/814	223000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

产品描述

Cyanine 系列（花青素系列）荧光染料为常用高亮度荧光试剂，具有 pH 不敏感性，其荧光母核可通过不同长度的亚甲基桥链，实现可见光至近红外光区的荧光激发与发射覆盖，满足多场景需求（如 Cy3 为黄红色荧光，适配普通荧光显微镜肉眼观测；Cy7.5（ICG 结构）可用于小动物近红外体内成像）。

琥珀酰亚胺酯（简称 se 或 NHS 活化酯）为 Cyanine 染料常用活化官能团，可与氨基特异性反应生成稳定、无毒的酰胺键，以干燥固体形态稳定储存，复溶（有机溶剂、水或混合溶剂）后即可用于氨基官能团标记，溶剂选择可根据染料水溶性及标记对象稳定性确定。该活化酯优先与伯氨基反应（如多肽 N 端、蛋白质赖氨酸侧链氨基），与苯氨基、苯酚、醇羟基等无反应活性；相较于异硫氰酸酯（如 FITC 标记用），其反应活性更强、选择性更高，生成的酰胺键与肽键结构一致，稳定性优于异硫氰酸酯生成的异硫氰酸酞胺。

【运输及储存】

储存条件：-20℃ 避光保存，勿冷冻

【使用方法】

以标记蛋白为例，以下为 NHS 活化酯染料的常规标记方法。对于特殊标记条件和要求，可以根据实验情况个体优化。

【标记准备工作】

1. 反应体系溶剂、pH 与缓冲盐选择。

标记反应可在混合溶剂（水溶液 + 少量有机溶剂）中进行。若标记对象为高分子、小核酸等耐有机溶剂材料，也可采用纯有机溶剂体系（如甲醇、乙腈、氯仿等），该体系可降低 NHS 活化酯水解速度，在较低染料 / 对象比例下实现高效标记（需添加三乙胺等有机碱促进反应）。

NHS 活化酯在微碱性条件下反应活性更高，综合反应速度与活化酯水解速度，推荐选择 pH 8.5 左右的反应环境，最适缓冲盐为 50 mM 硼酸钠溶液（50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 8.5）；此外，0.1 M 磷酸钠缓冲盐 PBS（0.1 M Na_3PO_4 、0.15 M NaCl , pH 7.2-7.5）、0.1 M 碳酸氢钠溶液（0.1 M NaHCO_3 , pH 8.3-9.0）也可适用。

需注意：含氨基的缓冲液（如 Tris、甘氨酸）会与 NHS 活化酯反应，禁止作为反应缓冲体系；若蛋白样品中含此类氨基盐，需先通过透析或除盐柱去除后再进行标记。

2. 染料母液配制

Cy 系列 NHS 活化酯染料对湿气敏感，从低温冰箱取出后，需在室内放置至室温再打开瓶盖，避免水汽凝结导致染料失活。染料需用无水 DMF 或无水 DMSO 溶解，推荐母液浓度为 10 mg/ml；也可根据移液精度需求，配制为 1 mg/ml 或其他浓度。

3. 染料标记比例

为实现“每个蛋白标记 > 1 个染料分子”的目标，混合溶剂反应体系中，染料与标记对象的摩尔比推荐为 2-5:1；特殊情况（如标记多肽末端 α 位氨基，该氨基活性较差）可升至约 10:1。为提升标记效率，反应需在高浓度、小体积条件下进行（如标记蛋白质时，蛋白浓度建议为 1-10 mg/ml）。

注：上述比例为参考值，具体需结合预实验摸索确定，因标记效率受蛋白结构、反应体积、溶剂、温度、时间及纯化方式影响。标记后蛋白以“每个蛋白分子偶联 1-4 个染料”为最佳（需根据蛋白稳定性与分子量调整），标记过多会影响蛋白活性与稳定性，严重时可能导致蛋白变性沉淀。

【标记反应步骤】

1. 样品准备：

将待标记的蛋白质溶液转移至洁净的反应小管中，确保溶液无杂质、无含氨基缓冲盐（如 Tris、甘氨酸，若有需提前通过透析或除盐柱去除）。

2. 染料添加与反应：

根据“染料与标记对象摩尔比 2-5:1（特殊情况如多肽 α 位氨基标记可升至约 10:1）”的参考比例，量取适量染料母液（无水 DMF 或无水 DMSO 配制，浓度 1-10 mg/ml）加入反应小管。

用移液器轻轻上下吹打混匀，避免剧烈震荡损伤样品；常温下静置或轻微晃动反应 3-5 小时，若蛋白质稳定性良好，可延长反应至过夜以提升标记效率。

注意事项：标记蛋白质等敏感材料时，反应体系中有机溶剂体积比需控制在 5% 左右；若出现疏水性 Cy 染料大量析出，可适当将有机溶剂体积比提升至 10% 或更高。

3. 纯化处理（去除游离染料）：

- 透析法：选用截留分子量 >10 KDa 的透析袋，将反应液装入后进行透析；为加速游离染料透出，需每 4 小时更换 1 次透析液，重复更换 3 次，纯化效率较高。
- 除盐柱法（凝胶过滤法）：操作快捷，可直接去除游离染料，但纯化效率略低于透析法。
- 沉淀法：硫酸铵沉淀法适用于蛋白浓度 ≥ 10 mg/ml 的场景，乙醇沉淀法也可用于样品纯化，具体需根据样品特性选择。

4. 样品储存：

短期储存：纯化后的蛋白样品需在避光条件下，置于 4℃ 冰箱保存。

长期储存：向纯化后的样品中加入冷冻保护剂（如甘油），分装后置于 -20℃ 冰箱保存，避免反复冻融影响样品活性。

【计算标记程度 DOL】

每种染料均具备特定消光系数 (ϵ)，具体数值参考首页表格。实验中可通过测定染料最大激发峰（即最大吸收峰）的吸光度值，结合其消光系数 (ϵ) 计算染料分子浓度，再将染料浓度与蛋白质浓度进行比值运算，即可得到染料标记程度（即每个蛋白质分子平均偶联的染料分子数），具体操作步骤如下：

1. 蛋白质浓度测定

采用 BCA 蛋白质定量试剂盒或其他适用的蛋白质测定试剂盒，测定标记后样品中的蛋白质质量浓度；根据目标蛋白质的已知分子量，进一步换算得到样品中蛋白质的摩尔浓度（记为 C_{protein} ）。

2. 染料浓度测定

- 参考产品首页表格，查询目标染料的最大吸收峰波长（即激发波长 E_x 值，例如 Cy3 染料的最大吸收峰波长为 554 nm）；

- 取少量标记后样品，用适宜缓冲液稀释（因染料吸光度较强，稀释可避免吸光度值超出检测线性范围）；
- 使用 1 cm 光程的高质量石英比色皿，在紫外 - 可见分光光度计上测定稀释后样品在上述最大吸收峰波长下的吸光度值（记为 A）；
- 根据公式计算染料摩尔浓度： $C_{\text{dye}} = (A \times \text{稀释倍数}) / \text{消光系数} (\epsilon)$ ，单位为 mol/L (M)。

3. 标记程度计算

按公式 $\text{DOL} = C_{\text{dye}} / C_{\text{protein}}$ 计算染料标记程度。计算前务必将 C_{dye} （染料摩尔浓度）与 C_{protein} （蛋白质摩尔浓度）换算为统一单位（均为 mol/L 或其他一致的摩尔浓度单位），避免因单位不统一导致计算结果偏差。

注意事项

- 琥珀酰亚胺活化酯（NHS 活化酯）对湿气敏感，在含水条件下会缓慢水解为羧酸，丧失对氨基的标记能力，需严格遵循以下储存与使用规范：储存条件上，需在 -20°C 干燥环境下保存，避免受潮；从冰箱取出后，必须在室内平衡至常温再打开瓶盖，防止空气中水汽在样品表面凝结导致失活。溶解与使用时效方面，需用无水溶剂（如无水 DMSO、无水 DMF）溶解，溶解后因溶剂中残留的微量水分子仍会导致活化酯水解，无法长时间保存，需尽快使用（建议 24 小时内）；严禁在水溶剂中保存活化酯。
- 反应体系添加剂需注意：浓度 $\leq 3 \text{ mM}$ （或 0.02%）的叠氮化钠、浓度 $< 0.02 \text{ mM}$ （或 0.01%）的 thimerosal，此类添加剂对蛋白标记反应无不良影响；而含 20-50% 甘油的体系会降低标记反应效率，不建议使用；含伯氨基的缓冲盐（如 Tris、甘氨酸）会导致 NHS 活化酯失活，严禁在这类溶液中进行标记反应。