

pH630 Deep Red maleimide Thiol Reactive

产品说明书

产品类别

货号	产品名称	产品规格
QH-17-1001	pH630 Deep Red maleimide Thiol Reactive	100 µg/1 mg

产品物理性质

Dye	吸光度最大值 (λ_{max})	消光系数 (ϵ_{dye})	CF280 [1]	CF260 [2]
pH630 Deep Red dye	640 nm	140,000	0.33	0.14

[1] 280 nm 处吸光度读数 (A_{280}) 的校正因子；例如 A_{280} ，实际= $A_{280} - (CF_{280} \times \lambda_{max})$ 。

注意：测量在 4.3% (wt%) 磷酸中进行

[2] 260 nm 处吸光度读数 (A_{260}) 的校正因子；例如 A_{260} ，实际= $A_{260} - (CF_{260} \times \lambda_{max})$ 。

注意：测量在 4.3% (wt%) 磷酸中进行

产品信息

pH630 Deep Red maleimide 是一种硫醇反应性染料，能轻易地与生物分子的巯基反应，生成共价连接的荧光 pH 探针。pH630 Deep Red maleimide 可用于标记蛋白质、细胞或病毒上的巯基，形成在酸性环境中才会发光的稳定偶联物。我们的低背景 pH630 Deep Red 染料使得研究内化过程更加简单，结果更可靠，优化更少，因为 pH630 Deep Red 染料仅在晚期内涵体和溶酶体中激活。pH630 Deep Red 染料的激发和发射最大值分别约为 640 nm 和 655 nm，可使用标准 Cy5 滤光片进行检测。

pH630 Deep Red 染料是一种低背景 pH 传感器染料，在中性条件下不显示信号，仅在酸性环境中呈现荧光。这一独特性质使得抗体内化、内吞和吞噬途径的快速测定开发和结果确定性成为可能。pH630 Deep Red 染料能更好地区分细胞内吞的物质与细胞外的物质，因为其近似 pKa 值为 5，只有进入晚期内涵体和

溶酶体才会激活。pH630 Deep Red 染料可使用 Cy5 荧光滤光片组进行检测，并已验证可用于多种应用，包括流式细胞术、荧光显微镜和高通量筛选（HCS）。

【准备材料】

- pH 值在 7.0–7.5 之间的 10–100 mM 磷酸盐（如磷酸盐缓冲盐水（PBS）、Tris 或 HEPES）缓冲液
- 二甲基甲酰胺（DMF）或二甲基亚砜（DMSO）
- 用所选缓冲液平衡的凝胶过滤柱（Sephadex® G - 25 或等效物）
- 可选：谷胱甘肽、巯基乙醇或其他低分子量硫醇以终止反应
- 可选：二硫苏糖醇（DTT）或三(2-羧乙基)膦（TCEP）。这些试剂可用于还原蛋白质中的二硫键以释放游离硫醇

【存储条件】

当按照指示储存时，至少稳定 6 个月。

【标记反应流程】

1. 在室温下，将蛋白质溶于 pH 7.0–7.5 的适宜缓冲液（10–100 mM 磷酸盐、Tris、HEPES）中，浓度为 50–100 μM。在此 pH 范围内，蛋白质硫醇基团具有足够的亲核性，因此它们几乎只与试剂反应，而更多的蛋白质胺基 被质子化且相对不反应。
2. 此阶段最好还原蛋白质中的二硫键。通常，还原剂（如 DTT 或 TCEP）10 倍摩尔过量即足够。如果使用 DTT，则需要在引入反应性染料前通过透析去除多余的 DTT。在马来酰亚胺偶联期间无需去除多余 TCEP。

注意：由于硫醇可氧化为二硫键，在无氧环境中进行硫醇修饰可能较为可取。如果蛋白质在用还原试剂（如 DTT）处理后才进行硫醇修饰，这一预防措施尤为重要。在这种情况下，所有缓冲液都应脱氧，并在惰性气氛下进行 反应，以防止二硫键重新形成。

3. 在使用前立即用 DMF 或 DMSO 制备 1–10 mM 的 pH630 反应性染料储备液。我们不建议将染料溶液储存超过 24 小时。
4. 根据要标记的蛋白质量，确定要使用的反应性染料量，以获得染料与蛋白质摩尔比（MR）为每摩尔蛋白质 3–20 摩尔染料。
5. 在搅拌蛋白质溶液的同时，逐滴加入 pH630 试剂。
6. 在室温下反应 2 小时或在 4°C 下过夜，避光。

7. 蛋白质反应完成后，可加入过量的谷胱甘肽、巯基乙醇或其他可溶性低分子量硫醇，以消耗过量的硫醇反应性试剂，从而在纯化步骤期间确保无反应性物质存在。
8. 在凝胶过滤柱（如 Sephadex® G-25 柱或等效基质）上或通过 4°C 下在适当缓冲液中透析纯化偶联物。

蛋白偶联物的储存

一般来说，偶联物的储存条件应与未标记蛋白质的储存条件相同。或在纯化偶联物后向偶联物溶液中加入牛血清白蛋白（BSA）或任何其他稳定剂，至最终浓度为 1–10 mg/mL，以防止变性。

- 将标记的蛋白质储存在 2–8°C，避光；
- 可能需要向您的偶联物中加入稳定剂，如 BSA（1–10 mg/mL）或甘油，以提高其稳定性；
- 在 2 mM 叠氮化钠或其他防腐剂存在下，典型抗体偶联物在 2–8°C 下应稳定数月；
- 您的蛋白质可能有特殊的存储要求；
- 如果您的抗体适用，请将其偶联物分成小份，并在 ≤-20°C 下冷冻保存以供长期存储；
- 避免反复冻融，并避光；
- 我们建议在使用前将偶联物溶液在微量离心机中离心，并在实验中仅使用上清液。此步骤将去除在存储过程中可能形成的任何聚集体。

【（可选）测定偶联产率】

1. 留出 10 μL 偶联抗体溶液，并记录回收偶联物的总体积。
2. 可使用 Bradford 测定试剂盒确定蛋白质产率。

注意：根据偶联反应的浓度，样品可能需要稀释。

3. 从样品中计算 mg/mL 偶联物，并将此结果对照回收样品的体积，以确定回收的抗体的 mg 数和百分比产率。

【（可选）测定标记度（DOL）】

您可能需要优化标记效率，以获得偶联物在您的应用中的期望结果。您可以通过测量蛋白质在 280 nm 处的吸光度和染料在其激发最大值（640 nm）处的吸光度，来确定标记反应的相对效率。

测定标记度（DOL）的样品准备：

1. 取少量标记的偶联物，并使用 4.3%（wt%）磷酸按 1:3 的比例稀释。

注意：此步骤可能会破坏偶联物样品，并且样品不可恢复。4.3%（wt%）磷酸可通过将 5 μL 85%（wt%）磷酸稀释到 95 μL 去离子水中来制备。

2. 将抗体偶联物样品按 1:3 的比例稀释在 4.3%（wt%）磷酸溶液中，并测量抗体偶联物在 280 nm（ A_{280} ）和 pH630 Deep Red 染料在 640 nm 的吸光度。
3. 计算样品中的蛋白质浓度

使用以下公式计算样品中的蛋白质浓度：

$$\text{蛋白摩尔浓度 (M)} = \frac{[A_{280} - 0.33 (A_{640}) \times \text{稀释倍数}]}{\text{蛋白消光系数}}$$

注意：203,000 是典型 IgG 在 280 nm 的摩尔消光系数（ ϵ ），单位为 cm^{-1} ，也适用于 IgA、IgD 和 IgE。在此公式中，0.33 是荧光团对 A_{280} 的校正因子。

4. 计算标记度（DOL）

使用以下公式计算 DOL：

$$\text{DOL} = \frac{\text{染料摩尔质量}}{\text{蛋白摩尔质量}} = \frac{A_{640} \times \text{稀释倍数}}{140000 \times \text{蛋白消光系数}}$$

注意：其中 140,000 cm^{-1} 是 pH630 Deep Red 染料的大致摩尔消光系数。