

Alexa Fluor® Dyes 产品使用说明

产品性质

货号	名称	Ex/Em (nm)	A ₂₈₀ /A _{max} or CF(protein)	Extinction coefficient(ε)	MW	Optimal DOL (IgG)
QH-10-1001	AF 350 NHS Ester	346/445 nm	0.19	19,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~410.4	4-6
QH-10-1002	AF 405 NHS Ester	400/424 nm	0.7	35,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~1028.3	5-10
QH-10-1003	AF 430 NHS Ester	430/545 nm	0.28	15,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~701.8	4-6
QH-10-1004	AF 488 NHS Ester	494/517 nm	0.11	73,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~643.4	8-12
QH-10-1005	AF 514 NHS Ester	517/542 nm	0.18	80,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~714	5-8
QH-10-1006	AF 532 NHS Ester	530/555 nm	0.09	81,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~723.8	5-8
QH-10-1007	AF 546 NHS Ester	554/570 nm	0.12	112,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~1159.6	5-8
QH-10-1008	AF 555 NHS Ester	555/572 nm	0.08	155,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~1250	5-8
QH-10-1009	AF 568 NHS Ester	578/602 nm	0.46	88,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~791.8	7-9
QH-10-1010	AF 594 NHS Ester	590/617 nm	0.56	92,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~819.8	4-10
QH-10-1011	AF 647 NHS Ester	651/672 nm	0.03	270,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~1250	5-8
QH-10-1012	AF 660 NHS Ester	668/698 nm	0.10	132,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~1100	4-7
QH-10-1013	AF 680 NHS Ester	684/707 nm	0.05	183,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~1200	4-7
QH-10-1014	AF 700 NHS Ester	702/723 nm	0.07	205,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~1400	2-5
QH-10-1015	AF 750 NHS Ester	753/782 nm	0.04	290,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~1300	2-5
QH-10-1016	AF 790 NHS Ester	785/810 nm	0.08	260,000 cm ⁻¹ M ⁻¹	~1750	2-5

产品描述

AF 系列染料以其卓越的荧光性能成为理想标记工具。其荧光发射光谱覆盖整个可见光范围并延伸至更远波段。相较于光谱相似的传统染料, AF 标记物展现出显著更高的荧光亮度和更强的光稳定性, 能够助您捕获以往无法实现的清晰图像。

AF 染料水溶性优异, 且在 pH 4-10 范围内性能稳定, 确保其在各种生物反应条件下可靠工作。为便于您开发定制最优标记方案, 我们提供 AF 染料的琥珀酰亚胺酯 (NHS 酯) 作为独立试剂。该试剂提供高效便捷的标记途径, 可特异性连接至肽链、蛋白质或胺修饰核酸上的伯胺基团 (R-NH₂)。

与其他活性基团不同, 琥珀酰亚胺酯对芳香胺、醇类及酚类 (包括酪氨酸和组氨酸) 的反应性极低, 确保了标记的高度选择性。相较于异硫氰酸酯等胺反应试剂, 琥珀酰亚胺酯形成的酰胺键如同天然肽键般稳定, 是构建含胺分子荧光标记物的更优选择。

***提示:** 若出现溶解性降低时, 可通过将 **DMSO** 预先水浴加热至 **30°C**, 再溶解染料, 使用漩涡振荡仪进行振荡, 待其全部溶解后使用; 若配液一次性用完时, 可在溶解时加入一滴水促进溶解, 待其全部溶解后使用。

储存条件: -20°C 干燥避光保存

使用方法 (以 IgG 为例)

- **IgG:** IgG 不可含有能与染料反应的胺类化学物质, 如氨基酸、Tris、BSA、明胶等。如果 IgG 中含有此类化学物质, 应用 pH~7.4 的 PBS 缓冲液预先透析处理。低浓度叠氮类化合物的存在不会影响标记反应。
- 无水 DMSO
- NaHCO₃
- 葡聚糖凝胶 G-25 透析柱
- PBS 缓冲液 (pH~7.4)

标记方法和步骤

您可根据实际需求按比例放大或缩小反应体系, 只需保持各试剂间的摩尔比不变即可。需要特别注意的是, 不同蛋白质之间, 其胺基的数量及表面结合位点可能存在差异, 同时染料的反应活性也会有所不同。因此, 我们建议您尽可能对三种不同的标记程度进行测试: 通过采用三种不同的反应试剂与蛋白质的摩尔比开展实验, 后续可根据针对您特定蛋白质的实验结果, 选择能带来最理想效果的试剂量, 以此作为后续实验方案的基准。

1. 准备标记抗体

将约 10 mg 蛋白溶解于 1 mL 0.1 M NaHCO₃ 缓冲液 (pH~8.3) 中, 制备得到的蛋白溶液浓度宜控制在 5-20 mg/mL。该浓度范围有助于保障反应顺利进行, 当浓度低 2 mg/mL 时, 通常可能会导致反应效率明显下降。如果蛋白浓度过低, 可以通过超滤管进行浓缩。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 1/10 体积 1 M 的 NaHCO₃ 溶液 (pH~8.3), 以此来获得反应所需的 pH。

2. 准备染料储存液

AF Dye NHS Ester 染料预热至室温, 换算单位, 每 1 μmol 染料, 加入 100 μL 无水 DMSO 使充分溶解, 制备浓度为 10 mM 的染料储存液。进行简单离心使染料处于底部。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:** 剩余的染料储存液应于 -20°C 低温存放, 以备后续使用。如果使用无水 DMSO 配制染料储存液, 那么染料至少可以保存一个月。

3. 标记反应

a) 搅拌或涡旋混匀蛋白溶液, 逐步滴加 15-25 μL 的染料储存液 (10 mM), 使染料/蛋白的摩尔比在 7:1 至 15:1 的范围内。添加染料的量可以按需要调整, 以达到最佳 DOL。

b) 在室温下避光搅拌反应 1 h, 微量标记时也可在摇床上振荡孵育 1 h。

4. 分离标记蛋白

a) 用 PBS 缓冲液 ($\text{pH}\sim 7.4$) 平衡葡聚糖凝胶 G-25 透析柱 (10 mm $\times$ 300 mm)。

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

***注:** 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游离染料。

计算 DOL

1. 蛋白浓度的确定

抗体浓度可通过以下公式计算:

$$C(\text{mol/L}) = [A_{280} - (A_{\text{max}} \times \text{CF})] / (\epsilon_1 \times \text{MW})$$

-C 是指实验收集的抗体浓度;

- A_{280} 和 A_{max} 分别是指蛋白质-染料偶联物在 280 nm 处以及在染料最大激发波长处的吸光度值;

-CF 是校正因子, AF Dye NHS Ester CF 值参考产品表;

- ϵ_1 为抗体的消光系数, 此处 IgG 的消光系数为 1.4 (1cm 光程, 1mg/ml 浓度);

-MW 是指蛋白质的分子量, 此处表示 IgG 的分子量(160,000)。

2. DOL 的估算

DOL 通过下式计算:

$$DOL = A_{\max}/(\epsilon_2 \times C)$$

- $A_{\max}$ 是指在染料吸收波长处的吸光度值；

- C 是指实验收集的抗体浓度(mol/L)；

- ϵ_2 是染料摩尔吸光系数。

偶联物的储存和处理

- 对于长期储存，我们建议添加 5-10 mg/mL 的 BSA 和 0.01-0.03% 的 NaN_3 溶液，以防止变性和微生物生长。溶液应避光储存在 2-8°C。
- 加入最终浓度>50%的甘油，偶联物可在-20°C保存。

注意事项

- 由于在包装 100 ug 和 1 mg 单位规格的产品时，通常会有一些反应性损失，因此我们重新确认每批产品的反应性在包装后>50%。确定反应性的方法可能与 AF Dye NHS 酯在特定标记反应中的实际反应性没有直接关系。特别是 AF488 琥珀酰亚胺酯的反应性可能低至 30-40%，反应时添加的染料量可能需要相应调整。
- 5 mg 和 25 mg 的规格是通过称重来包装的，其反应性的损失可以忽略不计，相当于产品分析证书上报告的 HPLC 纯度。
- 在使用前将琥珀酰亚胺酯溶解在高质量、无水的二甲基亚砜(DMSO)或二甲基甲酰胺(DMF)中。溶解后，这种活性染料溶液有些不稳定，尤其是在受潮后。在与活性染料混合之前，分子筛可以帮助消除这些溶剂中的水分污染。尽管 AF Dye NHS 酯是水溶性的，但它们在水溶液中会水解成非反应性的游离酸。