

pH630 Deep Red TFP Ester, Amine 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 TFP Ester, Amine 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 TFP Ester 是一种胺反应性染料，能轻易地与生物分子的伯胺反应，生成共价连接的荧光 pH 探针。pH630 Deep Red TFP Ester 可用于标记蛋白质、细胞或病毒上的伯胺，形成在酸性环境中才会荧光的稳定偶联物。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）。

【材料标记反应步骤】

pH630 Deep Red 反应性染料储备溶液制备：不要在开始标记反应前制备 pH630 Deep Red 反应性染料储备溶液。该反应性染料容易水解，因此应立即使用。

【准备材料】

- 1M 碳酸氢钠，pH 8.5
- （可选）具有适当分子量截留值的凝胶过滤柱或超滤管，用您选择的缓冲液平衡
- （可选）蛋白 Bradford 测定试剂盒
- （可选）4.3% (wt%) 磷酸，用于测定标记度 (DOL)

【存储条件】

当按照指示储存时，至少稳定 6 个月。

蛋白质的制备指南

纯化的蛋白质应以 **2.2 mg/mL** 的浓度存在于不含伯胺（如铵离子、Tris、甘氨酸、乙醇胺、三乙胺、谷胱甘肽）或咪唑的缓冲液中。所有这些物质都会显著抑制蛋白质标记。部分纯化的蛋白质样品或含有载体（如 BSA，例如抗体）的蛋白质样品将不会很好地标记，应在标记前进行纯化。低浓度 (<0.1% (w/v)) 的生物杀菌剂，包括叠氮化钠和硫柳汞，不会显著影响标记反应。为帮助在标记前从蛋白质样品中去除低分子量组分（脱盐），可使用透析或小规模凝胶过滤。我们建议使用 PBS pH 7.2 – 7.5 作为预标记透析缓冲液，尽管也可以使用 100 mM 碳酸氢钠缓冲液。

【测定标记度 (DOL) 的指南】

有几种分光光度法可用于测定 pH630 Deep Red 染料标记偶联物的 DOL。它们基于通过 280 nm (A_{280}) 和 640 nm (A_{640}) 处的吸光度获得偶联物的浓度。

使用试剂盒制备的偶联物的 DOL 测定仅在它们使用 4.3% (wt%) 磷酸溶液稀释时才是准确的。我们建议在测量吸光度前，将抗体偶联物样品用 4.3% (wt%) 磷酸按 1:3 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。

一些低固有 A₂₈₀ 值的抗体过度稀释可能会妨碍您获得样品的准确 A₂₈₀ 值。仅使用部分抗体偶联物样品，并将其仅稀释至您的比色皿和分光光度计所需的最小体积，以避免读数低于仪器的最佳范围。

【用 pH630 Deep Red 胺反应性染料标记抗体】

本方案描述了使用单个 100 μg 规格的胺反应性 pH630 Deep Red 染料标记 1 mg 整体 IgG 的方法。简而言之，将抗体以 2.2 mg/mL 的浓度制备在 PBS 或不含伯胺的类似缓冲液中，并将染料以约 0.38 mM (0.5 mg/mL) 的浓度制备在水中。

抗体标记反应：

1. 将 1 mg 抗体以 2.2 mg/mL 的浓度制备在 PBS 或不含伯胺的类似中性缓冲液中。
2. 向抗体溶液中加入 50 μL 1M 碳酸氢钠。
3. 将 100 μg 瓶装的 pH630 Deep Red 胺反应性染料的内容物溶解在 100 μL 水中，制备成约 0.77 mM (1 mg/mL) 的标记溶液。通过反复吸打完全溶解瓶中的内容物。

重要提示：立即在使用前制备此溶液，并丢弃任何剩余溶液。

4. 将全部 100 μL 约 0.77 mM 标记溶液加入抗体溶液中，并通过反复吸打混合。
5. 在室温下避光孵育反应 2 小时。
6. 如果需要，使用超滤管或脱盐柱纯化偶联抗体。
7. 抗体标记完成已准备好使用。

【用 pH630 Deep Red 胺反应性染料标记纯化蛋白质】

pH630 Deep Red 胺反应性染料容易与蛋白质的伯胺反应，生成共价连接的荧光 pH 探针。以下描述了使用胺 反应性形式的 pH630 染料在溶液中标记纯化蛋白质或抗体的通用方案。

一般蛋白质标记反应：

1. 将 1 mg 蛋白质以 2.2 mg/mL 的浓度制备在 PBS 或不含伯胺的类似缓冲液中。
2. 向抗体溶液中加入 50 μL 1 M 碳酸氢钠。
3. 将 100 μg 瓶装的 pH630 Deep Red 胺反应性染料的内容物溶解在 100 μL 水中，制备成约 0.77 mM (1 mg/mL) 的标记溶液。通过反复吸打完全溶解瓶中的内容物。

重要提示：立即在使用前制备此溶液，并丢弃任何剩余溶液。

4. 根据您希望标记的蛋白质量，确定要使用的反应性染料的量，这将为您提供染料与蛋白质的摩尔比（MR）为 5 – 20 摩尔染料每摩尔蛋白质。对于 IgG，我们建议起始摩尔比为 10。
5. 将适当量的反应性染料加入含碳酸氢钠缓冲液的蛋白质溶液中，并通过反复吸打混合。
6. 在室温下避光孵育反应 2 小时。
7. 如果需要，使用超滤管或脱盐柱纯化偶联蛋白质。

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：

- 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。

- 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 (A₂₈₀) 和 pH630 Deep Red 染料在 640 nm 的吸光度。
- 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：

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

- 计算标记度 (DOL)

使用以下公式计算 DOL：

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

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