

产品说明书

LS[®] Dye Succinimidyl Ester(SE) (LS[®]琥珀酰亚胺酯)

产品规格: 1 mg

产品货号:

货号	名称	Abs _{max} /E m	A ₂₈₀ /A _{max} or C _r (protein)	Extinction coefficient(ε)	Optimal DOL(IgG)	MW
LS0034	LS405 SE (LS405 琥珀酰亚胺酯)	408/452	0.13	41,000	4-6	701

储存条件

-20°C避光保存, 有效期见外包装。

产品介绍

LS[®] SE (or NHS ester)是我司生产的具有氨基反应活性的一类荧光染料。该类染料的SE基团可以与氨基基团反应生产稳定的酰胺键。相比于市面上其他同类染料, LS[®]是稳定性更强、水溶性更好、荧光强度更优的新一代荧光染料。

使用方法 (以标记 IgG 抗体为例)

1. 实验材料

(1) 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。叠氮类化合物的存在不会影响标记反应。

- (2) 无水 DMSO
- (3) NaHCO₃
- (4) 葡聚糖凝胶 G-25 透析柱
- (5) PBS 缓冲液 (pH~7.4)
- (6) NaN₃
- (7) BSA

2. 标记方法和步骤

(1) 准备标记抗体

用 0.1 M 的 NaHCO₃ 溶液

(pH~8.3) 稀释抗体, 使抗体终浓度为 2.5 mg/mL。如果产品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 1M 的 NaHCO₃ 母液, 使 NaHCO₃ 终浓度为 0.1 M。

注: 蛋白浓度为 2.5 mg/mL 时, 标记效率大概为 35%, 蛋白浓度低于 2.5 mg/mL 也可用于标记, 但标记效率会降低。当蛋白浓度高于 5 mg/mL 时, 标记效率可能更高。由于缓冲液和蛋白纯度存在差异性, 因而更精确的标记效率由实操条件决定。如果蛋白浓度过低, 可以通过超滤法进行浓缩。

(2) 准备染料储存液

室温预热一管 1 μmole 的 LS[®] SE, 在管中加入 0.1 mL 的无水 DMSO, 充分涡旋溶解染料, 配制浓度为 10 mM 的染料储存液。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: a. 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。

b. 染料也可以用去离子水配制, 但是由于染料在水中会缓慢水解, 所以水配制的储液最好现配现用。

(3) 标记反应步骤

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 9:1 至 15:1 的范围内。LS[®] SE 标记 IgG 抗体的 DOL (结合于每个蛋白质分子上的染料数量) 范围请参考上表。

b. 在室温下搅拌反应



1 h, 微量标记时也可在摇床上振荡孵育 1 h。

注: 在进行结合反应的同时, 进行步骤 2(4), 平衡葡聚糖凝胶 G-25 透析柱。

(4) 从反应液中分离标记蛋白

a. 用 PBS 缓冲液(pH~7.4)平衡葡聚糖凝胶 G-25 透析柱(10 mm×300 mm)。

b. 将步骤 3(b)反应溶液加入柱子, 并用 1×PBS 缓冲液洗脱。首先洗脱出来的着色带是染料-蛋白结合物。

注: a. 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自由染料。

b. 当结合反应完成后, 如不及时分离染料-蛋白结合物, 可以加入 50 μL 1M 赖氨酸终止反应。多数情况下, 不需要此操作, 因为剩余的未反应的染料在反应最后已经被充分水解。

3. 确定 DOL

(1) 蛋白浓度的确定

抗体浓度可通过以下公式计算:

$$C(\text{mg/mL}) = \{[A_{280} - (A_{\text{max}} \times C_f)] / 1.4\} \times \text{稀释因子};$$

a. C 是指实验收集的抗体浓度;

b. 稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数;

c. A_{280} 和 A_{max} 分别是指在 280 nm 处的吸光度以及在吸收波长处的吸光度;

d. C_f 是校正因子, LS[®] SE 染料的 C_f 值请参考上面表格;

e. 1.4 则是指 IgG 的消光系数;

注: 过柱洗脱的蛋白溶液直接用于吸光度检测可能浓度过

大, 因此需要稀释到大约 0.1 mg/mL。稀释倍数(即稀释因子)需要从起初抗体数量(比如 5 mg)以及蛋白液洗脱的总体积来进行预估。

(2) DOL 的估算

DOL 通过下式计算:

$$\text{DOL} = (A_{\text{max}} \times \text{Mwt} \times \text{稀释因子}) / (\epsilon \times C)$$

a. A_{max} , 稀释因子, C 值在 3(1)中已经明确;

b. Mwt 是指 IgG 的分子量(150,000);

c. ϵ 是 LS[®] SE 的摩尔吸光系数, 参考第一页表格;

d. 标记 LS[®] SE 的 IgG 抗体最适 DOL 值, 请参考第一页表格, DOL 值会波动, 但也能得到很好的实验效果。

注意事项

1. 标记的蛋白如需长期储存, 推荐加入 5-10 mg/mL BSA 和 0.01-0.03% NaN_3 , 以防止蛋白变性和微生物滋生。放置于 4°C 避光保存。若加入了终浓度为 50% 的甘油, 可放 -20°C 保存。可稳定保存一年以上。

2. 操作过程注意避光, 搅拌速度应当适当以避免产生气泡。

3. 层析柱装柱时, 尽量使柱体均匀, 柱面平整, 无气泡、裂隙。

4. 上样时注意, 当柱顶缓冲液与凝胶平面相切时再加样品, 洗脱时, 当样品走至与凝胶平面相切时再加洗脱液。

5. 影响标记效率的其他因素还包括: 温度、反应时间、pH、荧光染料与蛋白的量等, 需注意控制。

6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套。

