



## LiFluor 790 琥珀酰亚胺酯

### 产品描述

LiFluor 染料是一系列优秀的荧光标记染料, 可以覆盖整个可见光谱。所有 LiFluor 染料都具有优异的水溶性。它们的亲水性使有机溶剂的使用极小化。LiFluor 染料也具有比经典荧光标记染料更好的标记性能, 如 FITC, TRITC, Texas Red, Cy3, Cy5 和 Cy7。一些 LiFluor 染料在某些抗体上明显优于 Alexa Fluor 标记染料。它们是用于标记蛋白质和核酸而不包含性能的极便宜的荧光染料 (替代 Alexa Fluor 染料)。每种 LiFluor 染料开发都与特定的 Alexa Fluor 或其他标记染料 (如 DyLight 染料) 的光谱特性相匹配。

琥珀酰亚胺基 (NHS) 酯被证明是用于胺修饰的极佳试剂, 因为形成的酰胺键基本上与天然肽键相同并且稳定。这些试剂通常是稳定的并且与脂族胺显示出良好的反应性和选择性。当琥珀酰亚胺酯化合物用于缀合反应时, 需要考虑的因素很少: 1 溶剂: 在大多数情况下, 活性染料应溶于无水二甲基甲酰胺 (DMF) 或二甲基亚砜 (DMSO) 中。2: 反应 pH: 胺与琥珀酰亚胺酯的标记反应强烈依赖于 pH。胺反应性试剂与非质子化脂族胺基团反应, 包括蛋白质的末端胺和赖氨酸的  $\beta$ -氨基。因此, 胺酰化反应通常在 pH 7.5 以上进行。通过琥珀酰亚胺酯进行的蛋白质修饰通常可以在 pH 8.5-9.5 下进行。3: 反应缓冲液: 使用胺反应试剂时, 必须避免使用含有游离胺 (如 Tris 和甘氨酸) 和硫醇化合物的缓冲液。广泛用于蛋白质沉淀的铵盐 (例如硫酸铵和乙酸铵) 也必须在进行染料缀合之前除去 (例如通过透析)。4: 反应温度: 大多数缀合在室温下进行。然而, 特定标记反应可能需要升高或降低的温度。

### 订购信息

产品名称	货号	规格
LiFluor 790 琥珀酰亚胺酯	AP35L144	1 mg

### 运输与保存

蓝冰运输。-20°C 避光保存, 有效期 12 个月。

### 使用方法

#### 1. 准备蛋白质储备溶液 (溶液 A) :

将 100  $\mu$ L 反应缓冲液 (如 1 M 碳酸钠溶液或 1 M 磷酸盐缓冲液, pH~9.0) 与 900  $\mu$ L 目标蛋白溶液 (如抗体, 蛋白质浓度 > 2 mg/ml, 如果可能) 混合至 100  $\mu$ L 给予 1 mL 蛋白质标记原液。

**注:** ①蛋白质溶液 (溶液 A) 的 pH 值应为 8.5  $\pm$  0.5。如果蛋白质溶液的 pH 低于 8.0, 则使用 1M 碳酸氢钠溶液或 1M pH 9.0 磷酸盐缓冲液将 pH 调节至 8.0~9.0 的范围。②蛋白质应溶解于 pH7.2~7.4 的 1X 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。如果蛋白质溶解在 Tris 或甘氨酸缓冲液中, 则必须用 pH7.2~7.4 的 1X PBS 透析, 以除去广泛用于蛋白质沉淀的游离胺或铵盐 (例如硫酸铵和乙酸铵)。③用牛血清白蛋白 (BSA) 或明胶稳定的不纯抗体或抗体不能很好地标记。叠氮化钠或硫柳汞的存在也可能干扰缀合反应。可以通过透析或旋转柱除去叠氮化钠或硫柳汞, 以获得极佳标记结果。④如果蛋白质浓度低于 2 mg/mL, 则结合效率会显著降低。为获得极佳标记效率, 建议最终蛋白质浓度范围为 2~10 mg/mL。

#### 2. 准备染料储备溶液 (溶液 B) :

将无水 DMSO 加入到 LiFluor 染料 SE 小瓶中以制备 10~20mM 储备溶液。通过移液或涡旋混合均匀。

**注:** 在开始缀合前准备染料储备溶液 (溶液 B), 及时使用。染料储备溶液的长期储存可降低染料活性。溶液 B 可在冰箱中保存两周, 避光保存。避免冻融循环。

#### 3. 确定最佳染料/蛋白质比例 (可选) :



**注:** 每种蛋白质都需要不同的染料/蛋白质比例, 这也取决于染料的性质。蛋白质的过度标记可能不利地影响其结合亲和力, 而低染料/蛋白质比率的蛋白质缀合物会降低灵敏度。我们建议您通过使用连续不同量的标记染料溶液重复步骤 4 和 5 来实验确定最佳染料/蛋白质比率。通常, 对于大多数染料 - 蛋白质缀合物, 推荐使用 4-6 种染料/蛋白质。

- (1) 使用 10: 1 摩尔比的溶液 B (染料) /溶液 A (蛋白质) 作为起始点: 将 5  $\mu$ L 染料储备溶液 (溶液 B, 假设染料储备溶液为 10 mM) 加入到样品瓶中。蛋白质溶液 (95 $\mu$ L 溶液 A) 有效摇动。假设蛋白质浓度为 10 mg / mL 并且蛋白质的分子量为 200KD, 蛋白质的浓度为 0.05mM。【注】: 蛋白质溶液中 DMSO 的浓度应<10%。
- (2) 运行缀合反应 (参见下面的步骤 4) 。
- (3) 重复 # 3.2, 溶液 B /溶液 A 的摩尔比为 5:1;分别为 15:1 和 20:1。
- (4) 使用预制的旋转柱纯化所需的缀合物。
- (5) 计算上述 4 种结合物的染料/蛋白质比 (DOS) (见说明书) 。
- (6) 运行上述 4 种结合物的功能测试, 确定最佳的染料/蛋白质比例, 以扩大标记反应。

#### 4.运行缀合反应:

- (1) 有效加入适量的染料储备溶液 (溶液 B) 到蛋白质溶液 (溶液 A) 的小瓶中晃动。**注:** 溶液 B /溶液的极佳摩尔比由步骤 3.6 确定。如果跳过步骤 3, 我们建议使用 10:1 溶液 B (染料) /溶液 A (蛋白质) 的摩尔比。
- (2) 继续在室温下旋转或摇动反应混合物 30~60 min。

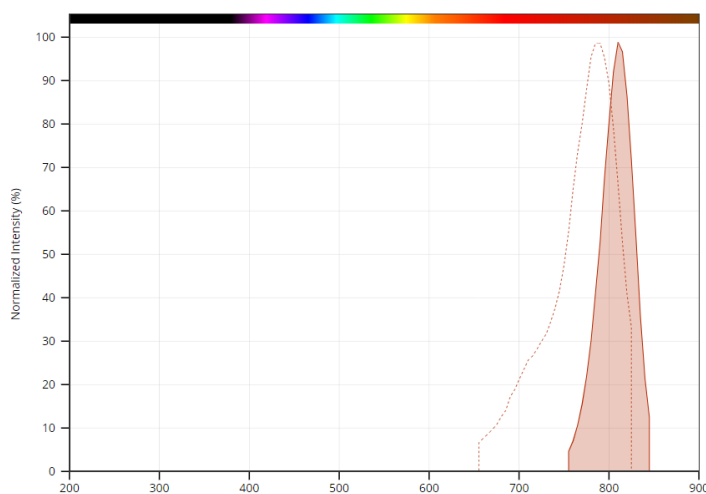
#### 5.纯化缀合物

以下方案是使用 Sephadex G-25 柱纯化染料 - 蛋白质缀合物的实例。

- (1) 按照制造说明准备 Sephadex G-25 色谱柱。
- (2) 将反应混合物 (直接从步骤 4) 加载到 Sephadex G-25 柱的顶部。
- (3) 样品在顶部树脂表面下方运行时立即加入 PBS (pH 7.2~7.4) 。
- (4) 向所需样品中加入更多 PBS (pH 7.2~7.4) 以完成色谱柱纯化。合并含有所需染料—蛋白质缀合物的级分。

**注:** ①立即使用时, 染料 - 蛋白质偶联物需要用染色缓冲液稀释, 并等分多次使用。②对于长期储存, 染料 - 蛋白质缀合物溶液需要浓缩或冷冻干燥

### 光谱性质



### 注意事项

1. 本产品仅限于科学实验研究使用, 不得用于临床诊断、治疗等领域。