



LiFluor 488 琥珀酰亚胺酯

产品描述

LiFluor 488 琥珀酰亚胺酯是 LiFluor 系列荧光标记染料之一, 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。与常规的染料(如 FITC, TRITC, Texas Red, Cy3, Cy5 和 Cy7)相比, LiFluor 染料具有更好的标记性能。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的极便宜的荧光染料(替代 Alexa Fluor 染料)。每种 LiFluor 染料的开发都与特定的 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β-氨基。因此, 胺酰反应通常在 pH 7.5 以上进行。被琥珀酰亚胺酯修饰的蛋白质是具有代表性的, 通常在 pH 8.5-9.5 下合成。 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。特定标记反应可能需要升高或降低的温度。LiFluor 系列染料是 AF 系列染料的替代品。



订购信息

产品名称	货号	规格
LiFluor 488 琥珀酰亚胺酯	AP35L154	1 mg
LiFluor 488 琥珀酰亚胺酯	AP35L155	10 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

染色样本分析

1. 准备蛋白质储备溶液(溶液 A):

将 100μL 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 900μL 目标蛋白溶液(如抗体, 蛋白质浓度 > 2 mg/mL, 如果可能)混合至 100μL, 再加入 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±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。

注 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, 必须用 pH7.2-7.4 的 1X PBS 透析, 除去广泛用于蛋白质沉淀的游离胺或铵盐 (例: 硫酸铵和乙酸铵)。

注 3: 不纯的抗体、稳定的牛血清蛋白 (BSA) 抗体或明胶不会被很好的标记。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, 以获得标记结果。

注 4: 如果蛋白质浓度低于 2 mg / mL, 则结合效率会显著降低。为获得标记效率, 建议蛋白质浓度范围为 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. 确定染料/蛋白质比例 (可选) :

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 μ 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 μ l 溶液 A) 有效摇动。假设蛋白质浓度为 10mg / 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) 重复上述步骤(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) 。
- (6) 检测上述 4 种结合物, 确定的染料/蛋白质比例, 以扩大标记反应。

4. 运行结合反应:

- (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 /溶液的摩尔比由步骤 3(6)确定。如果跳过步骤 3, 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) 按照说明书准备 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。

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。

注 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。



6. 图示

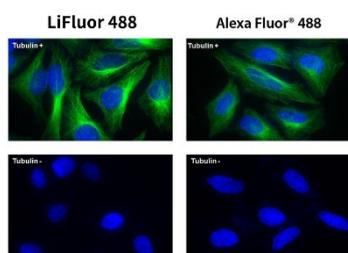


图 1. 将 HeLa 细胞与 (Tubulin +) 或 (Tubulin-) 小鼠抗微管蛋白一起孵育, 然后与 LiFluor 488 山羊抗小鼠 IgG 缀合物 (绿色, 左) 和 AlexaFluor®488 山羊抗小鼠 IgG 缀合物 (绿色) 一起孵育, 细胞核用 Hoechst 33342 *超级纯* (cat#AC12L021) 染色。

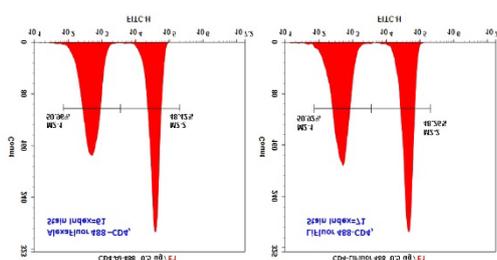


图 2. 人淋巴细胞上 AlexaFluor®488 和 LiFluor 488 抗人 CD4 的流式细胞仪分析。在每个测试中, PBMC 细胞都用 0.5 ug 488 抗人 CD4 和 0.5 ug LiFluor 488 抗人 CD4 染色。在 ACEA 流式细胞仪系统上进行流式细胞仪分析。

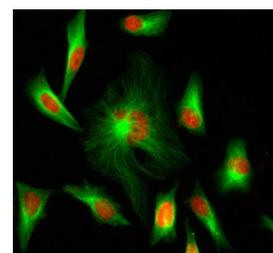
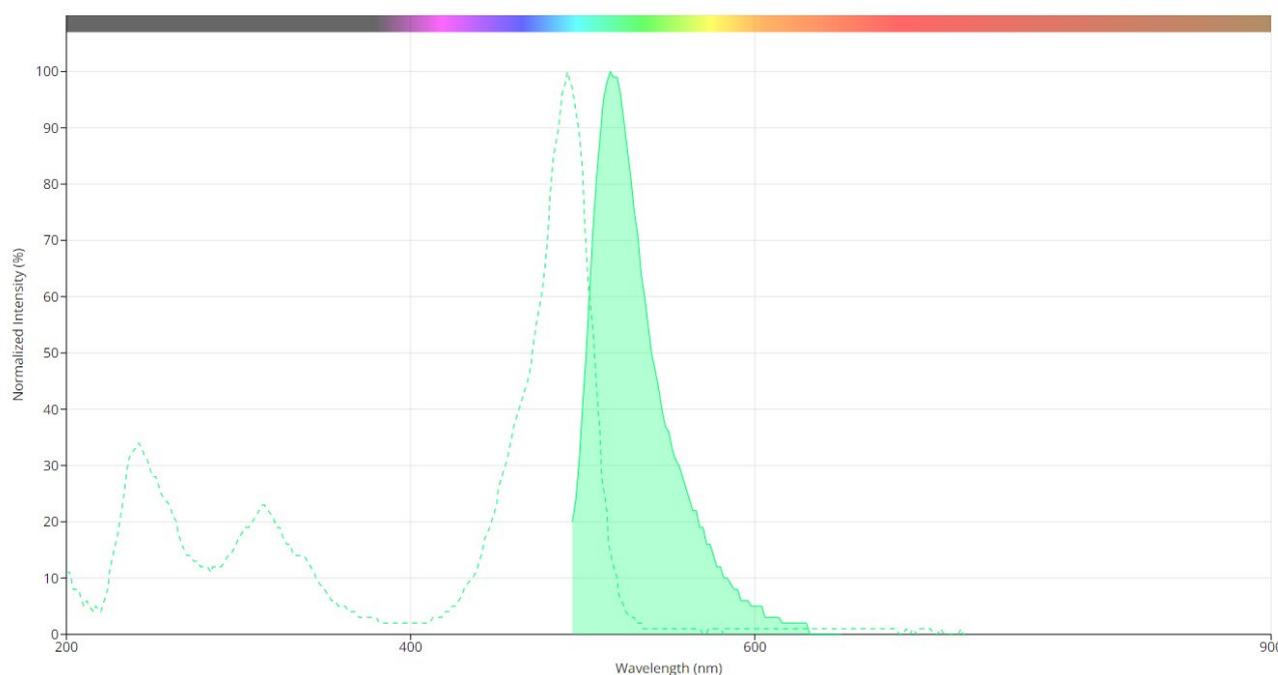


图 3. HeLa 细胞先用兔抗微管蛋白染色, 再用 LiFluor 488 山羊抗兔 IgG (H + L) 染色, 细胞核用 nuclear red DCS1 染色。

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。

相关产品推荐

Hoechst 33258 超级纯 (货号: AC12L011)

Alexa Fluor 488 标记鬼笔环肽 (绿色) (货号: AC18L032)