

CyDye mono-reactive NHS Esters (菁染料琥珀酰亚胺酯)

1. 产品简介:

菁染料是性能优良的荧光标记染料，摩尔吸光系数在荧光染料中是最高的，其琥珀酰亚胺酯是最常用的脂肪氨基标记试剂，广泛用于蛋白、抗体、核酸及其他生物分子的标记和检测。通过改变次甲基链的长度，可改变其荧光发射波长，每增加一个双键，按照 **Huoffman** 规则正好红移约 100nm。

菁染料 **Cy3** 和 **Cy5** 已成为基因芯片的首选荧光标记物；另外，**Cy5**、**Cy5.5** 和 **Cy7** 的吸收在近红外区背景非常低，是荧光强度最高、最稳定的长波长染料。特别适合于活体小动物体内成像代替放射性元素。但由于菁染料，尤其是不对称菁染料的合成副反应多，副产物极性相近，产物的分离提纯相当困难。菁染料特别是水溶性菁染料分子极性大，分离提纯越加困难。

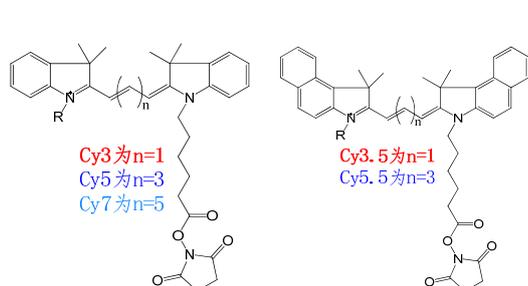


图1. 脂溶性菁染料琥珀酰亚胺酯的结构式

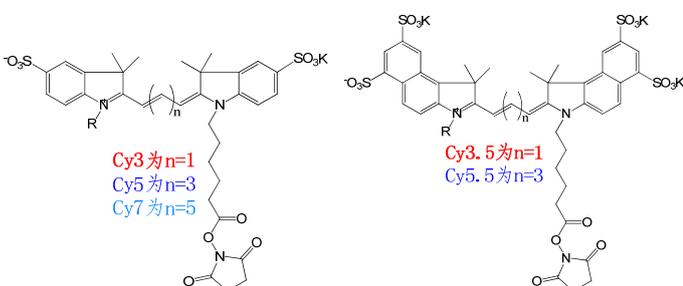


图2. 水溶性菁染料琥珀酰亚胺酯的结构式

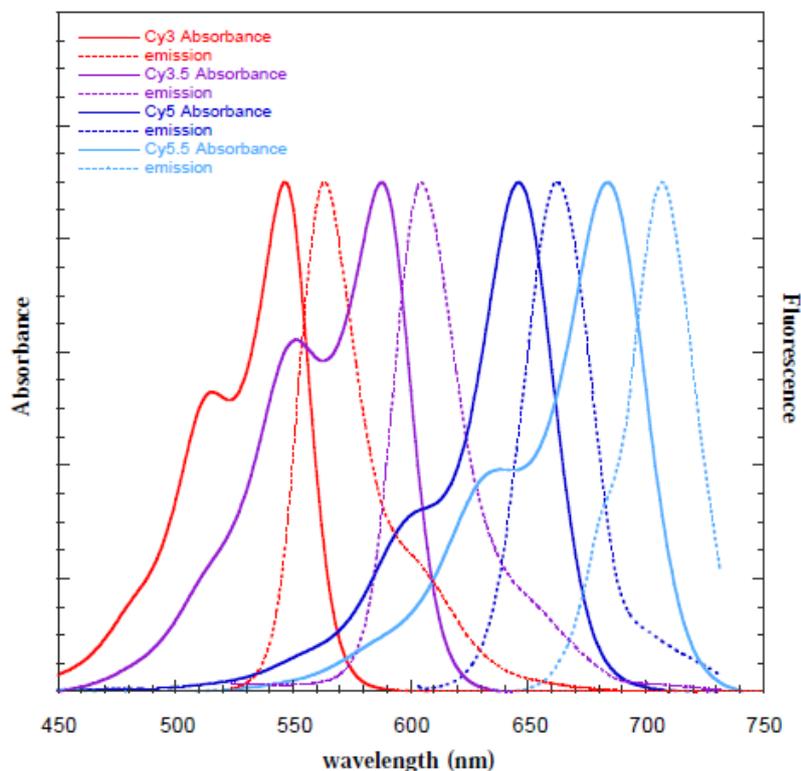
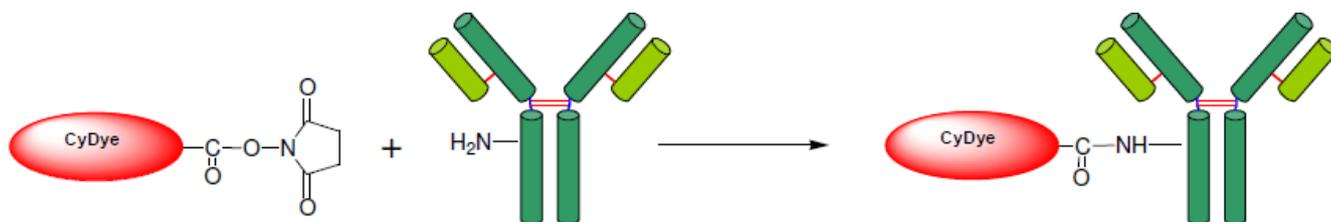


图3 菁染料琥珀酰亚胺酯的激发和发射波长光谱图

表1. 菁染料琥珀酰亚胺酯的性质参数

	Cy3	Cy3.5	Cy5	Cy5.5	Cy7
脂溶性菁染料SE分子量	568.73	668.84	594.76	694.88	620.80
水溶性菁染料SE分子量	765.95	1234.54	791.99	1260.58	818.01
最大吸收波长(nm)	552	581	650	678	750
摩尔吸光系数($M^{-1}cm^{-1}$)	150 000	150 000	250 000	250 000	200 000
最大发射波长(nm)	570	596	670	695	780
A_{280nm} / A_{max}	8%	24%	5%	18%	11%

2. 菁染料琥珀酰亚胺酯 (CyDye NHS) 的标记



菁染料和生物分子的比例 $F/P=4\sim 12$ 之间荧光强度最高， F/P 值过高荧光探针会自我淬灭并影响生物分子的生物活性，标记生物分子最好是用单琥珀酰亚胺酯，但是用双修饰的CyDye NHS并没有发现交联。CyDye NHS标记抗体在pH (8.5~9.4)时10分钟 F/P 可达5~6，而在pH 7.0几乎不反应。我们用不同比例的Cy3标记anti-glutathione-S-transferase (GST)多克隆抗体发现用1:1, 5:1, 10:1 和 20:1标记时得到的 F/P 值分别是 0.28:1, 1.16:1, 2.3:1 和4.6:1。

3. 操作步骤

3.1 水溶性Cy3 NHS标记anti-GST多克隆抗体

市场上买到的抗体如果含有其它蛋白（例如serum albumin或gelatin等）或带氨基的缓冲液会影响标记，在标记前需纯化。

1. 在1 L 0.15 M NaCl 溶液中透析anti-GST抗体(浓度为 0.5 mL at 3 mg/mL)，常温透析4小时。
2. 在4°C用新鲜的1 L 0.15 M NaCl 溶液再透析过夜。
3. 第二天用1 L 0.1 M $NaHCO_3$ (pH 8.3)透析4小时。
4. 用0.22 μm 注射器过滤头过滤抗体溶液。
5. 用0.1 M $NaHCO_3$ 稀释少量的抗体，在280nm处测其紫外吸收值计算标记抗体的总量（IgG antibody 摩尔吸光系数 $170\ 000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ at 280 nm）。
6. 用DMSO配置Cy3 NHS (MW 765.95) 溶液浓度为10 mg/mL； 计算所需体积以得到想要的CyDye

NHS 和抗体的比值(例如20:1), 然后慢慢将其加入到抗体溶液中, 同时在暗处常温缓慢搅拌45分钟。

7. 用1 L 0.15 M NaCl 溶液常温避光透析4小时除去未标记上的Cy3。

8. 在4°C用新鲜的1 L 0.15 M NaCl 溶液再避光透析过夜。

9. 用1 L of 0.01 M PBS/ 0.01% 叠氮化钠溶液常温避光透析4小时, 在4°C常温避光再次透析过夜。

10. 用0.22 μm注射器过滤头过滤抗体溶液。

11. 用0.01 M PBS/0.01 % 叠氮化钠整数倍稀释标记抗体溶液, 测量280nm (蛋白) 和552nm (Cy) 处的紫外可见吸光度。

12. 产品冷冻干燥成粉末或在0.01 M PBS/ 0.01% 叠氮化钠溶液中, -20°C避光储存。

F/P计算:

Cy3在552nm摩尔吸光系数为150 000 M⁻¹cm⁻¹; 此蛋白在280nm的摩尔吸光系数为170 000 M⁻¹cm⁻¹; 不同蛋白的摩尔吸光系数不一样;.Cy3 染料本身在280 nm 的吸收是552nm处的8%。按以下公式计算F/P值。

$$[\text{Cy3}] = A_{552}/150000$$

$$[\text{antibody}] = \{A_{280} - (0.08 \times A_{552})\}/170000$$

$$F/P_{\text{final}} = [\text{Cy3}]/[\text{antibody}] = \{1.13 \times A_{552}\} / \{A_{280} - (0.08 \times A_{552})\}$$

3.2 水溶性Cy5 NHS标记 (D-ser²)-leucine-enkephalin

1. Cy5 NHS 1.0 mg 溶解于400 μL DMSO后, 加入到1mL 的玻璃瓶中盛有(D-ser²)-leucine-enkephalin acetate (YSGFLT, 0.75 mg) 的400 μL DMSO溶液。(Dye 和peptide 投料比是 1:1)

2. 然后加入15 μL三乙胺, 常温避光搅拌反应混合物过夜。

3. 用HPLC 纯化蛋白, 使用蛋白C18柱子(25 cm×10 mm), 每次上样注入2×400 μL, 30分钟梯度洗脱从0.1% TFA水溶液到MeCN : H₂O (0.1% TFA) =70 : 30, 流速4mL /min。(对不同的蛋白选择不同的合适HPLC梯度流动相)

4. 收集适当的色带峰, 标记多肽的保留时间比未标记的多肽长。

5. 产品冷冻干燥成粉末或在水溶液中, -20°C避光储存; 必要时可用质谱表征。

6. CyDye标记的蛋白稳定性取决于蛋白本身。例如标记的IgG在4 °C可避光保存2月; 更长期的保存需加入等体积的甘油-20 °C避光保存。

F/P计算:

Cy5 在650 nm 的摩尔吸光系数为250 000 M⁻¹cm⁻¹, 所用蛋白在280 nm处的摩尔吸光系数为 170 000 M⁻¹cm⁻¹; Cy5在280nm处的吸收是650nm处的5%。按以下公式计算F/P值。

$$[\text{Cy5 dye}] = (A_{650})/250 000$$

$$[\text{peptide}] = [A_{280} - (0.05 \times A_{650})]/170 000$$

$$F/P_{\text{final}} = [\text{dye}]/[\text{peptide}] = \{0.68 \times A_{650}\} / \{A_{280} - (0.05 \times A_{650})\}$$

3.3 水溶性 CyDye SE 标记 OLIGO

氨基封端的OLIGO可以标记CyDye SE，但是非常困难；标记前因为OLIGO经氨水脱保护，请务必洗掉所有的残余氨水。然后将样品真空干燥；然后溶于0.25 ml 的0.5 M NaCl 溶液中，用Sephadex G-50 脱盐，用5.0 mM borate 缓冲液平衡到pH=8.0，然后用以上硼酸缓冲液冲下OLIGO。然后浓缩至干的样品溶于0.1 M carbonate buffer (pH 8.5-9.0)；在0.5mL碳酸缓冲液中30 nmoles的OLIGO加入到CyDye SE 的玻璃瓶中室温避光，密闭搅拌反应60min。反应物经Sephadex G-50或 RP-HPLC过柱纯化，冷冻干燥后避光保存。

注意: Oligonucleotides 和 oligopeptides 由于太小经常会留在过滤膜上或在冻存管内贴壁成膜，而无法标记。

3.4 小动物活体成像领域的应用



活体动物体内成像技术是指应用影像学方法，对活体状态下的生物过程进行组织、细胞和分子水平的定性和定量研究的技术。小动物活体成像是近年来在生物医药方面非常活跃和前沿的领域，在研究细胞行为，药物活性和代谢，疾病的进展等方向取得了革命性的进步。分为生物发光成像（以Caliper和Xenon仪器为代表）和荧光成像（以KODAK和CRI仪器为代表）。

上海俊晟生物科技有限公司提供近红外的荧光成像染料及其与小分子药物和生物大分子的荧光标记服务，并提供生物发光底物虫荧光素（D-luciferin）和腔肠素（coelenterazine）。

1. 荧光成像的推荐步骤：

- 1) SPF级 BALB/C裸鼠，6~8 周龄，18~20克，实验前24 h 自由进食、饮水。
- 2) 于实验裸鼠腹腔内注射2%戊巴比妥钠300 μ L(215 mg/ kg)麻醉动物。将裸鼠俯卧位平放于小动物多光谱活体成像系统的记录暗箱中。实验时将Cy7或Cy7标记的生物分子或药物最好溶于水（或甲醇/乙醇/乙二醇，有时DMSO 200 μ L能把小鼠杀死）稀释后，于裸鼠尾静脉注射200 μ L（浓度0.5 mg/mL）**最佳用量和时间需要客户根据自己的仪器和药物试剂等条件优化**。每5min 记录1 张动物在体内发射荧光的成像图片，分析荧光药物的分布情况。对照鼠不注射药物，进行同时记录。记录结束后迅速解剖裸鼠的心、肝、脾、肺、肾等脏器，进行成像。

3) Cy7 检测时激发波长 700~770 nm 带通, 发射波长 790 nm 长通。液晶可调谐滤光片扫描范围 780~950 nm, 扫描步进 10 nm。曝光时间为 500 ms。

不同的药物代谢时间不一样, 注射入裸鼠体内, 荧光立即分布全身, 然后逐步向膀胱聚集, 呈现显著的肾排泄的特点一般 4~6 小时, 快的只有 30 分钟; 如果是骨骼和鼻腔等部位靶点的 Cy7 标记药物, 有客户反映一周后活体成像系统仍能检测到荧光成像。

器官切片观察: 将解剖的器官迅速放置于 4%多聚甲醛固定 4 小时以上, 0%, 20%, 30%PBS 蔗糖依次沉底, 20 μ m 切片, 多聚赖氨酸洗过的载玻片贴片, 晾干, DAPI 染色。共聚焦显微镜观察, 激光器为氩氦 633 nm。

2. 荧光成像常见问题

1) 什么类型的小鼠适合活体成像?

毛发对光有散射, 建议用裸鼠。

2) 给裸鼠注射的最佳和最大注射试剂体积?

试剂的体积用量根据所采取的方式不同而不同, 下面是体重 25g 的裸鼠注射量。

	Route	Recommended	Maximal
静脉注射	Intravenous (IV)	50~125 μ L	200 μ L
腹腔注射	Intraperitoneal (IP)	500 μ L	2 mL
皮下注射	Sub-cutaneous (SC)	100~250 μ L	1 mL

3) 注射针头的尺寸是多少?

推荐使用具有固定针头的 28~32 号结核菌素或胰岛素注射器 (0.3 或 1mL)

4) 肿瘤成像需要注射多大剂量的标记抗体?

推荐起始用量 50 μ g 来优化最佳用量。

5) 未标记的染料在老鼠体内如何代谢?

未标记水溶性染料通过膀胱排泄, 静脉注射后最快能在 3min 检测到膀胱内的荧光信号。

6) 注射后多长时间开始成像?

成像时间和成像持续时间与注射试剂有关。血管示踪剂注射后马上即可成像并持续成像数小时。注射标记的抗体 IgG 到达靶点需要数小时, 而后才成像并持续成像数天。

7) Super Fluor dyes 的荧光寿命是多少?

Super Fluor 647 在 20°C 水中 $\tau=1$ ns

Super Fluor 680 在 20°C 水中 $\tau=1.2$ ns

Super Fluor 750 在 20°C 水中 $\tau=0.7$ ns

8) 推荐小动物活体成像的网站。 <http://radiologycme.stanford.edu>

4. 稳定性与储存:

未开封的粉末在避光干燥-20℃存放12月。CyDye NHS水溶液现配现用不能储存。任何溶解后的CyDye NHS粉末最好立即使用；绝对无水的DMSO溶液-20℃保存最多2个星期。

相关产品:

Cy系列:

目录号	产品名称	Ex (nm)	Em (nm)	产品描述	规格
1050	Cy3	548	562		5 mg
1051	Cy3, SE	548	562		1 mg
1053	Cy5	646	664	活体成像用试剂	5 mg
1054	Cy5, SE	646	664	活体成像用试剂	1 mg
1056	Cy5.5	673	692	活体成像用试剂	5 mg
1057	Cy5.5, SE	673	692	活体成像用试剂	1 mg
1058	Cy7	747	774	活体成像用试剂	5 mg
1059	Cy7, SE	747	774	活体成像用试剂	1 mg

Super Fluor系列: Cy系列升级产品 (与Invitrogen的Alexa Fluor系列完全相同)

目录号	产品名称	Ex (nm)	Em (nm)	产品描述	规格
1003	Super Fluor 488	494	518	FAM的升级产品	5 mg
1023	Super Fluor 488, SE	494	518	FITC的升级产品	1 mg
1006	Super Fluor 555	556	567	Cy3的升级产品	5 mg
1028	Super Fluor 555, SE	556	567	Cy3, SE的升级产品	1 mg
1009	Super Fluor 647	651	668	Cy5的升级产品	5 mg
1031	Super Fluor 647, SE	651	668	Cy5, SE的升级产品	1 mg
1012	Super Fluor 680	680	702	Cy5.5的升级产品	5 mg
1035	Super Fluor 680, SE	680	702	Cy5.5, SE的升级产品	1 mg
1015	Super Fluor 750	750	775	Cy7的升级产品	5 mg
1037	Super Fluor 750, SE	750	775	Cy7, SE的升级产品	1 mg