

Super Fluor 750 (效果同Alexa Fluor 750)

货号: PMK0924

保存: -20°C干燥避光, 有效期12个月。

规格: 5 mg

用途: 可广泛用于蛋白、抗体、核酸及其他生物分子的标记和检测。

产品简介:

Super Fluor系列(可替代Alexa Fluor 系列)荧光探针, 具有更强的荧光强度, 更广的pH应用范围(pH 4~10), 更好的抗淬灭性。在生物荧光领域已逐渐替代FITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7等荧光染料。 Super Fluor 750 NHS= Super Fluor 750 SE~Alexa Fluor 750 SE。

原料准备:

A. 活性染料 1mg; B. 碳酸氢钠 ~84mg; C. 抗体纯化树脂P-30 / Sephadex G25M / 透析袋; D. 空柱 5 个; E. 收集管 5 个;

注意: 纯化的蛋白buffer中不得含有铵离子或伯胺, 因为它们会与蛋白质竞争结合活性染料。不纯的抗体或者含BSA或明胶的抗体标记效果不好。低浓度的NaN₃(<3mM)或thimerosal (<1mM)不影响偶联效果。

实验步骤:

1. 蛋白溶解: 用0.1 M NaHCO₃溶解至终浓度为2mg/ml。将1ml 去离子水加入84mg NaHCO₃瓶中, 配成1M碳酸氢钠溶液。振荡或吹打至完全溶解。该溶液pH~8.3, 2~6°C保存可用2星期; 若抗体是溶液, 将抗体稀释至2mg/ml, 再加入1/10 体积的上述碳酸氢钠溶液; 若抗体是冻干粉, 将1M 碳酸氢钠溶液用10 倍去离子水稀释成0.1M 后, 用其将抗体溶成2mg/mL的溶液;
2. 染料溶解: 染料固体粉末从冰箱放入干燥器中慢慢升至常温后, 用无水DMSO将染料配置浓度为1mg/mL。
3. 标记: 在1mL蛋白溶液中缓慢加入适量染料溶液(蛋白: 染料摩尔比=1:20~50; 质量比可在以下范围内优化10~200ug Superdye每毫克IgG抗体)。同时在暗处常温缓慢搅拌1小时(也可以直接将蛋白溶液直接加入染料的固体粉末的试剂瓶中, 同时在暗处常温缓慢搅拌1小时)。
4. 纯化: 选择下面三种方式纯化后, 产品冷冻干燥成粉末或在0.01 M PBS/2mM叠氮化钠溶液中, -20°C避光储存。
5. 贮存: 标记好的蛋白贮存于2~6°C, 避光。若纯化的蛋白偶联物浓度小于1mg/ml, 加入BSA 或其他稳定蛋白1~10mg/ml。在2mM NaN₃存在的情况下, 2~6 度可保存几个月。保存更长时间, 则需分装后-20°C保存。避免反复冻融, 避光保存。

纯化方法1、透析法:

- 1) 简单纯化可用100 mL 0.15 M NaCl溶液常温避光透析4次, 每次4小时除去未标记上的染料。
- 2) 在4°C用新鲜的1L0.15 M NaCl溶液再避光透析过夜。

产品说明书

- 3) 用100 mL of 0.01 M PBS/ 0.01% NaN₃溶液常温避光透析4小时，在4℃常温避光再次透析过夜。
- 4) 用0.22 μm注射器过滤头过滤抗体溶液。

纯化方法2. P-30柱子

- 1) 0.5g p-30凝胶加入9mL PBS (pH=7.4) 室温过夜放置；次日，弃上清；真空抽滤5min；
- 2) 加入9mL PBS, 轻柔震荡均匀，放置20min后，去除上清液
- 3) 再重复2
- 4) 将树脂柱放入一个13×100mm玻璃管柱中，每个柱子加入1.5mL(不要多加)，填的要均匀不能有气泡。具体方法是：搅动纯化树脂(组分C)，加入1.0mL悬浮液至空柱中静置；全部下沉后再加入0.5m树脂至床体积为~1.5ml盖上盖子，室温保存。
- 5) 将树脂柱上下端的口打开。放入10mL离心管中，水因重力自然流下，用垂直转子1100g 离心3min，rpm与相对离心力g的换算公式如下：相对离心力 $g = (1.12 \times 10^{-5}) (\text{rpm})^2 (\text{半径cm})$ ；离心后静置待缓冲液全部流出，弃去缓冲液，保留收集管（若没有垂直转子，角转子也可）
- 6) 换上干净的离心管，将标记的蛋白反应液200 μl逐滴加入树脂的中心部位，使溶液被吸入胶床中；
- 7) 将树脂柱放入空的收集管中，1100g 离心5min
- 8) 离心后收集管内是标记好的蛋白，溶在100 μL PBS中 (pH7.2，含2mM的NaN₃)，未结合的染料保留在柱中，弃去树脂柱。注意事项：配置柱子时，用较细的小瓶，每个小瓶配置2个柱子。便于去除水分。填柱子时，加到1.5mL、尽量不要多加，离心时间按照说明书1000g/3min

纯化方法3. PD-10 column

3.1. 装填柱层析分离吸附柱

- 1) 提前用去离子水浸泡葡聚糖Sephadex过夜(1g配5mL水)，使其溶胀，打开孔状结构。
- 2) 湿法装柱：(装填过程中确保PBS (10mM, pH=7.4) 液面比Sephadex高，以防混入空气而产生气泡) 先在柱子(13×100mm)内注入3/4左右的PBS，而后加入Sephadex /PBS溶液；分批次、缓慢加入柱子内，最后用塑料滴管吸取，沿着柱子四壁旋转，逐步、缓慢地加入，装填至近满，留下约3cm的空间以待注入荧光标记蛋白溶液；
- 3) 在装填的过程中打开活塞(淋出液用大烧杯承接)，同时用玻璃棒+橡胶塞从下到上轻轻敲打柱子，使Sephadex装填紧密，注意使柱子内不得有气泡，不得有断层，使柱子竖直，确保顶部端面水平；(滴加Sephadex时应旋转加入，不得直接滴加，以免激起柱顶层)
- 4) 装填完柱子后，用塑料滴管吸取PBS，沿管口四壁旋转着缓慢加入，使PBS过一遍柱子，而后将PBS注入Sephadex顶部，以隔绝空气，以免在柱内产生气泡，关闭末端活塞；

3.2过柱层析分离吸附柱(避光)

- 1) 打开柱子末端活塞，缓慢放出柱子顶层的PBS，待PBS液面刚与Sephadex柱子端面相平时，立即关闭活塞；注意不要使PBS液面低于Sephadex柱子端面，以免混入空气而在柱子内产生气泡；立即用塑料滴管吸取荧光蛋白溶液，沿柱子四壁旋转，缓慢加入(全部加完，不要搅动Sephadex随时保持其端面水平)
- 2) 待荧光蛋白溶液全部加完后，打开活塞，使荧光蛋白溶液流入柱子中；
当荧光蛋白溶液的液面刚刚完全进入柱子时，立即用塑料滴管加入PBS(缓慢沿管子四壁旋转加入)，在荧光蛋白溶液过柱子的过程中注意随时添加PBS，确保Sephadex端面不与空气接触；
- 3) 用烧杯承接最初的淋出液，几分钟后带颜色的溶液便从柱子顶部往下流，而后分作三段；柱子下端(靠近活塞)：

产品说明书

荧光标记的蛋白，带颜色，流速较快；

柱子中间：空白无颜色部分，两者的过渡区域；

柱子上端：未与蛋白反应的染料，带颜色，流速较慢；

4) 待下端带颜色的荧光蛋白溶液的前沿进入活塞时，立即用5mL冻存管(锡箔纸避光)承接此淋出液(此即荧光蛋白溶液)；直至荧光蛋白溶液的尾部进入活塞口为止。

5) 用10倍柱体积的PBS洗掉未反应的染料。使柱子再生后重复使用。长时间储存柱子可用含0.05%NaN₃的PBS溶液平衡柱子后，密闭封严在2~8℃储存。

计算标记比例F/P值：

对于IgG 等大多数抗体来说，摩尔吸光系数为203000，F/P值在4~9 之间是最合适。

1. Super Flour 488标记蛋白F/P值计算：

1) 用PBS 精确倍数稀释定量的少许纯化过的偶联蛋白，在1cm比色皿中测定280nm和494nm的光吸收；

2) 计算样品中的蛋白浓度：蛋白摩尔浓度=(A₂₈₀-(A₄₉₄×0.11))×稀释倍数/203000

3) 计算标记比例： 每摩尔蛋白结合的染料摩尔数=A₄₉₄×稀释倍数/71000×蛋白摩尔浓度)

2. Super Flour 555标记蛋白F/P值计算：

1) 用PBS 精确倍数稀释定量的少许纯化过的偶联蛋白，在1cm比色皿中测定280nm和555nm的光吸收；

2) 计算样品中的蛋白浓度：蛋白摩尔浓度=(A₂₈₀-(A₅₅₅×0.08))×稀释倍数/203000

3) 计算标记比例：每摩尔蛋白结合的染料摩尔数 =A₅₅₅×稀释倍数/(150000×蛋白摩尔浓度)

3. Super Flour 647标记蛋白F/P值计算：

1) 用PBS精确倍数稀释定量的少许纯化过的偶联蛋白，在1cm比色皿中测定280nm和650nm的光吸收

2) 计算样品中的蛋白浓度：蛋白摩尔浓度=(A₂₈₀-(A₆₅₀×0.03))×稀释倍数/203000

3) 计算标记比例： 每摩尔蛋白结合的染料摩尔数=A₆₅₀×稀释倍数/(239000×蛋白摩尔浓度)

4. Super Flour 680标记蛋白F/P值计算

1) 用PBS 精确倍数稀释定量的少许纯化过的偶联蛋白，在1cm比色皿中测定280nm和680nm的光吸收；

2) 计算样品中的蛋白浓度：蛋白摩尔浓度=(A₂₈₀-(A₆₅₀×0.05))×稀释倍数/203000

3) 计算标记比例：有摩尔蛋白结合的染料摩尔数=A₆₅₀×稀释倍数/(184000×蛋白摩尔浓度)

5Super Flour 750标记蛋白F/P值计算：

1) 用PBS精确倍数稀释定量的少许纯化过的偶联蛋白，在1cm比色皿中测定280nm和750nm的光吸收；

2) 计算样品中的蛋白浓度：蛋白摩尔浓度=(A₂₈₀-(A₇₅₀×0.04))×稀释倍数/203000

3 计算标记比例：每摩尔蛋白结合的染料摩尔数=A₇₅₀×稀释信数/(240000×蛋白摩尔浓度)

常见问题：

1. 标记效率低 计算结果显示每摩尔145,000 MW的蛋白标记的荧光团少于4摩尔，可能有以下原因：

1) 抗体缓冲液中含有痕量伯胺成分，与染料反应降低了标记效率。如果蛋白已经溶于含氨基的缓冲液(如Tris或氨基乙酸)标记前用PBS透析。

2) 蛋白含量较低(≤1mg/mL)会影响标记效率。

3) 标记步骤中加入碳酸氢钠的作用是将反应混合物的pH升高至~8，因为在弱碱性环境中标记反应的效率最高。

产品说明书

如果蛋白溶液的缓冲范围在低pH，建议用0.1M的NaHCO₃透析。

4) 研究显示pH升至9.0~9.4，标记效率和标记速度(只需10min)明显改善。

5) 不同抗体与荧光团的反应速率不同，染料标记后保留的生物活性程度也不同，客户需根据自己的条件优化标记步骤。为增加标记率，可以对同一样品进行再标记，或减少蛋白的量加大染料的数量重新标记。有研究者在室温孵育1小时后再4℃孵育过夜，情况有所改善。

2. 过标记——计算结果显示每摩尔145,000 MW 的蛋白标记的荧光团大于10摩尔。虽然过标记的蛋白也可以使用，但可能会引起蛋白的聚集、降低抗体结合抗原的特异性，这些都会造成非特异性结合。过标记还会引起荧光淬灭。可以增加蛋白或减少反应时间。

3. 未结合染料未去除——如果游离染料残留在偶联物溶液中，使标记计算的值偏高。可用分离柱再次分离或透析去除。

4. 蛋白或蛋白偶联物无法洗脱，不要再加缓冲液，只需再次离心一次或几次。

注意事项：

- 1) 其水溶液现配现用不能储存；
- 2) 任何溶解后的染料最好立即使用；
- 3) 无水的DMSO溶液-20℃保存最多2个星期。

相关产品：

PMK1300 考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液

PMK053 GAPDH mAb-HRP conjugated

PMK0312 抗体稀释液

PMK1700 PBST缓冲液

PMK1020 IPTG 溶液 (50mg/ml)

PMK1010 30%丙烯酰胺 (29:1)

PMK1070 5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液

PMK0012 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒



更多产品详情了解，请关注公众号：