产 品 说 明 书

Sulfo-Cy5-E Maleimide（磺酸基-Cy5-乙基马来酰亚胺）

产品货号：1 mg

产品规格：SB-YM0068

应用范围：荧光标记染料、巯基标记染料

产品参数

外观：可溶于水、DMSO 或 DMF 的黑绿色固体

Ex/Em：647/665 nm

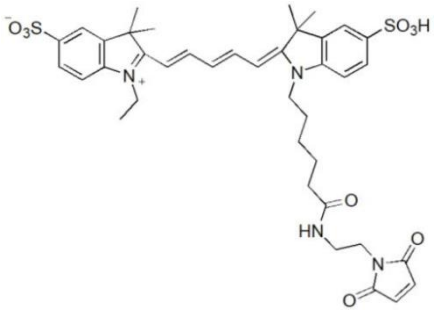
分子式：$C_{39}H_{46}N_4O_9S_2$

分子量：778.9

消光系数：271,000

效能等同于：Alexa Fluor 657，TRITC，DyLight 640 等

分子结构图：



储存条件

-20℃避光保存，有效期见外包装。

产品介绍

花菁染料 Sulfo-Cy5-E 是一种远红外荧光标记染料，该染料具有高度亲水性和水溶性，含有游离的、未活化的单官能团羧酸。而 Sulfo-Cy5-E Maleimide 是 Sulfo-Cy5-E 染料的硫醇反应形式。Maleimide 与硫醇基团反应形成硫醚偶联产物。反应可以在 pH=7 的胺中进行。在中性 pH 环境中，Maleimide 基团不与组氨酸或精氨酸反应。

菁染料是性能优良的荧光染料，摩尔吸光系数在荧光染料中是无可比拟的，其琥珀酰亚胺酯是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 100 nm。

水溶性菁染料 Cy3 和 Cy5 已成为基因芯片的普遍荧光标记物；另外，Cy5，Cy5.5 和 Cy7 的吸收在近红外区背景非常低，是荧光强度较高、稳定性较好的长波长染料。特别适合于活体小动物体内成像代替放射性元素。

使用方法（以标记IgG抗体为例）

1. 实验材料

（1）无水 DMSO

（2）10-100 mM 磷酸盐（例如 PBS），Tris 或 HEPES 缓冲液，pH 7.0-7.5

（3）交联葡聚糖 G-25

（4）（可选）用 Tris-(2-carboxyethyl) phosphine（TCEP）还原蛋白质中二硫键以产生游离巯基。

（5）NaN_3

（6）BSA

2. 标记方法和步骤

（1）准备标记抗体

a. 在室温下，将抗体溶于缓冲液中，使终浓度为 50-100 μM（IgG 为 7.5-15 mg/mL）。

b. 任选步骤：如果要让蛋白质中的二硫键释放出更多的硫醇基团，则可以在此阶段加入约 10 倍摩尔数的过量的 TCEP。将反应溶液孵育约 30 min。还原反应和随后的标记反应最好在惰性气体（N_2 或 Ar）存在下进行，以防止二硫键重新形成。

（2）准备染料储备液

取出 Sulfo-Cy5-E Maleimide 染料，恢复至室温。制备 10 mM 染料储液。对于 1 μmol 染料：向小瓶中加入 100 μL 无水 DMSO 即可。短暂涡旋，完全溶解染料，然后进行短时间离心，使染料集中于管子底部。

注：a. 如果要用少量的蛋白质进行标记反应，染料储备溶液可能需要稀释至更低浓度，以保证量取体积的准确性。

b. 未使用的储液可避光、干燥储存于-20℃，以备后续使用。如果使用无水 DMSO 制备溶液，染料可稳定至少一个月。

c. 染料储备溶液也可以用 ddH_2O 或含水缓冲液中制备。然而，因为染料会随着时间的推移而水解，所以水溶性的储存液需要现配现用，不能保存后再使用。

（3）标记反应步骤

a. 在搅拌或涡旋蛋白质溶液的同时，加入一定量的染料储备溶液，以产生染料、蛋白摩尔比为 10-20 的混合液。例如，对于 50 μM 的 IgG，应添加染料至染料最终浓度为 0.5-1 mM。

b. 在室温下避光搅拌反应 2h 或 4℃过夜。

注：进行标记反应的同时，进行步骤（4）a 制备葡聚糖柱。

（4）从反应液中分离标记蛋白

a. 用 PBS 缓冲液（pH~7.4）平衡葡聚糖柱（10 mm × 300 mm）。

b. 将步骤（3）b 中的反应溶液装载到柱上，并用 PBS 缓冲液洗脱柱。从柱中洗脱的第一条带对应于抗体缀合物。

注：对于小规模的标记反应，为了避免产物过度稀释，可以使用超滤装置去除结合物中游离染料。10K 超滤管可用于 IgG 蛋白；具有不同分子量的蛋白需要不同的超滤管。

3. 确定 **DOL**

（1）确定蛋白浓度

染料标记的抗体浓度可通过以下公式计算:

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

a. C 是指实验收集的 YF 标记的抗体浓度；

b. 稀释因子是指在吸光度测量时的稀释倍数；

c. A_{280}和A_{max}分别是指在280nm处的吸光度以及在最大吸收波长(~647nm)处的吸光度；

d. Cf 是校正因子，Sulfo-Cy5-E Maleimide的Cf值为0.13；

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）以及收集的洗脱蛋白液的体积来进行预估。

（2）DOL的估算

DOL通过下式计算:

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

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Sulfo-Cy5-E Maleimide的摩尔吸光系数。

注意事项

1. 产物如需长期储存，我们建议添加BSA和NaN_3，并使其终浓度分别为5-10 mg/mL和0.01-0.03%，以防变性和微生物污染。

2. 标记好的抗体溶液应4℃避光保存，如果加入终浓度为50%的甘油，则可储存在-20℃，在这些条件下，产物可稳定保存一年或更长时间。