

产 品 说 明 书

产品名称: YF[®] Dye Succinimidyl Ester (SE)

| 货号 | 名称 | Abs _{max} /Em | A ₂₈₀ /A _{max} or C _f (protein) | Extinction coefficient | Optimal DOL (IgG) | MW |
|-------------|---|------------------------|---|---------------------------|------------------------|-------|
| BN10023-1mg | YF [®] 350 SE | 347/448 | 0.14 | 18,000 | 4-6 | ~700 |
| BN10033-1mg | YF [®] 405S SE | 404/431 | 0.7 | 33,000 | 5-10 | ~1028 |
| BN10034-1mg | YF [®] 405M SE | 408/452 | 0.13 | 41,000 | 4-6 | ~701 |
| BN10019-1mg | 6-YF [®] 488-P ₄ SE | 490/515 | 0.1 | 70,000 | 7-9 | ~879 |
| BN10020-1mg | 6-YF [®] 488-X SE | 490/515 | 0.1 | 70,000 | 7-9 | ~745 |
| BN10030-1mg | 5-YF [®] 488 SE | 490/515 | 0.1 | 70,000 | 7-9 | ~834 |
| BN10032-1mg | 5-YF [®] 488-P ₄ SE | 490/515 | 0.1 | 70,000 | 7-9 | ~879 |
| BN10029-1mg | YF [®] 532 SE | 527/558 | 0.06 | 96,000 | 4-7 | ~784 |
| BN10036-1mg | YF [®] 555 SE | 555/565 | 0.08 | 150,000 | 3-6 | ~1077 |
| BN10022-1mg | YF [®] 568 SE | 562/583 | 0.08 | 100,000 | 5-6 | ~812 |
| BN10027-1mg | YF [®] 594 SE | 593/614 | 0.08 | 115,000 | 4-7 | ~927 |
| BN10026-1mg | YF [®] 594-P ₄ SE | 593/614 | 0.08 | 115,000 | 4-7 | ~1073 |
| BN10031-1mg | YF [®] 620R SE | 617/639 | 0.45 | 115,000 | 5-6 | ~937 |
| BN10018-1mg | YF [®] 633 SE | 630/650 | 0.48 | 100,000 | 4-7 | ~919 |
| BN10024-1mg | YF [®] 640R SE | 642/662 | 0.37 | 105,000 | 4-7 | ~930 |
| BN10035-1mg | YF [®] 647A SE | 650/665 | 0.03 | 240,000 | 3-6 | ~1258 |
| BN10025-1mg | YF [®] 660R SE | 663/682 | 0.51 | 100,000 | 4-7 | ~1087 |
| BN10021-1mg | YF [®] 680R SE | 680/701 | 0.32 | 140,000 | 5-6 | ~1111 |
| BN10056-1mg | YF [®] 750 SE | 750/777 | 0.03 | 250,000 | 2-5 | ~1285 |
| BN10064-1mg | YF [®] 640R-P ₄ SE | 642/662 | 0.37 | 105000 | 4-7 | ~1175 |
| BN10065-1mg | YF [®] 640R-P ₈ SE | 642/662 | 0.37 | 105000 | 4-7 | ~1352 |

储存条件

-20℃避光保存, 可以储存 6 个月

基团反应生产稳定的酰胺键。相比于市面上其他同类染料, YF[®]是具有稳定性更强、水溶性更好、荧光强度更优的新一代荧光染料。

产品介绍

YF[®] SE (or NHS ester) 是 BIORIGIN 生产的具有氨基反应活性的一类荧光染料。该类染料的 SE 基团可以与氨

BIORIGIN 还提供小批量抗体标记试剂盒 Super-n-Stain[™] Antibody Labeling Kits (BN16011), 可在 30 min 内标记 5-100ug 抗体, 而无需纯化步骤, 简单方便。

本产品仅用于科研

使用方法（以标记 IgG 抗体为例）

1. 实验材料

■ **IgG:** IgG 不可含有可与染料反应的胺类化学物质，如氨基酸、Tris、BSA、明胶等。如果 IgG 中含有此类化学物质，应用 pH~7.4 的 PBS 缓冲液预先透析处理。叠氮类化合物的存在不会影响标记反应。

■ YF® SE 荧光染料

■ 无水 DMSO

■ NaHCO₃

■ 葡聚糖凝胶 G-25 透析柱（注：YF640R SE 染料请选用 G-50，其它染料选用 G-25 即可）

■ PBS 缓冲液（pH~7.4）

■ NaN₃

■ BSA

2. 标记方法和步骤

2.1 准备标记抗体

用 0.1 M 的 NaHCO₃ 溶液（pH~8.3）稀释抗体，使抗体终浓度为 2.5mg/mL。如果产品预先用磷酸盐缓冲液稀释，如 PBS 缓冲液（不含胺基类化合物），那么可以直接在该缓冲液中加入约 1/10 体积 1M 的 NaHCO₃ 母液，使 NaHCO₃ 终浓度为 0.1 M。

注：蛋白浓度为 2.5 mg/mL 时，标记效率大概为 35%，蛋白浓度低于 2.5 mg/mL 也可用于标记，不过此浓度下标记效率会降低。当蛋白浓度高于 5 mg/mL 时，标记效率可能更高。由于缓冲液和蛋白纯度存在差异性，因而更精确的标记效率由实际操作条件决定。如果标记蛋白浓度稀释过低，可以通过超滤法进行浓缩。

2.2 准备染料储存液

室温预热一管 1 μmole 的 YF SE，在管中加入 0.1 mL 的无水 DMSO，配制浓度为 10 mM 的染料储存液。适当条件下，可以涡旋以便充分溶解染料。如果使用更微量的蛋白进行标记反应，那么染料需要稀释至更低浓度。

注：1）剩余的染料储存液应于 -20°C 低温存放，以备后续使用。如果使用无水 DMSO 配制染料储存液，那么染料至

少可以保存一个月。

2）染料也可以去离子水配制，但是由于染料在水中会缓慢水解，所以在结合反应开始前，水配制的储存液最好现配现用。

2.3 标记反应步骤

a) 搅拌或涡旋混匀蛋白溶液，逐步滴加 15-25 μL 的染料储存液（10 mM），使染料/蛋白的摩尔比在 9 : 1 至 15 : 1 的范围内。如步骤 2.1 所述，蛋白稀释浓度越高，染料/蛋白的摩尔比越高，这也意味着标记效率更低。YF® SE 标记 IgG 抗体的 DOL（结合于每个蛋白质分子上的染料数量）值请参考上表。

b) 在室温下搅拌反应 1 h，或者微量标记时在摇床上振荡孵育 1h。

注：在进行结合反应的同时，进行步骤 2.4，平衡葡聚糖凝胶 G-25 透析柱。

2.4 从反应液中分离标记蛋白

a) 用 PBS 缓冲液（pH~7.4）平衡葡聚糖凝胶 G-25 透析柱（10 mm × 300 mm）。

b) 将步骤 2.3 反应溶液加入柱子，并用 1 × PBS 缓冲液洗脱。首先洗脱出来的着色带是染料-蛋白结合物。

注：1）对于小规模标记反应，为了避免过度稀释产物，可以使用超滤装置去除结合物中的自由染料。

2）当结合反应完成后，如不及时分离染料-蛋白结合物，可以加入 50 μL 1M 赖氨酸终止反应。多数情况下，不需要此操作，因为剩余的未反应的染料在反应最后已经被充分水解。

3. 确定 DOL

3.1 蛋白浓度的确定

抗体浓度可通过以下公式计算： $C(\text{mg/mL}) = \{[A_{280} - (A_{\text{max}} \times C_f)]/1.4\} \times \text{稀释因子}$ 。

■ C 是指实验收集的抗体浓度；

■ 稀释因子是指在光度测量时的稀释倍数；

■ A₂₈₀ 和 A_{max} 分别是指在 280 nm 处的吸光度以及在吸收波长处的吸光度；

■ C_f 是校正因子，YF® SE 染料的 C_f 值请参考上面表格；

■ 1.4 则是指 IgG (mL/mg) 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) 以及蛋白液洗脱的总体积来进行预估。

3.2 DOL 的估算

DOL 通过下式计算: $DOL = (A_{max} \times Mwt \times \text{稀释因子}) / (\epsilon \times C)$

■ A_{max} , 稀释因子, C 值在 3.1 中已经明确;

■ Mwt 是指 IgG 的分子量 (~150,000);

■ ϵ 是 YF[®] SE 的摩尔吸光系数, 参考第一页表格;

■ 标记 YF[®] SE 的 IgG 抗体的 DOL 值, 请参考第一页表格, 有时 DOL 值会上下略有波动, 但也能得到很好的实验效果。

注意事项

1. 该产品标记的蛋白需要长期储存时, 推荐加入 5-10mg/mL BSA 和 0.01-0.03% NaN₃, 以防止蛋白变性和微生物滋生。放置于 4℃ 避光保存。若加入了终浓度为 50% 的甘油, 可放 -20℃ 保存。可稳定保存一年以上。
2. 操作过程注意避光, 搅拌速度应适当以避免产生气泡。
3. 层析柱装柱时, 尽量使柱体均匀, 柱面平整, 无气泡、裂隙。
4. 上样时注意, 当柱顶缓冲液与凝胶平面相切时再加样品, 洗脱时, 当样品走至与凝胶平面相切时再加洗脱液。
5. 影响标记效率的其他因素还包括: 温度、反应时间、pH、荧光染料与蛋白的量等, 需注意控制。
6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。