
(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

Elabscience®Cyanine 5.5 (CY5.5)标记试剂盒

Cyanine 5.5 Labeling Kit

产品货号: GCQ0189

产品规格: 1 Reaction/3 Reactions/10 Reactions

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话 400-999-2100
邮箱 Flow@elabscience.cn
网址 www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号（见试剂盒标签），以便我们更高效地为您服务。

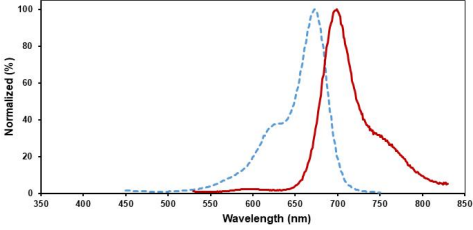
产品简介

Elabscience® Cyanine 5.5 (CY5.5)标记试剂盒提供了标记所需的全部试剂，能简单有效地对含有伯氨基（-NH₂）分子的蛋白标记。

产品特点

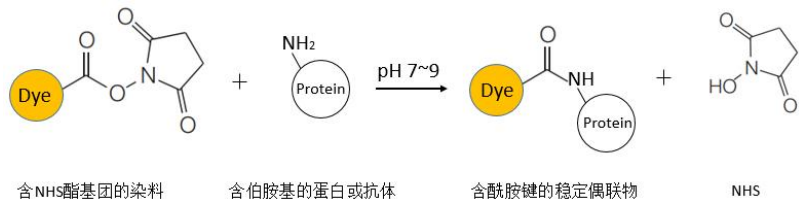
- ✓ **快速：**整个过程仅需 90 min。
- ✓ **方便：**染料已活化，可直接使用；Filtration tube 脱盐，无需透析。
- ✓ **使用灵活：**既可用于微量标记又可大量标记，每次可标记 0.1-1 mg 蛋白。
- ✓ **水溶性：**本试剂盒内 Cyanine 5.5 为水溶性，在含水缓冲液中，染料荧光特性能较好测量及保持。

基本信息

Excitation/Absorption maximum (nm)	675
Emission maximum (nm)	694
摩尔消光系数 ϵ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	195000
280 nm 校正系数 (CF280)	0.11
染料 光谱图	Cyanine 5.5 Excitation and Emission Spectra 

标记原理

在一定 pH 范围内，Cyanine 5.5 专一地与伯氨基反应（N-末端及赖氨酸残基侧链）形成稳定的酰胺键，从而实现与蛋白的偶联。

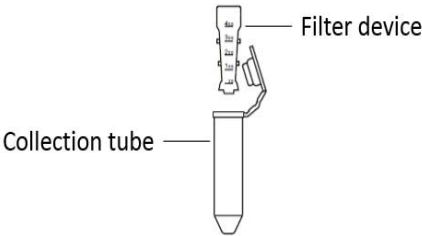


产品组分

产品编号	组分	1 Reaction	3 Reactions	10 Reactions	储存温度
E-LK-C04L	Cyanine 5.5 NHS ester	0.14 mg×1	0.14 mg×3	0.14 mg×10	-20°C, shading light
E-LK-010	Labeling Buffer I	10 mL	20 mL	20 mL×2	2~8°C
E-LK-006	DMF	500 μL	500 μL	500 μL	2~8°C, shading light
E-LK-007	1×PBS (pH 7.4)	10 mL	10 mL	10 mL×2	2~8°C
E-LK-008	1M Tris (pH 8.7)	500 μL	500 μL	500 μL×2	2~8°C
E-LK-001C	50 KD Filtration tube*	1 set**	3 set	10 set	RT

*Filtration tube 购自 Millipore，使用方法参考附录三。

**1 set 50 KD Filtration tube (0.5 mL)包括 1 个滤芯（filter device）和 2 个收集管(collection tube)。



保存条件

未拆封的试剂盒可在 2~8°C 保存一年，溶解后的 Cyanine 5.5 可在 -20°C 或 -80°C 保存一周。

试验所需自备物品

1. 高精度移液器及一次性吸头：0.5-10 μL 、2-20 μL 、20-200 μL 、200-1000 μL
2. 紫外分光光度计、NanoDrop、多功能酶标仪（选其一即可）
3. 37°C 恒温箱
4. 离心机（离心力可到 12000 $\times g$ ）

Cyanine 5.5 标记蛋白使用量的计算：

每个反应中染料的使用量取决于待标记蛋白的质量、浓度和分子量。此试剂盒针对 100 KD 以上大小的蛋白，Cyanine 5.5 和蛋白推荐的最佳分子比为 18 : 1。

示例：标记 1 mg 的蛋白(浓度约 2 mg/mL)，使用 Cyanine 5.5 和蛋白(150 KD) 的分子比为 18 : 1 时，Cyanine 5.5 的摩尔浓度为 12.56 mM，应加入 Cyanine 5.5 量的计算方法：

1. 计算需要的 Cyanine 5.5 的物质的量 n ：

$$n_{\text{Cyanine 5.5}} = n_{\text{蛋白}} \times 18 = \frac{1 \text{ mg}}{150000 \text{ mg/mmol}} \times 18 = 0.00012 \text{ mmol}$$

2. 计算需要的 Cyanine 5.5 的体积 V ：

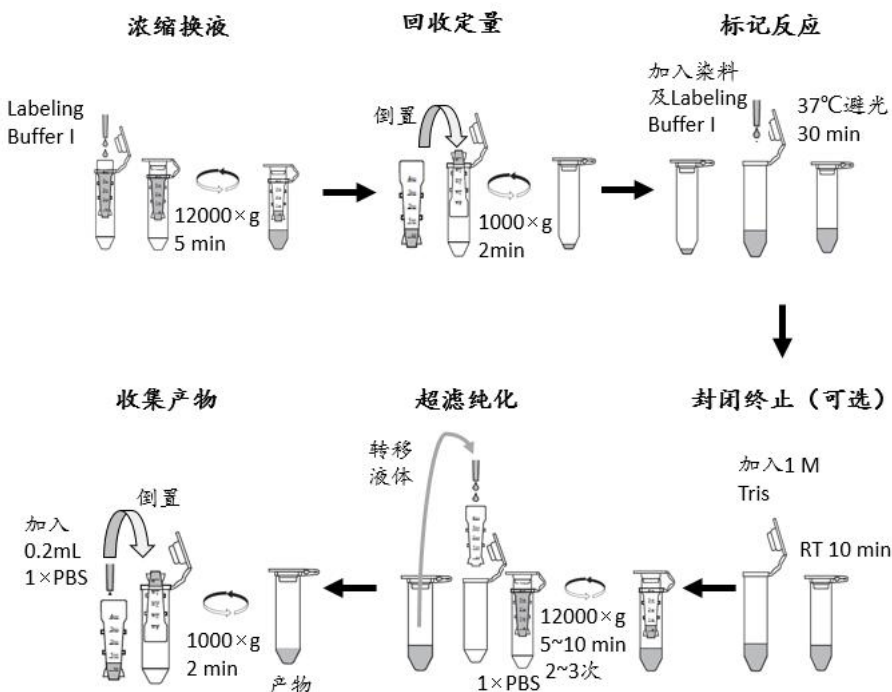
$$V_{\text{Cyanine 5.5}} = \frac{n_{\text{Cyanine 5.5}}}{C_{\text{Cyanine 5.5}}} = \frac{0.00012 \text{ mmol}}{12.56 \text{ mM}} = 9.6 \mu\text{L}$$

操作过程

■ 实验前准备

1. 仔细阅读使用说明书。
2. 试剂耗材准备：提前 20 min 从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温（注：不需要用到的试剂组继续放置在冰箱中）。
3. 超滤管浸润：向干燥的超滤管滤芯中加入 500 μL Labeling Buffer I，室温放置 10 min 备用，在加入待标记物之前弃去 Labeling Buffer I 即可（整个标记过程中超滤管滤芯都应该保持湿润）。
4. 溶解 Cyanine 5.5：用 10 μL DMF 溶解 0.14 mg Cyanine 5.5 NHS ester，静置 10 min，待其充分溶解，此时 Cyanine 5.5 的浓度为 12.56 mM，盖好管子备用。

■ 标记流程



■ 标记步骤（本操作步骤按照 1 mg 蛋白的量进行标记）

1. 浓缩换液：将 Filter device 正置于配套 Collection tube 里，取 1 mg 待标记蛋白加入 Filter device 中，并用 Labeling Buffer I 补充总体积到 0.5 mL，盖好 Filter tube，以 $12000\times g$ 的转速离心 5 min，弃去 Collection tube 中的液体。

注：

- a) Filter device 的最大容积为 0.5 mL。
 - b) 如果 1 mg 蛋白体积大于 0.5 mL，请分多次加入，离心超滤浓缩。
 - c) 如果待标记物中含有游离的氨基（Tris，氨基酸或者其他干扰物，需要用 Labeling Buffer I 反复超滤确保其去除干净）。
2. 回收定量：将 Filter device 倒置于配套 Collection tube 里， $1000\times g$ 离心 2 min，回收浓缩换液后的蛋白，取出 Filter device，向 Collection tube 中加入适量 Labeling Buffer I 至蛋白浓度约为 2 mg/mL，同时，在 Filter device 中加入 0.5 mL Labeling Buffer I，置于管架上备用。
 3. 标记反应：立即向蛋白溶液中加入 9.6 μL 的 12.56 mM Cyanine 5.5，轻轻吹打混匀，盖上盖子密封，放入 37°C 恒温箱中避光温育 30 min。
 4. （可选）封闭终止：按比例每 100 μg 蛋白加入 10 μL 的 1 M Tris(pH 8.7)，混匀后室温放置 10 min。
 5. 超滤纯化：加入适量的 1 $\times$ PBS 至上述反应液中，使终体积为 0.5 mL，轻轻吹打混匀，将反应溶液转移至甩干的 Filter device（若上述反应液已超过 0.5 mL，可超滤后分多次转移至甩干的 Filter device 中），并与 Collection tube 配套后盖好 Filtration tube， $12000\times g$ 的转速离心 5 min~10 min。后弃去 Collection tube 中液体，向 Filter device 中补足 1 $\times$ PBS 至 500 μL ，重复离心超滤操作 2~3 次，直至收集管中的超滤液颜色近乎无色透明。
 6. 收集产物：加 0.2 mL 1 $\times$ PBS 至 Filter device 中，轻轻吹打。将 Filter device 倒置于另一个 Collection tube 中， $1000\times g$ 离心 2 min。收集 Collection tube 中的溶液，即为 Cyanine 5.5 标记的蛋白。

■ （可选）确定标记程度

1. 使用吸收光扫描设备设置扫描范围为 230 nm~800 nm。
2. 使用 1 $\times$ PBS 设置空白对照。

3. 取 2 μL Cyanine 5.5 标记后的样本, 扫描其吸收光谱(230 nm~800 nm), 记录 A280 及 A675 数据 (1 cm 光程)。

注: 本例中需要扫描 230 nm~800 nm 范围的吸收光, 而非单纯测量 A280 及 A675 数据, 通过观察吸收光谱曲线可排除一些非正常数值, 如样品中含有气泡导致的测值错误。

4. 结合 Cyanine 5.5 染料的摩尔消光系数, A280 矫正值, 蛋白的摩尔消光系数及蛋白分子量等信息计算 DOS 及蛋白浓度。计算公式如下:

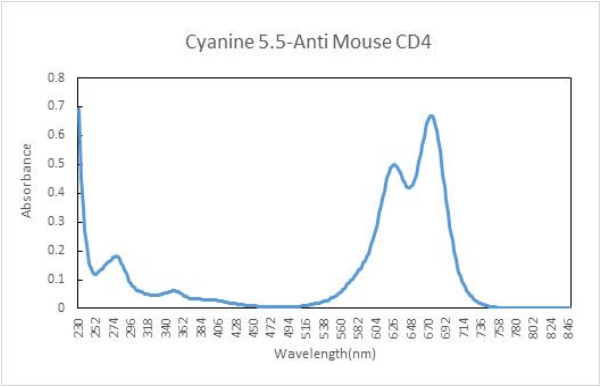
$$\text{DOS} = (A_{675} \times \epsilon_{\text{IgG}}) / (\epsilon_{\text{Cyanine 5.5}} \times (A_{280} - \text{CF}_{280} \times A_{675}))$$
$$\text{蛋白浓度}(\text{mg/mL}) = (A_{280} - \text{CF}_{280} \times A_{675}) \times 150000 / \epsilon_{\text{IgG}}$$

参数	含义	数值
DOS	每个蛋白标记的荧光素的平均个数	
A ₆₇₅	Cyanine 5.5 染料在 675 nm 波长处 1 cm 光程的吸光值	见测值
ϵ_{IgG}	IgG 的摩尔消光系数 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	210000
$\epsilon_{\text{Cyanine 5.5}}$	Cyanine 5.5 的摩尔消光系数 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	195000
A ₂₈₀	Cyanine 5.5 标记的蛋白在 280 nm 波长处 1 cm 光程的吸光值	见测值
CF ₂₈₀	Cyanine 5.5 染料在 280 nm 波长处的吸光值的校正系数	0.11

■ 蛋白保存及使用

向标记后的蛋白中加入 0.05~0.2% Proclin 300 或 0.05%叠氮化钠, 及蛋白稳定剂 (如 0.1% BSA), 于 2~8°C 避光保存, 可稳定保存半年。或加入等体积甘油于-20°C 存储, 可稳定保存半年。

结果展示



注意事项

- 1. 请根据待标记蛋白的分子量选择合适的试剂盒，本试剂盒提供 50 KD 的 Filtration tube。
- 2. Cyanine 5.5 易受潮水解失效，应与干燥剂一同置于-20℃ 或-80℃ 保存。为防止水蒸气冷凝到染料中，实验前将其移至室温平衡。
- 3. 本试剂盒也可标记其它含有游离氨基的蛋白，具体标记比例根据待标记物中可用氨基的数量确定或者设置不同摩尔比例进行标记。
- 4. 本试剂盒标记推荐的染料和蛋白（150KD）的最佳分子比为 18:1，可确保染料能标记上蛋白，且 DOS 在正常范围，但无法确保实验结果最佳，最佳标记比例可能根据蛋白的差异而不同，用户可根据实际情况优化

相关产品

货号	产品名称
GCQ0226	BSA Removal Kit

常见问题及解决方案

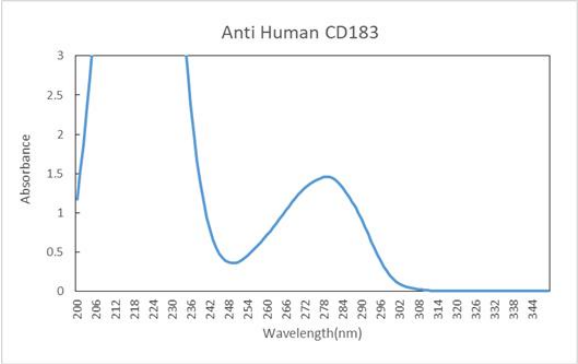
现象	可能原因	建议
DOS 测值较低	初始蛋白浓度不准确。	按照标准操作流程进行蛋白的定量，参照仪器设备厂家的使用说明进行定量，或者使用其他蛋白的定量方式如 BCA 方法进行参照。
	初始蛋白中含大量干扰标记的组分，如甘氨酸、咪唑、Tris、叠氮化钠、硫柳汞、Proclin 等。	使用透析，脱盐或多次超滤方式充分除去干扰标记的成分，特殊情况下，可能需要对样品中含有的干扰成分进行定量。
	初始蛋白中含载体蛋白如 BSA、明胶。	使用亲和纯化或者其他色谱方法除去干扰成分，或者配合使用 BSA 去除试剂盒产品，后准确定量蛋白浓度再进行标记。
	测值计算不准确。	按照标准操作方式进行测值定量。
	标记时，反应体系中的 DMF 多量，干扰标记反应。	尽量减少溶解染料的 DMF。
蛋白上完全没有标记上染料	不恰当的操作，如染料和蛋白未完全混匀，蛋白中的含有过量的铵离子或者氨基成分，或者其他误操作。	设置阳性对照。
	染料保存不当。	未标记之前，染料中不可混入水分，取染料时，平衡至室温约 5~10 min 后再开封。
	超滤管使用不当。	超滤完后，滤芯中液体较少，不要使用移液器直接吸取超滤管芯中的样品，应倒置后离心出样品。
	因离心机的差异，超滤时转速过高。	离心机转速为 12000×g，非 12000rpm。
	超滤管漏液。	超滤管芯不要装过多液体导致溢漏。
DOS 测值过大(如大于 10)	实际的原始蛋白浓度较低，如蛋白沉淀，浓度不均一，导致染料过量修饰。	样本混匀后测量，按照仪器设备的标准操作步骤准确定量。
	蛋白的赖氨酸残基过量。	减少染料的加入量或者设置不同摩尔比例进行标记。

	不恰当的光谱测量。	参考仪器检测灵敏度，一般需要保证标记完成后蛋白理论浓度0.5 mg/mL 以上时测量；测量吸收光谱范围的数据，而非最大吸收光值，根据吸收光谱曲线图特别是基线的水平判断测值准确性。
较低的蛋白回收率	标记过程中蛋白发生聚集沉淀。	添加 1M Tris 及时终止反应。
	超滤浓缩时蛋白浓度过大。	一支超滤管芯不要装入过多的蛋白，如 1 mg 以上的蛋白。
	蛋白在标记缓冲液中溶解度不高。	换用其他标记试剂盒。

声明

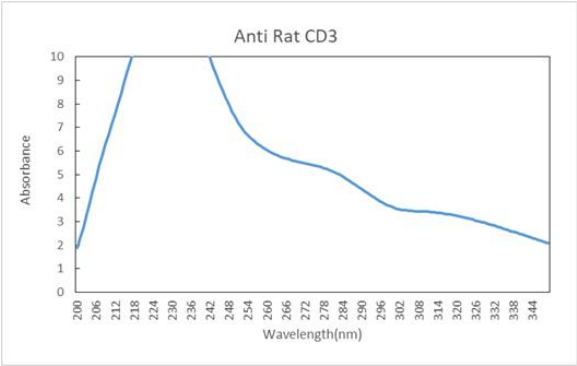
1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 尽管本标记试剂盒验证标记过许多不同的蛋白，但仍有可能在染料标记蛋白过程中，蛋白结合亲和力受到损害甚至失去，虽然这种现象很罕见，发生这种现象的原因很可能是该蛋白在抗原结合位点直接具有一个或多个关键赖氨酸氨基酸残基，在标记过程中其结合功能受到损害。此外，一些蛋白具有关键的赖氨酸残基(不一定在结合位点)，对维持蛋白的稳定性/溶解度是绝对关键的，一旦修饰，由于沉淀导致蛋白完全不可用。对此罕见情况，本标记试剂盒不附带完全责任。我们认为我们的客户应该意识到，使用本试剂盒中的染料在某些情况下可能会损害被修饰蛋白的生物学功能。
4. 虽然本试剂盒也可用于标记蛋白，但应认识到不同蛋白的多种性状的变化，如蛋白在不同缓冲液中的溶解度，pH 稳定性，温度稳定性，蛋白纯度，标记位点的可及性等等都和蛋白有较大区别，因此本标记试剂盒不对标记除 IgG、IgM 蛋白之外的蛋白做质量保证。

附录一 正常蛋白浓度的吸光度曲线图（示例，仅供参考）



说明：1 mg/mL Mouse anti human CD183，蛋白类型为 Mouse IgG1，PBS (pH 7.2，不含防腐剂的)，使用 Nano-100 分光光度计测量，可见其浓度曲线图是正常，且 $A_{280} = 1.454$ ，符合标示浓度大小。

附录二 非正常蛋白浓度的吸光度曲线图（示例，仅供参考）



说明：0.5 mg/mL Mouse anti rat CD3，蛋白类型为 Mouse IgG3，含蛋白质稳定剂和叠氮钠 ($\leq 0.09\%$) 的缓冲溶液，使用 Nano-100 分光光度计测量，可见其浓度曲线图是非正常的，且 $A_{280} = 5.195$ ，不符合标示浓度大小。

附录三 蛋白保留与浓缩回收（参考 Millipore 产品说明书）

（摘自 Millipore 用户指南：

https://www.merckmillipore.com/CN/zh/product/Amicon-Ultra-0.5mL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM_NF-C82301#documentation）

对于大多数应用，分子量是评估保留特性的一个方便参数。Merck Millipore Ltd. (Millipore) 推荐使用 NMWL 至少比要浓缩的蛋白溶质的分子量小两倍的膜。请参考下表。

Marker/Concentration	Molecular Weight	Device NMWL	% Retention	Spin Time (min)
α -Chymotrypsinogen (1 mg/mL)	25,000	3K	>95	30
Cytochrome C (0.25 mg/mL)	12,400		>95	30
Vitamin B-12 (0.2 mg/mL)	1,350		>42	30
α -Chymotrypsinogen (1 mg/mL)	25,000	10K	>95	15
Cytochrome C (0.25 mg/mL)	12,400		>95	15
Vitamin B-12 (0.2 mg/mL)	1,350		>23	15
BSA (1 mg/mL)	67,000	30K	>95	10
Ovalbumin (1 mg/mL)	45,000		>95	10
Cytochrome C (0.25 mg/mL)	12,400		<35	10
BSA (1 mg/mL)	67,000	50K	>95	10
Ovalbumin (1 mg/mL)	45,000		~40	10
Cytochrome C (0.25 mg/mL)	12,400		<20	10
Thyroglobulin (0.5 mg/mL)	677,000	100K	>95	10
IgG (1 mg/mL)	156,000		>95	10
Ovalbumin (1 mg/mL)	45,000		<30	10

旋转条件：40° 固定角度转子，14000×g，室温，500 μL 起始体积，n = 12。