

## pH 荧光探针 (绿 500-PEG12 马来酰亚胺)

产品编号	产品名称	包装规格
NBS0205	pH 荧光探针 (绿 500-PEG12 马来酰亚胺)	1mg

### 产品简介:

pH Green 500-PEG12 马来酰亚胺是一种硫醇反应型 pH 敏感荧光标记物, 专为开发可响应 pH 变化的生物偶联探针而设计, 用于实时研究活细胞中的抗体内化、内吞作用及吞噬作用等生物学过程。该染料通过引入十二聚乙二醇 (PEG12) 分子间隔臂, 显著提高了水溶性, 在确保生物功能完整性的同时有效避免了生物偶联物的聚集问题。

该染料的荧光特性呈现独特的 pH 依赖性: 当环境 pH 从碱性向酸性转变时, 其荧光强度随之增强, 这一变化与细胞内囊泡的酸化进程高度吻合。由于其在常规细胞外环境中基本不产生荧光信号, 这一特性使得实验过程中可大幅减少洗涤步骤。该探针特别适用于吞噬体、内体和溶酶体等酸性细胞区室的监测, 在这些酸性微环境中会表现出显著的荧光增强效应, 从而实现酸性位点的精准检测。

这种特性使得该染料在成像分析、流式细胞术和高内涵筛选 (HCS) 等应用中, 能够以更低的信号变异度和更高的检测准确性实现对细胞酸性区室的特异性检测。其马来酰亚胺官能团可选择性地与蛋白质或肽段中的还原型半胱氨酸巯基、硫代磷酸化寡核苷酸以及小分子配体进行共价偶联。所制备的生物偶联物不仅为吞噬作用和内吞作用等细胞过程的靶向检测分析提供关键工具, 更能支持细胞功能的综合多重分析, 为深入探究细胞动态学过程提供强有力的研究手段。

### 产品特性:

- 1) 分子量: 1164.32
- 2) 溶解度: 在 DMSO 中溶解
- 3) Ex(nm): 453
- 4) Em(nm): 522

### 保存条件:

-20°C避光保存, 2 年有效。

## 产品使用：(仅供参考)

### 一、储备溶液配制

所有未使用的储备溶液应分成一次性等份，并在制备后储存在-20°C。避免反复冻融循环。

#### 1. 蛋白质储备液 (溶液 A)

将 100  $\mu$ L 反应缓冲液(例如, pH ~9.0 的 1 M 碳酸钠溶液或 1 M 磷酸盐缓冲液)与 900  $\mu$ L 目标蛋白溶液 (例如, 抗体、蛋白浓度 > 2 mg/mL (如果可能)) 混合, 得到 1 mL 蛋白质标记储备溶液。

#### 注意:

- 蛋白质溶液 (溶液 A) 的 pH 应为  $8.5 \pm 0.5$ 。如果蛋白质溶液的 pH 值低于 8.0, 请使用 1 M 碳酸氢钠溶液或 1 M pH 9.0 磷酸盐缓冲液将 pH 值调节至 8.0-9.0 范围。
- 蛋白质应溶解在 1X 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (pH 7.2-7.4) 中。如果蛋白质溶解在 Tris 或甘氨酸缓冲液中, 则必须用 1X PBS (pH 7.2-7.4) 进行透析, 去除用于蛋白质沉淀的游离胺或铵盐 (例如硫酸铵和醋酸铵)。
- 不纯的抗体或用牛血清白蛋白 (BSA) 或明胶稳定的抗体标记效果不好。叠氮化钠或硫柳汞的存在也可能干扰缀合反应。叠氮化钠或硫柳汞可通过透析或旋转柱去除, 以获得最佳标记结果。
- 如果蛋白质浓度低于 2 mg/mL, 结合效率会降低。为了获得最佳标记效率, 建议最终蛋白质浓度范围为 2-10 mg/mL。

### 二、可选：二硫化物还原

如果您的蛋白质不含游离半胱氨酸, 则必须用 DTT 或 TCEP 处理蛋白质以生成硫醇基团。DTT 或 TCEP 将二硫键转化为两个游离硫醇基团。如果您使用 DTT, 则必须在将 pH Green 500-PEG12 马来酰亚胺与蛋白质缀合之前通过透析或凝胶过滤去除游离 DTT。

### 三、以下是生成游离硫醇基团的示例方案:

- 在蒸馏水中制备 1 M DTT (15.4 mg/100  $\mu$ L) 的新鲜溶液。
- 要在 20 mM DTT 中制备 IgG 溶液, 请每 1 mL IgG 溶液添加 20  $\mu$ L DTT 溶液, 同时充分混合。让溶液在室温下静置 30 分钟, 无需额外混合, 以减少半胱氨酸氧化为胱氨酸。
- 将还原后的 IgG 通过已用“交换缓冲液”预平衡的过滤柱。从柱中收集 0.25 mL 级分。
- 确定蛋白质浓度并将大部分 IgG 的级分合并。这可以通过分光光度法或比色法来完成。

5. 建议在此步骤后立即进行缀合。更多详情请参阅实验方案示例。

**注意：**

- a) 为了获得最佳结果，IgG 溶液应  $>4$  mg/mL。如果蛋白质低于 2 mg/mL，则应浓缩。应额外包括 10% 的缓冲液交换柱损失。
- b) 还原反应几乎可以在 pH 7-7.5 的任何缓冲液中进行（例如 MES、磷酸盐或 TRIS 缓冲液）。
- c) 步骤 3 和 4 可以用透析代替。

#### 四、pH Green 500-PEG12 马来酰亚胺储备溶液（溶液 B）

将无水 DMSO 添加到 pH Green 500-PEG12 马来酰亚胺小瓶中，制成 10 mM 储备溶液。通过移液或涡旋充分混合。

注意：在开始缀合之前准备染料储备溶液（溶液 B）。及时使用。延长储存染料原液可能会降低染料活性。溶液 B 在避光、防潮的情况下可在冰箱中保存两周。避免冻融循环。

#### 操作步骤

该方案是为将 pH Green 500-PEG12 马来酰亚胺与山羊抗小鼠 IgG 缀合而开发的。您的特定蛋白质可能需要进行额外的优化。

注意：每种蛋白质都需要不同的染料/蛋白质比例，这也取决于染料的特性。蛋白质的过度标记可能会对其结合亲和力产生不利影响，而低染料/蛋白质比率的蛋白质缀合物会降低灵敏度。

#### 1. 运行缀合反应

- a) 1.1 使用摩尔比为 10:1 的溶液 B（染料）/溶液 A（蛋白质）作为起点：将 5  $\mu$ L 染料储备溶液（溶液 B，假设染料储备溶液为 10 mM）添加到小瓶中有效摇动的蛋白质溶液（95  $\mu$ L 溶液 A）。假设蛋白质浓度为 10 mg/mL，蛋白质的分子量为  $\sim 200$  KD，则蛋白质浓度为  $\sim 0.05$  mM。

注意：我们建议使用溶液 B（染料）/溶液 A（蛋白质）摩尔比为 10:1 的溶液。如果太低或太高，则分别确定最佳染料/蛋白质比例为 5:1、15:1 和 20:1。

- b) 1.2 继续在室温下旋转或摇动反应混合物 30-60 分钟。

#### 2. 纯化

以下方案是使用 Sephadex G-25 柱纯化染料-蛋白质缀合物的示例。

- a) 根据说明准备 Sephadex G-25 柱。
- b) 将反应混合物（来自“进行缀合反应”）加载到 Sephadex G-25 柱的顶部。

- c) 当样品刚好流到顶部树脂表面下方时，立即添加 PBS (pH 7.2-7.4)。
- d) 向所需样品中添加更多 PBS (pH 7.2-7.4) 以完成柱纯化。合并含有所需染料-蛋白质缀合物 (注：柱式纯化后的样品，会根据成分不同分出多个，请检查出哪些包含了我们需要的荧光素标记蛋白产物，将所有包含该目标产物的分数给取出来集中在一起。)

注意：为了立即使用，染料-蛋白质缀合物需要用染色缓冲液稀释，并等分多次使用。

注意：为了长期保存，染料-蛋白质缀合物溶液需要浓缩或冷冻干燥。

### 3. 表征所需的染料-蛋白质缀合物

取代度 (DOS) 是表征染料标记蛋白质的最重要因素。较低 DOS 的蛋白质通常具有较弱的荧光强度，但较高 DOS (例如  $DOS > 6$ ) 的蛋白质也往往具有减弱的荧光。大多数抗体的最佳 DOS 建议在 2 到 10 之间，具体取决于染料和蛋白质的特性。为了有效标记，应控制取代度，使 1 摩尔抗体具有 6-8 摩尔 pH Green 500-PEG12 马来酰亚胺。以下步骤用于确定 pH Green 500-PEG12 马来酰亚胺标记蛋白质的 DOS。

### 4. 测量吸收率

- a) 要测量染料-蛋白质缀合物的吸收光谱，建议根据染料的消光系数将样品浓度保持在 1-10  $\mu\text{M}$  范围内。
- b) 在 280 nm 处读取 OD (吸光度) 和染料最大吸光度 (对于 pH Green 500-PEG12 马来酰亚胺染料， $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$ )
- c) 对于大多数分光光度计，样品 (来自柱馏分) 需要用去离子水稀释，以使 OD 值在 0.1 至 0.9 范围内。外径 (吸光度) 280 nm 是蛋白质的最大吸收，而 522 nm 是 pH Green 500-PEG12 马来酰亚胺的最大吸收。为了获得准确的 DOS，请确保缀合物不含非缀合染料。

### 注意事项：

1. 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其它用途！