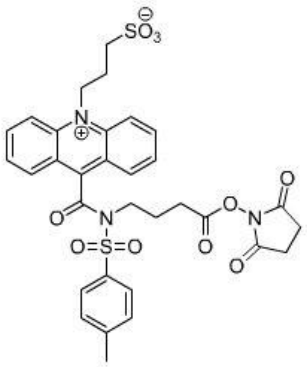
吖啶酯（NSP-SA-NHS）

产品编号： **MT0013**

产品简介：



中文名称：	吖啶酯
Name:	NSP-SA-NHS
CAS:	199293-83-9
MF:	$C_{32}H_{31}N_3O_{10}S_2$
MW:	681.73
Purity:	≥ 97%, BR

吖啶酯（NSP-SA-NHS）Cas199293-83-9 及其相关化合物已被证明是非常有优势的化学发光标记物，其稳定性、活性和敏感性超过了某些放射性同位素。吖啶酯能与含有一级氨基的蛋白发生反应。在碱性条件下，NHS 作为离去基团被取代，蛋白质与吖啶酯形成稳定的酰胺键。反应完成后，多余的吖啶盐通过脱盐柱除去。

在存在碱性过氧化氢时，吖啶标记的蛋白不需要酶催化可自行发光。具体发光原理是在碱性过氧化氢溶液中，吖啶酯受到过氧化氢离子的进攻，生成一个有张力的不稳定的二氧乙烷，进一步分解成 CO_2 和电子激发态的吖啶酮，当吖啶酮回到基态时发出最大吸收波长 430nm 的光子。这个发光过程是十分短暂（整个过程的发生小于 2 秒），触发方案必须增加内部光度计和光子探测器；另外，本产品也可以使用配备自动进样器的多功能酶标仪进行发光数据采集。蛋白质，多肽，抗体，核酸都可以用本产品进行标记。吖啶酯在碱性过氧化氢的激发下快速发光，因此通过收集光子可以检测到标记化合物。

本产品主要用于：化学发光及免疫分析、受体分析、核酸及多肽检测等研究。

储存条件： -20℃，充氮气，避光

运输条件： 2-8℃，避光

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品用途。

使用说明（举例抗体/蛋白质标记）：

1.配制 标记缓冲液：0.2M $NaHCO_3$ (pH=9.0)；
标记终止缓冲液： 10% 赖氨酸 0.2M $NaHCO_3$ (pH=9.0)溶液；
脱盐纯化缓冲液：0.1M Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 (pH=6.5)；
吖啶酯发光液：(0.01~0.1M) NaOH+0.05% H_2O_2 。

2. 计算标记所用抗体（蛋白质）和吖啶酯的量：

通常设定摩尔比 n(抗体): n(吖啶酯)=1:10~1:50，具体需根据氨基酸组分进行摸索调整；
配制 2.5mg/ml 吖啶酯-DMSO 母液，注意玻璃器皿盛放并避光；
使用 0.2M $NaHCO_3$（pH=9.0） 溶液配制 0.1~0.5 mg/ml 抗体反应液 。

3. 连接及纯化

本说明书举例针对标记抗体抗体的分子量为 180kd 对应 15 倍的吖啶酯。如果用户的待标记样品是其他的分子量，请参考附表 1 改变试剂的配比。

1．取 10 μL 稀释吖啶酯母液 (2.5mg/ml)，加入 90 μL 无水 DMSO(or DMF) 稀释 10 倍，配成吖啶酯工作液 (0.25mg/ml)。

2．使用 0.2M $NaHCO_3$ (pH=9.0)溶液稀释 50μg 的抗体至 300 μL，加入 10 μL 吖啶酯工作液 (0.25mg/ml)（参考附表 1）。

3．锡箔纸包好，室温标记 0.5~1h。
4．淬灭反应，加入 100 μL 标记终止缓冲液，室温混匀 30 分钟（注：如果标记较充分，也可以跳过此步骤，直接进行柱纯化）。

5. 脱盐柱纯化，收集吖啶标记蛋白组分并检测浓度，请参考说明书后文。
6．检测标记的蛋白，取 10μL 吖啶标记蛋白，放于黑色 96 孔板中，向每个微孔注入 50 μL~150μL 吖啶酯发光液，立即检测，如果发光过强，可以对标记蛋白再进行若干倍的稀释，使其在仪器的发光检测限内。注：吖啶酯发光液最好现用现配，或者将 NaOH 溶液和过氧化氢溶液分别配成 2x 母液，使用的时候再 1：1 进行混合。

7．吖啶酯标记的蛋白可以在酸性缓冲液中 4℃避光存储（注意补加叠氮钠等防腐剂），如果储存效果不佳，则请避光保存于-20℃或者-80℃。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品用途。

注意事项：

1. 吖啶酯除了 DMF，也可以用无水 DMSO 等非质子性溶剂来溶解。通常吖啶酯用 DMF 最高溶解的浓度为 4mM (约 2.7mg/ml)，我司生产的吖啶酯中 DMSO 中溶解度可达 10mg/ml。
2. 标记前，由于吖啶酯末端羧基经 NHS 活化,较为活泼，请用非质子性的干燥无水溶剂来溶解；标记后，标记后吖啶酯与被标记物之间以酰胺键或者酯键等形式存在，酸性溶剂基本没有影响；吖啶酯本身活性位点在碱性和氧化环境下不稳定，因此应根据被标记物的稳定性配制相应的非强碱性非氧化的体系中处理和保存。
3. 发光标记物在光照条件下有可能部分分解，以致影响发光效果。吖啶酯的实验操作和储存建议避光条件下处理，目前暂时没有具体的研究数据。
4. 吖啶酯标记蛋白等大分子化合物建议用 G25 脱盐柱分离；吖啶酯标记小分子化合物建议用柱层析分离;
5. 吖啶酯发光过程是十分短暂（整个过程的发生小于 2 秒），触发方案必须增加内部光度计和光子探测器；另外，本产品也可以使用配备自动进样器的多功能酶标仪进行发光数据采集，最大限度降低加样时间对采集信号的影响。
6. 吖啶酯标记化学发光检测仪器推荐：
美国 PE 公司的 Wallac 1420 多功能检测仪,
德国西门子拜耳化学发光仪 ADVIA Centaur

附表 1： 吖啶用量对照表

蛋白分子量	吖啶酯工作液
10kDa-50kDa	1-3 μL
50kDa-100kDa	3-7 μL
100kDa-150kDa	7-10 μL
150kDa-200kDa	10-13 μL
200kDa-250kDa	13-17 μL
250kDa-300kDa	17-20 μL
300kDa-350kDa	20-23 μL
350kDa-400kDa	23-27 μL

吖啶酯标记蛋白效率计算方法

1. 取 100uL 待测样品，稀释至 Abs280 在 0.1~1.5 之间；

2. 向 1 中加入少量盐酸，调整至 pH=1~2，使其形成具有黄色特征的盐溶液，吸收峰在 367nm

3. 分别测试待测样品的 Abs280nm 和 Abs367nm ；

4. **Equation1:** 吖啶酯浓度(mol/L)=Abs_{367}/14650 ；

5. 校正蛋白 Abs280 数值

Equation2: Abs280(校正后) = Abs_{280}- (Abs_{367}×0.17);

6. 准备 1mg/ml 未标记的蛋白溶液（e.g. 50ug 蛋白加入 50μL 标记缓冲液），取出 10μL 并补加 490ul ddH_2O (稀释 50 倍)。读取 Abs280nm ，并乘以稀释倍数。

7. 计算蛋白质量浓度（mg/ml）$= \frac{\text{Abs280 校正后数值 (Equation2)}}{\text{Abs280(from 步骤 6)} * 50}$

Equation3:蛋白摩尔浓度 （mol/L）$= \frac{\text{蛋白浓度（mg/ml）}}{\text{Mw(蛋白分子量)}}$

8. 计算 F/P 摩尔比 $= \frac{\text{吖啶酯浓度（mol/L）(Equation1)}}{\text{蛋白浓度（mol/L）(Equation3)}}$

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品用途。