PO 488/495/594/647N SE (ATTO)

兼具高亮度、优异抗光漂白性与伯胺反应特异性，无需额外活化即可实现高效标记

产品货号：B40710、B40708、B40707、B40709

产品规格：1 mg

储运条件：-20 ℃避光保存，冰袋运输

产品简介：

PO SE系列荧光染料可作为**ATTO系列染料的可靠替代**方案。该系列为基于罗丹明、恶嗪母核衍生的NHS酯类活性荧光标记试剂，专为含氨基生物分子：蛋白质、多肽、氨基修饰寡核苷酸等标记研发；本系列染料光学性能优异，**具有高摩尔消光系数与高荧光量子产率**；**光化学稳定性佳，耐光漂白**，支持长时程成像与超高分辨观测；**发射峰形对称、光谱分离度好**，适合多色检测；结构紧凑、生物相容性优异，标记后对靶标分子生物功能干扰小。染料通过SE活性酯与靶标氨基共价反应，形成稳定酰胺键，实现特异性荧光标记，可广泛应用于流式细胞术（FACS）、荧光原位杂交（FISH）、共聚焦成像、单分子检测及超高分辨率显微等生命科学研究场景。

传统荧光染料普遍存在光稳定性偏弱、易发生荧光淬灭、量子产率不高、发射光谱重叠度大、pH耐受范围窄等固有技术短板，已难以适配当下科研中对高灵敏度检测、长时程成像、多色并行分析的不断提升的应用需求，特别是在超高分辨率成像、复杂生物体系多参数同步解析等前沿研究场景下，其应用局限性表现得更为突出。本系列荧光标记试剂可为生命科学各细分研究领域提供高性能、标准化的荧光标记整体解决方案，有效突破了传统荧光染料的技术瓶颈，可显著提升实验操作效率与检测结果的可重复性，助力科研工作者深入探究复杂生命活动的调控机制，为肿瘤、神经退行性疾病等重大疾病的基础机制研究、靶向新药开发及临床前诊断技术迭代提供可靠的技术支撑。

注：PO SE效能等同于Leica ATTO NHS。

应用范围：用于抗体、蛋白质、核酸的荧光标记，适配免疫检测、蛋白功能研究、分子杂交、细胞成像及生物医学研究。

产品特点：

- **光化学稳定性卓越：**相较于传统荧光染料，不易发生光漂白，适合单分子检测、长时间成像及高通量筛选实验。
- **光谱特性适配性强：**能有效规避化合物自发荧光干扰；可灵活搭配多色标记实验。
- **反应活性与稳定性佳：**SE 酯活性基团反应特异性强，能与氨基高效结合形成稳定酰胺键。
- **适用场景广泛：**不仅可用于荧光原位杂交、高通量筛选等，用于抗体、蛋白质、核酸的荧光标记，适配免疫检测、蛋白功能研究。

产品参数：

产品货号	产品名称	规格	Ex/Em	分子量	溶解性	Correction Factor CF_{280}	Extinction coefficient(ε)
B40710	PO 488 SE (ATTO)	1 mg	500/520 nm	801.88	Soluble in water, methanol, ethanol, DMF, DMSO	0.09	90000
B40708	PO 495 SE (ATTO)	1 mg	498/526 nm	536.22	Poor soluble in DMSO, DMF.	0.37	80000
B40707	PO 594 SE (ATTO)	1 mg	603/626 nm	1003.41	Poor soluble in DMSO, DMF.	0.5	120000

B40709	PO 647N SE (ATTO)	1 mg	646/666 nm	778.39	Well soluble in DMSO, DMF, water, practically insoluble in non-polar organic solvents.	/	15000

注意事项：

- 标记的蛋白如需长期储存，推荐加入5~10 mg/mL BSA和0.01~0.03% NaN_3，以防止蛋白变性和微生物滋生。
- 操作过程注意避光，搅拌速度应适当以避免产生气泡。
- 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。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明：（以标记 IgG 抗体为例）

一、 实验前准备

1. 试剂准备

（1）蛋白标记（如 IgG）：待标记溶液中严禁含有氨基酸、Tris 等含伯胺成分。若含有此类化学物质，应用 pH≈7.4 的 PBS 缓冲液预先透析处理。

注：低浓度叠氮钠（≤3 mM 或 0.02%）或硫柳汞（≤0.02 mM 或 0.01%）不会对蛋白标记产生显著干扰；但 20%~50%的甘油会降低标记效率。

（2）无水 DMSO/DMF

（3）$NaHCO_3$

（4）PBS 缓冲液(pH≈7.4)

（5）NaN_3, BSA（用于标记后蛋白稳定保存）

二、 操作步骤

1. 抗体预处理

（1）用 0.1 M 的 $NaHCO_3$ 溶液(pH≈8.3)稀释抗体，使抗体终浓度为 2.5 mg/mL。若抗体原液为无胺基杂质的 PBS 体系，可直接加入约 1/10 体积 1 M 的 $NaHCO_3$ 母液，使 $NaHCO_3$ 终浓度为 0.1 M。

注：

a. 蛋白浓度为 2.5 mg/mL 时，标记效率大概为 35%，低于 2.5 mg/mL 时标记效率会降低；高于 5 mg/mL 时，可提升标记效果。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操条件决定。如果蛋白浓度过低，可以通过超滤法进行浓缩。

b. 本产品最优标记条件为弱碱性环境，推荐使用 0.1 M $NaHCO_3$(pH≈8.3)体系；亦可选用 0.05 M 硼酸钠缓冲液(pH≈8.5)、0.1 M 碳酸钠缓冲液(pH 8.3~9.0)作为替代反应体系。

2. 染料储存液制备

（1）染料取出后室温回温平衡，避免开盖冷凝水汽导致活性酯水解，加入无水 DMSO/DMF 充分涡旋溶解染料，静置 5~10 min 确保完全溶解，配制浓度为 10 mM 的染料储存液，微量标记实验可按需稀释母液降低浓度。

注：剩余的染料储存液应于-20 ℃低温存放，以备后续使用。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。

3. 标记偶联反应

（1）轻柔混匀抗体溶液，逐滴缓慢滴加 15~25 μL 10 mM 染料储备液，控制染料：IgG 摩尔比 9：1 ~ 15：1。

（2）在室温避光轻柔搅拌或摇床振荡孵育 1 h，完成特异性共价偶联标记。

4. 游离染料去除与产物纯化

（1）将标记反应后的混合液转入截留分子量≥10 kDa 的透析膜中，以 pH≈7.4 PBS 为透析缓冲液进行换液纯化。

注：

a. 必须彻底去除未反应的游离染料，方可测得精准的染料-蛋白标记比值，保障实验结果准确可靠。推荐透析时长约 4 h，期间更换 3 次新鲜 PBS 透析缓冲液，可完全去除残留游离染料，达到最优纯化效果。

b. 对于小规模的标记反应，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。

c. 若无法及时纯化，可加入 50 μL 1 M 赖氨酸溶液终止剩余活性酯反应；常规体系中未反应染料会自行水解，一般无需终止操作。

5. 标记产物保存方法

（1）长期稳定保存建议添加终浓度 5~10 mg/mL BSA、0.01%~0.03% NaN_3，分装单次用量后-20 ℃避光冻存，可稳定存放一年以上。

三、 DOL 测定

1. 抗体蛋白浓度计算

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

注：C 为纯化后抗体浓度；Cf 为对应染料 A_{280} 校正因子；Amax 为染料最大吸收波长吸光度。

2. DOL 标记摩尔比计算

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

注：Mwt 是指 IgG 的分子量(150,000)；ε为摩尔吸光系数。

常见疑问与解答：

- 问：SE染料如何标记IgM抗体呢？

  答：常规 IgM 标记采用中性 pH 缓冲液，用磷酸盐缓冲液(PBS，pH≈7.4)将 IgM 抗体溶解至浓度为 2.5~5 mg/mL。需要注意的是:中性 pH 条件下,水解反应优于标记反应,因此 IgM 标记需使用更高的染料比例(摩尔比约为 50∶1 或 100∶1)；在搅拌或涡旋蛋白质溶液的同时，向每毫升抗体溶液中逐滴加入 70~140 μL 10 mM 染料储备液，对应的染料与 IgM 摩尔比为 50∶1 至 100∶1；若需更多染料以达到最佳标记度(DOL)，可将储备液浓度提高至 20 mM。

- 问：蛋白未被标记可能的原因是什么？

  答：可能有以下两点原因：

  a.可能是偶联缓冲液含伯胺类物质（如 Tris、甘氨酸），干扰反应；应该使用不含伯胺的偶联缓冲液（如硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液或 PBS）。

  b.可能 NHS 酯发生水解，失去反应活性；标记试剂临用前现配，禁止将 NHS 酯试剂存放于水溶液中。

- 问：Alexa Fluor™、CF®、与我司的BF™与PO类荧光染料，在抗体标记实验中，有没有区别？

  答：BF™荧光染料可替代 Alexa Fluor™、CF®荧光染料，BF™标记的抗体完全兼容现有共聚焦显微镜、流式细胞仪等所有商用仪器的标准滤光片通道。BF™荧光染料对抗体无实质差别标记。PO 类荧光染料可替代 Leica ATTO 类荧光染料，对与抗体标记无实质区别。

注：文件版本：2026 年 10 月 19 日第 4 次修订