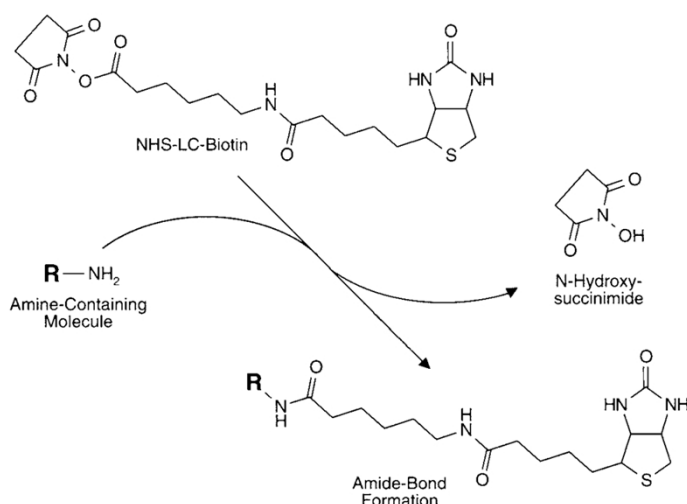


产品编号: 6014-1

NHS-LC-生物素 (NHS-LC-Biotin, Succinimidyl 6-(biotinamido) hexanoate CAS 号 72040-63-2, 分子量 455) 与含有氨基的蛋白质反应, 形成酰胺键, 从而将生物素连接到蛋白质上。

本试剂盒提供了标记生物素所需全部试剂。使用加臂生物素, 可减少空间位阻, 促进生物素-(链)亲和素的结合。标记过程快, 90 分钟可完成, 可以标记低至 0.2mg, 高至 10mg 蛋白。

本试剂盒用于标记抗体, 也可用于标记其它蛋白质、多肽激素或细胞因子等。
标记生物素的原理图



产品组成

1. NHS-LC-生物素 0.455mg/支 (干燥, -4°C保存)
2. DMF 500μl×1
3. PBS pH7.4, 浓缩液 20x, 10ml
4. Sephadex G-25 柱, 床柱体积 5ml, 高度 4cm, 最大样品体积 1ml。

储存条件

本试剂盒未开封前可稳定保存一年

生物素使用量的计算

标记蛋白质时, 生物素与蛋白质的分子比在 10: 1~100: 1。每个反应中生物素试剂的使用量取决于待标记蛋白质的量和浓度。标记浓度为 2mg/ml 的抗体 (IgG, 150KD), 使用生物素和抗体的最理想的分子比为 20:1。

标记 2mg/ml 的抗体, 使用生物素和抗体的分子比为 20:1 时, 应加入生物素量的计算方法: 抗体体积 (ml) × 2(mg/ml) ÷ 150000 (mg/mmol) × 20 = mmol 生物素

对于 10mmol 的生物素溶液, 应加入反应中该生物素体积的计算方法: mmol 生物素 × 1000 ÷ 10 = 生物素 ul

举例: 标记 0.5ml, 2mg/ml 的 IgG 的计算:

$0.5 \text{ (ml)} \times 2 \text{ (mg/ml)} \div 150000 \text{ (mg/mmol)} \times 20 = 0.000133 \text{ mmol 生物素}$

对于 10mmol 的生物素溶液, 应加入反应中该生物素体积的计算方法: $0.000133 \text{ (mmol)} \div 10 \text{ (mmol/L)} = 0.0000133 \text{ L 生物素} = 13.3 \text{ μl}$

操作过程



实验准备

1. 仔细阅读使用说明书。
2. 计算 NHS-LC-生物素的量。
3. 提前 20min 从冰箱中取出试剂盒，平衡至室温。
4. 将 PBS 稀释，10ml PBS 加入去离子水，定容至 200ml。
5. 溶解 NHS-LC-生物素：加入 100 μ l DMF 至 NHS-LC-生物素管中，静置 10min，待其充分溶解，此时生物素的浓度为 10mM。(NHS-LC-生物素)溶解后将盖旋紧，-20 $^{\circ}$ C 储存两周内使用。

操作步骤

标记 (以 10mgIgG 的标记为例)

1. 将 IgG 用 0.01MPBS 调整成浓度为 10mg/ml，1.0mg/ml IgG 的 A280 为 1.36 (1.0cm 比色杯)。蛋白质溶液中不能含有氨基物质如 Tris 和甘氨酸，也不能含有叠氮钠，否则，先要对 0.01MPBS 透析。IgG 不能含有血清成分，应该通过亲和层析纯化。
2. 取 67 μ l NHS-LC-生物素于 1ml 抗体溶液中 (10:1)，混匀，室温避光孵育 30min 或 4 $^{\circ}$ C 2 小时。

标记蛋白质的纯化

1. 将凝胶过滤层析柱固定在铁架台上。依次打开层析柱的上盖，下盖，液体开始流出，待液面降低至滤片处，盖上下盖，以防止柱内液体流干。
2. 用 30ml 0.01 M PBS 清洗层析柱，如果不立即使用，可将下盖和上盖盖上，2~8 $^{\circ}$ C 储存。
3. 将反应产物加到层析柱上，上样量最多 1ml。
4. 打开下盖，液体流出，收集流穿液，每管约 1ml。
5. 样品完全进入层析柱的上面的滤片后补加 0.01 M PBS，加入总量 9ml。
6. 检测每管中蛋白质 (用紫外分光光度计测 OD280,或考马斯亮蓝 G-250 检测)
7. 将含蛋白质的部分合并在一起，即为标记的蛋白质产物。
8. 层析柱用 50ml 0.01 M PBS 清洗。
9. 为了长期保存层析柱，在 PBS 中加入 0.1%叠氮钠。
10. 在胶上加 2ml 含防腐剂 PBS，将上下盖盖上，2~8 $^{\circ}$ C 储存。

注意事项

1. 本试剂盒也可标记其它含有氨基 (-NH₂) 的抗原、HRP、多肽，具体标记比例根据待标记物中氨基的数量确定。
2. DMF 要密封干燥保存，使用完立即用封口膜封紧。
3. 本试剂盒未开封前的有效期为一年，请在有效期内使用。