

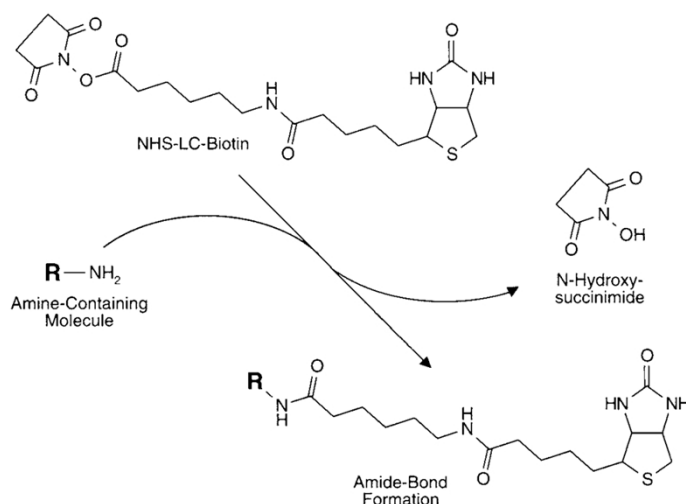
## 生物素标记试剂盒(微量蛋白质标记)

产品编号: 6014-2

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。

本试剂盒用于标记小量抗体(1mg), 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 0.137mg/支 (干燥, 4°C保存)
2. DMF 500μl×1
3. PBS pH7.4, 浓缩液 20x, 10ml
4. 反应终止液 500μl×1。

### 储存条件

本试剂盒未开封前在 2~8°C可稳定保存一年

### 标记过程需要仪器

1. 10μl, 50μl, 200μl, 1000μl 可调高精度移液器
2. 超滤管 (截留分子量 10000)
3. 离心机

### 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 μl



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： $0.000133 \text{ (mmol)} \div 10 \text{ (mmol/L)} = 0.0000133 \text{L 生物素} = 13.3 \mu\text{l}$

## 操作过程

### 实验准备

1. 抗体 IgG 配制成 10mg/ml，稀释液为 0.1M PB, pH7.2, 1.0mg/ml IgG 的 A280 是 1.36。缓冲液中不能含有氨基物质如 Tris, 甘氨酸, 不能含有叠氮钠, 如果含有上述物质, 需要对 0.1M PB, pH7.2 透析。如果浓度低于 1mg/ml, 需要浓缩至浓度高于 1.0mg/ml(用 4ml 超滤管, 截留分子量 10000)。
2. 计算 NHS-LC-生物素的量。NHS-LC-生物素与蛋白质的摩尔比随蛋白质浓度而变化, 一般来说, 蛋白质浓度越低, NHS-LC-生物素: 蛋白质比值越高, 蛋白质浓度不宜低于 1mg/ml。以 IgG 为例, 1mg/ml 浓度下, NHS-LC-生物素: IgG 比例 20~50; 10mg/ml 的浓度下, NHS-LC-生物素: IgG 比例 10~20。
3. 提前 30min 从冰箱中取出试剂盒, 平衡至室温。
4. 将 PBS 稀释, 10mIPBS 加入去离子水, 定容至 200ml。
5. 溶解 NHS-LC-生物素: 加入 30 $\mu\text{l}$ 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。

### 操作步骤 (以标记 1mg 为例)

#### 标记步骤

1. 取 1mg(10mg/ml 溶解于 PBS 中) 100 $\mu\text{l}$  待标记抗体于 0.5ml 离心管中。
2. 加入 10 $\mu\text{l}$  NHS-LC-生物素 (生物素: IgG 摩尔比 15:1) 至上述离心管中, 涡旋混匀。放入 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中避光温育 30min 或 2~8  $^{\circ}\text{C}$  2 小时。
3. 加入 100 $\mu\text{l}$  反应终止液

### 标记蛋白质的纯化

用截留分子量 10000 的超滤管去除游离生物素。

### 注意事项

1. 本试剂盒也可标记其它含有氨基 (-NH<sub>2</sub>) 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. 生物素标记蛋白质的标记率可以通过 HABA-亲和素分析法检测, 但是此种方法通常需要大量的蛋白质 (1mg)。