

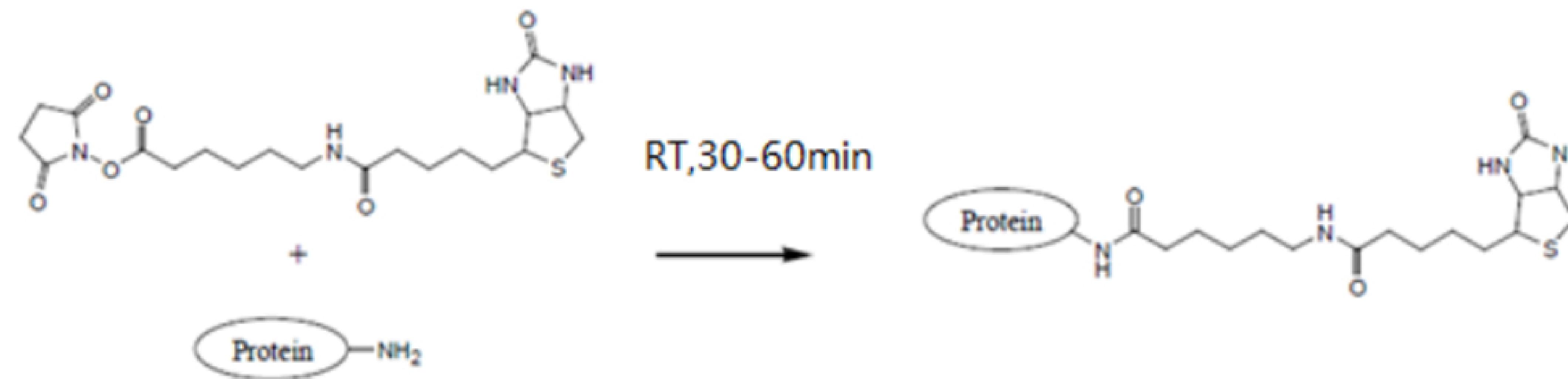
生物素化标记操作手册

Prod #: G-MM-IGT

Biotinylation Kit

原理

生物素化标记是最流行的标记方法之一，被广泛用于酶联免疫，EMSA，生物膜干涉技术等相互作用检测。该试剂盒中的生物素试剂主要是基于氨基的生物素化，即将生物素共价偶联在目标物质的氨基上 (-NH₂)。以蛋白质为例，如下图所示



在生物素标记完成后，用凝胶层析方法（脱盐柱）去除分子量较小的未反应的生物素化试剂，并收集标记完成的大分子。

本试剂盒包含一管20ul的10mM生物素化试剂和一个脱盐柱（截留分子量为5000Da）。

适用范围：带有氨基的物质的生物素化和纯化。

实验试剂和耗材

- 1) 缓冲液：PBS,pH7.4-7.6, 30ml
- 2) 掌上离心机，一台
- 3) 待生物素标记的目标物质。
 - 浓度100ug/ml以上,50-100ul。
 - 目标物纯度建议在90%以上。
 - 缓冲液中除了目标物外不得含有其他任何带有氨基的物质（如Tris，载体蛋白等）。如果有，必须通过脱盐或者透析等方法去除。
 - 如果需要用脱盐柱去除未反应的生物素化试剂，分子量需要大于5000Da
- 4) 生物素化试剂盒装生物素化试剂的管子从冰箱移出后解冻，在使用前可以短暂(30-60s)的离心，确保生物素试剂留在管底。取用完毕后立即放入-20°C冰箱。

实验步骤

A) 生物素化

1.生物素化比例的选择：

建议偶联的生物素化试剂：目标物的摩尔比(MCR)为1:1~2:1，如果目标物浓度小于0.5mg/mL或分子量大于100kDa时，推荐采用生物素：目标物为3:1(MCR=3)的比例。

注意：如果生物素化比例太高，可能对生物素化的物质活性产生很大影响。

2.生物素化试剂使用量的计算：

所需10 mM生物素化试剂的体积(uL)=

$$\frac{\text{目标物浓度 } (\frac{\text{mg}}{\text{mL}})}{\text{目标物分子量 } (\text{kDa})} \times \text{MCR (生物素化摩尔比)} \times \text{目标物体积 (uL)} \times 0.1$$

注意每一项的单位。

参见案例①与案例②：

案例①：1 mL浓度为1mg/mL的IgG(150 kDa)采用MCR为1:1比例所需生物素化试剂的体积

案例②：0.1 mL浓度为0.5 mg/mL的目标物(50 kDa)采用MCR为3:1比例所需生物素化试剂的体积

注：如果加样体积在0.1uL以下，建议先将10mM生物素化试剂母液稀释10倍再取相应量的生物素化试剂。

3.在50-100uL目标物溶液中，加入通过以上公式计算的需要加入的生物素化试剂体积，混合均匀。如果发现有气泡或者贴壁溶液，可以进行一轮短暂的离心。

4.室温反应30-60 min。

5. (可选) 反应完成后，如果发现有沉淀，可以用5000g离心2分钟，吸取上清准备上脱盐柱。

B) 脱盐

1.脱盐柱预处理，将重力柱垂直固定，去掉保护盖，使用至少10mL PBS平衡脱盐柱，弃流穿。

PBS可以更换成目标物最佳的缓冲液，比如一些膜蛋白中需要有一定浓度的去污剂，需要用到10ml这种缓冲液来平衡脱盐柱。

2.将100uL生物素化后的目标物(不足100uL，用PBS补加到100uL)溶液加入到脱盐柱中，待样品完全进入脱盐柱中。

3.加入0.4mL PBS流穿，不收集。

4.加入0.4 mL PBS，收集洗脱液。

5.脱盐柱的再生与保存：

洗脱完成后，加入10ml PBS洗涤脱盐柱，最后在脱盐柱内保留2ml的PBS，并盖上盖子和塞子，垂直保存。如果需要长期保存，PBS中可加入20%乙醇。

该脱盐柱可以干柱，但是干柱时间不得超过20分钟。

C) 得率测定 (可选)

收集结束后，如果目标物是蛋白，建议用A280法或者BCA法检测浓度，并计算得率。

常见问题解答

1.为什么生物素化标记的效率很低？

a)多余的生物素化试剂未脱干净，可能需要透析或者再次过脱盐柱去除游离生物素。

b)生物素化前的目标物浓度过低。

c)样品中其他物质含有氨基，将其他含有氨基的物质去除，再进行生物素标记。

2.如果我的分子小于5000Da,怎么进行生物素化？

可以将摩尔比5-10倍的目标物和生物素化试剂混合，可能可以确保生物素化试剂完全反应，则不需要通过脱盐柱去除未反应的生物素化试剂。

3.生物素化试剂可以使用几次？脱盐柱可以重复使用几次？

20ul的生物素化试剂一般可以使用10-20次。原则上，脱盐柱可以使用无数次。但是如果发现流速变慢，可以意味着脱盐柱需要更换。

4.生物素化的目标物的要求是什么？

需要满足“实验试剂和耗材”中的“待生物素化的目标物质”中列举的条件，并需要带有氨基。

参考文献：

- 1) Giuseppe Papalia, David Myszka. Analytical Biochemistry, Volume 403, Issues 1–2, August 2010, Pages 30-35
- 2) Chapter 11 – Biotinylation Reagents. Bioconjugate Techniques (Second Edition)

产品订购信息：

Prod #: G-MM-IGT Biotinylation Kit

江苏博美达生命科学有限公司

咨询热线：400-0512-020

E-mail: sales006@bomeida.com