

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

生物素标记试剂盒

产品货号: RE80002

产品规格: 1 Reaction/3 Reactions/10 Reactions

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

Web: <https://www.enkilife.cn/>

E-mail: customer@enkilife.cn

Tel: 027-87002838

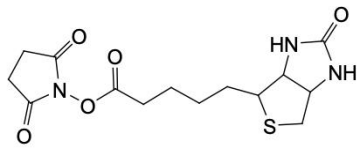
产品简介

本生物素标记试剂盒提供了生物素标记所需全部试剂，用于含有伯氨基（NH₂-）的蛋白/抗体或者其他大分子的标记。

产品特点

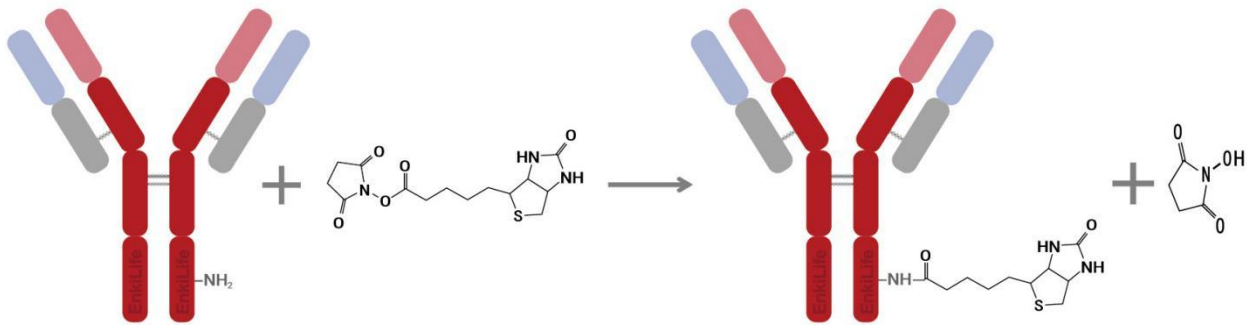
- ★ **快速：**整个过程最快仅需 90 min。
- ★ **方便：**生物素已活化可直接使用；超滤管脱盐，无需透析。
- ★ **使用灵活：**既可用于微量标记又可大量标记，每支超滤管每次可标记 0.1-1 mg 蛋白。
- ★ **脂溶性：**本试剂盒内生物素为脂溶性，某些实验中，需要生物素标记的蛋白进入细胞膜内进行反应，此种标记方式相对比较有效。

基本信息

结构式	
分子量	341.38

标记原理

在一定 pH 范围内，生物素专一地与伯氨基反应(N-末端及赖氨酸残基侧链)形成稳定的酰胺键，从而实现与蛋白的偶联。



产品组分

产品组分	不同规格组分含量			储存温度
	1 Reaction	3 Reactions	10 Reactions	
生物素	0.1 mg×1	0.1 mg×3	0.1 mg×10	-20°C, shading light
50 KD 超滤管*	1 set**	3 set**	10 set**	RT
标记缓冲液（Labeling Buffer）	10 mL	20 mL	20 mL×10	2~8°C
1×PBS (pH 7.4)	10 mL	10 mL	10 mL×2	2~8°C
DMF	500 μL	500 μL	500 μL	2~8°C, shading light
可标记抗体量	0.05 - 2 mg	0.05 - 6 mg	0.05 - 20 mg	

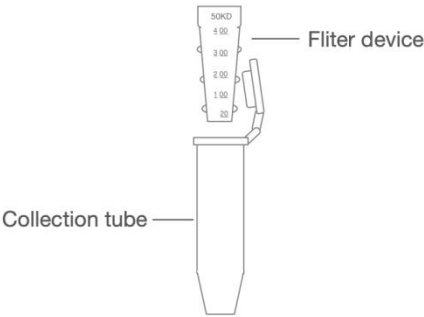
*超滤管使用说明：

若标记同一种生物分子，超滤管膜未破裂前可重复使用数次。

若标记不同生物分子，应更换不同超滤管，避免生物分子交叉污染。

**50 KD 超滤管购自 Millipore。

***1 set 50 KD 超滤管(0.5 mL)包括 1 个滤芯（filter device）和 2 个收集管（collection tube）。



保存条件

未拆封的试剂盒可在 2~8°C保存一年，溶解后的生物素可在-20°C或-80°C保存一周。

生物素标记使用量的计算

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。例如，通过我们实验数据分析表明，标记 2 mg/mL 的抗体（IgG，150 KD），使用生物素和抗体的分子比为 20：1 能达到最佳效果；其他蛋白的标记可以根据实际情况，参照此比例类推。

示例：标记 1 mg 的蛋白(浓度约 2 mg/mL)，使用生物素和蛋白(150 KD)的分子比为 20:1 时，

生物素的摩尔浓度为 10 mM，应加入生物素量的计算方法：

1. 计算需要的生物素的物质的量 n ：

$$n_{\text{Biotin}} = n_{\text{抗体/蛋白}} \times 20 = \frac{1 \text{ mg}}{150000 \text{ mg/mmol}} \times 20 = 0.00013333 \text{ mmol}$$

2. 计算需要的生物素的体积 V ：

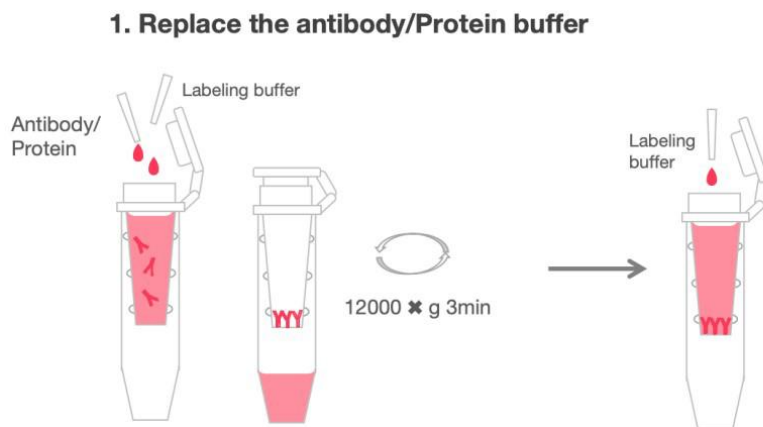
$$V_{\text{Biotin}} = \frac{n_{\text{Biotin}}}{C_{\text{Biotin}}} = \frac{0.00013333 \text{ mmol}}{10 \text{ mM}} = 13.3 \text{ } \mu\text{L}$$

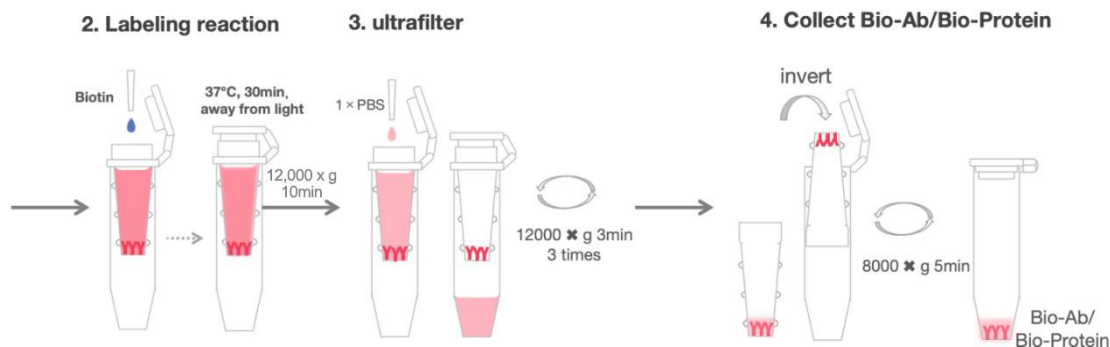
操作过程

·实验前准备

1. 仔细阅读使用说明书。
2. 按照生物素标记使用量的计算的公式计算所需要的生物素的量。
3. 提前 20 min 从冰箱中取出试剂盒，使试剂盒各组分平衡至室温。（注：不需要用到的试剂组分继续放置在冰箱中）。
4. 超滤管浸润：向干燥的超滤管滤芯中加入 500 μL 标记缓冲液，室温放置 10 min 备用，在加入待标记物之前弃去标记缓冲液即可（整个标记过程中超滤管滤芯都应该保持湿润）。
5. 溶解生物素：用 30 μL DMF 溶解 0.1 mg 生物素，静置 10 min，待其充分溶解，此时生物素的浓度为 10 mM，盖好管子备用。

· 标记流程





· 标记步骤（本操作步骤按照 1mg 抗体的量进行标记）

1. 取 1 mg 待标记抗体于超滤管中，并加入不超过超滤管最大体积的标记缓冲液，12,000 × g 离心 3 min；可以重复此步骤 3 次；最后一次超滤完成，加入 0.5 mL 标记缓冲液调整抗体的浓度到 2 mg/mL 左右。
2. 加入 13.3 μL 的 10 mM 生物素至上述超滤管中，并轻轻吹打混匀。放入 37 °C 恒温箱中避光温育 30 min, 12,000× g 离心 10 min。
3. 加入适量 1×PBS 至上述超滤管中，并轻轻吹打混匀，12,000 g 离心 3 min，重复此步骤 3 次。
4. 收集超滤管中的溶液（即生物素标记的抗体）：加 0.2 mL 1×PBS 至超滤管中，轻轻吹打。将超滤管倒置于另一个收集管中，8,000 × g 离心 5 min。收集管中得到的溶液，即为生物素标记的抗体。
5. 向标记后的抗体中加入保存液，-20 °C 保存。

注意事项

1. 请根据待标记蛋白的分子量选择合适的试剂盒，本试剂盒提供 50 KD 的超滤管。
2. 生物素易受潮水解失效，应与干燥剂一同置于 -20°C 或 -80°C 保存。为防止水蒸气冷凝到生物素中，实验前将其移至室温平衡。
3. 溶解的生物素最好一次性使用完，如果使用不完可以密封放在 -20°C 的冰箱内，一月内可以使用，但是标记效率会降低。生物素助溶剂使用完之后需要立即密封保存，防止吸潮。
4. 本试剂盒也可标记其它含有游离氨基的蛋白，具体标记比例根据待标记物中可用氨基的数量确定或者设置不同摩尔比例进行标记。

5. 本试剂盒标记推荐的生物素和蛋白(150 KD)的最佳分子比为 20:1，可确保生物素能标记上蛋白，但无法确保实验结果最佳，最佳标记比例可能根据蛋白的差异而不同，用户可根据实际情况优化。

声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 尽管本标记试剂盒验证标记过许多不同的蛋白，但仍有可能在生物素标记蛋白过程中，蛋白结合亲和力受到损害甚至失去，虽然这种现象很罕见，发生这种现象的原因很可能是该蛋白在抗原结合位点直接具有一个或多个关键赖氨酸氨基酸残基，在标记过程中其结合功能受到损害。此外，一些蛋白具有关键的赖氨酸残基(不一定在结合位点)，对维持蛋白的稳定性/溶解度是绝对关键的，一旦修饰，由于沉淀导致蛋白完全不可用。对此罕见情况，本标记试剂盒不附带完全责任。我们认为我们的客户应该意识到，使用本试剂盒中的生物素在某些情况下可能会损害被修饰蛋白的生物学功能。
4. 虽然本试剂盒也可用于标记蛋白，但应认识到不同蛋白的多种性状的变化，如蛋白在不同缓冲液中的溶解度，pH 稳定性，温度稳定性，蛋白纯度，标记位点的可及性等都有较大区别，因此本标记试剂盒不对标记除 IgG、IgM 蛋白之外的蛋白做质量保证。

附录 蛋白保留与浓缩回收(参考 Millipore 产品说明书)

(摘自 Millipore 用户指南:https://www.merckmillipore.com/CN/zh/product/Amicon-Ultra-0.5mL-Centrifugal-Filters-for-DNA-and-Protein-Purification-and-Concentration,MM_NF-C82301#documentation)
对于大多数应用，分子量是评估保留特性的一个方便参数。Merck Millipore Ltd. (Millipore) 推荐使用 NMWL 至少比要浓缩的蛋白溶质的分子量小两倍的膜。请参考下表。

Marker/Concentration	Molecular Weigh	Device NMWL	% Retention	Spin Time (min)
α -Chymotrypsinogen (1 mg/mL)	25,000	3K	>95	30
Cytochrome C (0.25 mg/mL)	12,400		>95	30
Vitamin B-12 (0.2 mg/mL)	1,350		>42	30
α -Chymotrypsinogen (1 mg/mL)	25,000	10K	>95	15
Cytochrome C (0.25 mg/mL)	12,400		>95	15
Vitamin B-12 (0.2 mg/mL)	1,350		>23	15

BSA (1 mg/mL)	67,000	30K	>95	10
Ovalbumin (1 mg/mL) Cytochrome	45,000		>95	10
C (0.25 mg/mL)	12,400		<35	10
BSA (1 mg/mL)	67,000	50K	>95	10
Ovalbumin (1 mg/mL) Cytochrome	45,000		~40	10
C (0.25 mg/mL)	12,400		<20	10
Thyroglobulin (0.5 mg/mL)	677,000	100K	>95	10
IgG (1 mg/mL)	156,000		>95	10
Ovalbumin (1 mg/mL)	45,000		<30	10

旋转条件：40°固定角度转子，14000×g，室温，500 μL 起始体积，n = 12。