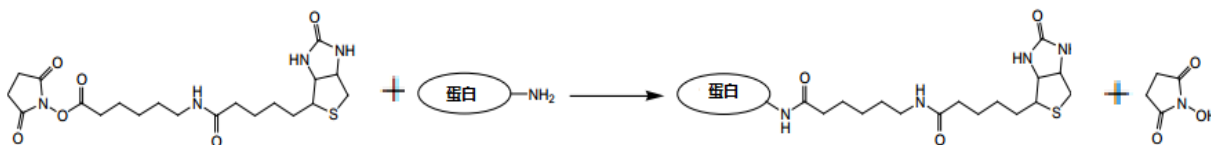


生物素快速标记及效率检测试剂盒

Biotin Labeling and Efficiency Detection Kit

产品简介:

本生物素快速标记试剂盒提供了生物素快速标记所需全部试剂，用于含有伯氨基（NH₂-）的蛋白、抗体、多肽或者其他大分子的标记。其反应原理如下：



产品特点:

- 使用方法简单，无需额外准备试剂；
- 节约时间，整个过程仅需 90min；
- 通过离心脱盐和去除游离的生物素，无需透析或者凝胶过滤；
- 既可用于微量标记又可大量标记，每次可标记 0.2-2mg；
- 本试剂盒对于标记好的分子可以测试其生物素标记效率，无需额外购买标记效率检测试剂盒

主要组分:

活性生物素	2mg/4mg/6mg
超滤管	0.5mL/4mL/15mL
标记缓冲液	30mL/60mL/90mL
标记物保存液	2mL/4mL/10mL
助溶剂 (DMSO)	1mL/1.5mL/2mL
HABA 溶液	0.25mL /0.5mL/1mL

储存条件:

本试剂盒低温运输，收到后请置于 2-8℃保存，保存时间 18 个月。

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 2mg/ml 的抗体 (IgG , 150KD)，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。

计算公式如下：

$$V(uL) = \frac{V1(mL) \times C1(mg / mL) \times R}{M \times C(mM)} \times 10^6$$

其中：V(μL)为生物素的体积；

V1(mL)为待标记物（蛋白/抗体/其他含有伯胺-NH₂ 的大分子）的体积；

C1(mg/mL)为待标记物的浓度；

R 为生物素与待标记物的分子比例；

M 为待标记物的分子量（道尔顿，Dalton，Da）

C(mM)为生物素的浓度

计算示例：我们将生物素配置成 10mM 的浓度，用来标记 1mL 的 2mg/mL 的抗体 (IgG , 150KD)，准备加入的生物素与抗体的比例为 20:1，那么带入公式计算

$$V(uL) = \frac{1 \times 2 \times 20}{150,000 \times 10} \times 10^6 = 26.66uL$$

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 20min 从冰箱中取出试剂盒，使试剂盒各组份平衡至室温。
- 4.用助溶剂 DMSO 将活性生物素配制成 10mM(2mg 生物素加 DMSO 440ul)。

特别提示：

- A. 溶解的活性生物素最好一次性使用完，如果使用不完可以密封放在-20℃的冰箱内，一月内可以使用，但是标记效率会降低；
- B. 生物素助溶剂使用完之后需要立即密封保存，防止吸潮。

操作步骤：(本操作步骤按照 1mg 抗体的量进行标记)

1. 取 1mg 待标记抗体于超滤管中，并加入相应体积的**标记缓冲液**，使抗体的终浓度为 2mg/mL，12,000 x g 离心 10min。
请注意：
A.超滤管的最大体积和最大截留分子量，本实例超滤管的最大体积为 0.5mL；
B.如果待标记抗体浓度低时，可先超滤离心浓缩；
C.如果待标记物含有游离的氨基 (Tris,氨基酸或者其他干扰物，需要用标记缓冲液反复超滤确保其去除干净)
2. 加入 13.3μL **生物素溶液**和适量**标记缓冲液**至上述超滤管中，使终体积为 0.5ml，并轻轻吹打混匀。放入 37℃恒温箱中避光温育 30min。
3. 12,000 x g 离心 10min。
4. 加入适量**标记缓冲液**至上述超滤管中，并轻轻吹打混匀，12,000 x g 离心 10min，重复此步骤多次。
5. 收集超滤管中的溶液（即生物素标记的抗体），加入等体积保存液，-20℃保存。

生物素标记的抗体测量标记效率（微孔酶标板法）：

- A. 取 180uL HABA- Avidin 混合液放入微孔板中，在 500nm 波长测量吸光值，记录为 $A_{500(H-A)}$ ；最好测量三次取平均值；
- B. 在微孔板中加入 20uL 待测的生物素标记蛋白 (Biotinylated Protein,简称 BP)，震荡或移液器吹打充分混匀后，在 500nm 波长测量吸光值，吸光值稳定 20 秒以上，记录为 $A_{500(H-A-BP)}$ ；最好测量三次取平均值；如果 $A_{500(H-A-BP)} < 0.3 \times A_{500(H-A)}$ ，请用 PBS 稀释待测样品，再次重复此步骤。

标记效率计算方法：

- 1) 蛋白摩尔浓度计算： $mM / mL = \frac{\text{蛋白浓度 (mg/mL)}}{\text{蛋白分子量 (mg/mmol)}}$
- 2) 生物素摩尔浓度计算（微孔板法）： $mM / mL = \frac{\Delta A_{500}}{34000 \times 0.58}$

其中吸光值变化(微孔酶标板): $\Delta A_{500} = A_{500(H-A)} - A_{500(H-A-BP)}$

备注: 使用标准 96 孔微孔板, 200ul 液体, 其液面高度 (光程) 为 0.58cm

4) 标记摩尔比计算:

生物素: 蛋白 = [(生物素摩尔浓度 * 10) / 蛋白原始摩尔浓度] * 稀释倍数

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. 本试剂盒中的生物素助溶剂为 DMSO, 使用完毕后要密封干燥保存。
3. 本试剂盒未开封前的有效期为 18 个月, 请在有效期内使用; 本试剂盒中的生物素加入助溶剂之后, 如果使用不完, 请密封后 -20℃ 保存, 一周内可以正常使用, 如果超过一周, 但在一个月之内, 可以使用, 使用量请酌情加大; 超过一个月请不要再使用。
4. 请注意试剂盒中提供的超滤管的规格和分子截流大小来确定是否适合您的最佳标记条件;
5. 在步骤 2 中, 标记其它抗体时, 我们最好控制抗体的终浓度为 2mg/mL, 然后再根据抗体的量计算应加入活性生物素的体积。

***本试剂仅供实验室研究使用**

请根据待标记物的分子量大小和标记量选择最适宜的规格

产品编号	最大标记体积	待标记物最小分子量	可标记抗体量
ATB01011-3K-0.5mL	0.5mL	3kDa	0.2-40mg
ATB01011-3K-4.0mL	4.0mL	3kDa	1.0-80mg
ATB01011-3K-15mL	15mL	3kDa	5.0-120mg
ATB01011-10K-0.5mL	0.5mL	10kDa	0.2-40mg
ATB01011-10K-4.0mL	4.0mL	10kDa	1.0-80mg
ATB01011-10K-15mL	15mL	10kDa	5.0-120mg
ATB01011-30K-0.5mL	0.5mL	30kDa	0.2-40mg
ATB01011-30K-4.0mL	4.0mL	30kDa	1.0-80mg
ATB01011-30K-15mL	15mL	30kDa	5.0-120mg
ATB01011-50K-0.5mL	0.5mL	50kDa	0.2-40mg
ATB01011-50K-4.0mL	4.0mL	50kDa	1.0-80mg
ATB01011-50K-15mL	15mL	50kDa	5.0-120mg
ATB01011-100K-0.5mL	0.5mL	100kDa	0.2-40mg
ATB01011-100K-4.0mL	4.0mL	100kDa	1.0-80mg
ATB01011-100K-15mL	15mL	100kDa	5.0-120mg