

Biotin Labeling Kit - NH₂(1 mg) 技术手册

产品描述

Biotin Labeling Kit - NH₂ 主要用于制备生物素标记的蛋白质，用于酶免疫分析(EIA)。NH₂-Reactive Biotin 是试剂盒成分之一，它含有琥珀酰亚胺基(NHS)，能轻易地与蛋白质或其他分子的氨基反应。该试剂盒中的过滤管可用于除去干扰标记反应的小分子。整个标记过程十分简便。只需将 NH₂-Reactive Biotin 加入到 IgG 溶液中，37 °C 培养 10 分钟即可。过量的生物素分子能够使用过滤管将其除去。该试剂盒中包含了标记所需的全部试剂，包括储存缓冲液。

试剂盒内含

NH₂-Reactive Biotin ······ 1 管
WS Buffer ······ 13 ml x 1
Reaction Buffer ······ 1.2 ml x 1
Filtration Tube ······ 1 管
15 ml Tube (用于平衡) ······ 1 管

适用范围

一个样品标记

样品需求：分子量>50,000，具有反应性的氨基

储存条件

储存于 0-5 °C，未开封试剂在 0-5 °C 能稳定保存 6 个月

*一旦密封铝箔袋打开，请确保使 NH₂-Reactive Biotin 保存在铝箔袋中，并在 -20 °C 下紧闭袋口。该试剂盒中的其他试剂可在 0-5 °C 保存。

所需仪器 (试剂盒以外)

200 μl 和 1 ml 的移液器

37 °C 培养箱

DMSO

离心机以及 15 ml 离心管的转子

容量>2 ml 的试管 (用于保存标记产物)

注意事项

- 如果 IgG 溶液中含有分子量大于 10,000 的标记对象以外物质，比如血清白蛋白或明胶，请先纯化 IgG 溶液，并使用纯化后的蛋白进行标记，否则可能会干扰整个标记反应。
- 如果 IgG 溶液含有不溶性的小分子物质，离心后取上清来进行标记。
- 0-5 °C 保存时或从 0-5 °C 回到室温的阶段，有时会在过滤管内部出现像水滴一样的液粒。此现象是来自在 Filter 上防止干燥剂的液粒化，不会影响实验操作。

标记 IgG 操作步骤



1. 将 1 ml WS Buffer 以及含有 1 mg IgG 的样品溶液加入到 Filtration Tube 中^{a)}。准备 1 支 15 ml 的管子^{b)}。



2. 用移液器吹打使其混合并以 6,000 x g 离心 30 分钟^{c)}。



3. 再向 Filtration Tube 中加入 1 ml WS Buffer^{b)}。



4. 以 6,000 x g 再离心 30 分钟^{c)}。



5. 将 100 μ l DMSO 加入 NH₂ - Reactive Biotin 中，并用移液器吹打使其溶解^{d)}。



6. 将 900 μl Reaction Buffer 加入 Filtration Tube 中，再加入 80 μl NH_2 - Reactive Biotin 和 DMSO 的混合液。



7. 用移液器吹打数次使其混合，并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 分钟。



8. 向 Filtration Tube 中加入 1 ml WS Buffer 并以 6,000 x g 离心 30 分钟^{b) c)}。如果滤液大于或等于 4 ml，步骤 9 前除去滤液。



9. 向 Filtration Tube 中加入 2 ml WS Buffer 并以 6,000 x g 离心 30 分钟^{b) c)}。重复此步骤。



10. 加入 2 ml WS Buffer 并用移液器吹打 10-15 次来回收标记产物。将溶液转移到试管中（试管不包含在本试剂盒中），并在 0-5 $^{\circ}\text{C}$ 下保存^{e)}。

- a) 样品溶液的体积不应超过 3 ml。如果超过 3 ml，请重复步骤 1 和 2 直至总的 IgG 聚积达到 1 mg。如果在聚积过程中滤液的体积超过 4 ml，在进行后续的离心操作前应除去滤液。
- b) 测量过滤管的质量。准备一支质量相同的 15 ml 管子装满水。15 ml 的管子用于溶液平衡。
- c) 如果使用摇摆的转子则以 4,000 x g 离心。如果离心后溶液仍残留在膜上，则再离心 10 分钟。如果最大离心力小于 6,000 x g，需离心更多的时间（以 2,000 x g 额外离心 50-60 分钟）。
- d) NH₂- Reactive Biotin 在管子的底部，向管底加入 100 μl 的 DMSO，并用移液器吹打数次使其溶解。NH₂- Reactive Biotin 容易会被 DMSO 中的水分水解。在准备好 NH₂- Reactive Biotin 溶液之后需尽快进行步骤 6。
- e) 建议使用 WS Buffer 储存标记产物。也可以选择任何适合于该实验的缓冲液来替代。

Q&A

1. 能够用该试剂盒标记其他抗体吗？

答：可以。但是如果含有稳定剂（血清白蛋白、明胶等的高分子）的抗体，标记反应可能会受到干扰。用该试剂盒标记前，有必要先纯化抗体溶液。如果想进一步了解纯化过程，可以联系我们。

2. 能否用该试剂盒标记寡核苷酸或者寡肽？

答：不能。寡核苷酸和寡肽的分子量太小，不能使其保留在过滤膜上。

3. 是否必须要用 WS Buffer 来储存标记产物？

答：建议使用 WS Buffer，但也可以使用任何适合该实验的缓冲液。

4. 标记产物能保存多久？

答：标记产物的稳定性取决于蛋白质本身的稳定性。如用该试剂盒标记兔的 IgG 在 4 °C 下能够稳定保存 2 个月。如果需要保存更久，可以添加等量的丙三醇，并在 -20 °C 下存放。

5. 有多少个生物素被结合到 1 个蛋白质分子上？

答：结合到蛋白质上的生物素量取决于蛋白质上的反应性氨基数量。例如兔的 IgG，每个蛋白质上能结合 7-10 个生物素。

6. 对于生物素标记的蛋白质添加到细胞，有哪些需要注意的操作？

答：准备细胞悬液时，建议使用含有 2-10 % FBS 的 PBS，以使细胞保持在最好的状态。

7. 储存液（WS Buffer）对活细胞有损伤吗？

答：没有。WS Buffer 含有对细胞几乎没有毒性浓度的表面活性剂，如果担心 WS Buffer 中的添加剂对细胞有影响，可以使用其他缓冲液代替 WS Buffer。