

## 生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)

产品编号	产品名称	包装
P0632S	生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)	0.3mg×10次
P0632M	生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)	1.3mg×10次
P0632L	生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)	6.6mg×10次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS), 即Biotin Quick Labeling Kit with Biotin-LC-NHS, 也称生物素蛋白标记试剂盒(Biotin Protein Labeling Kit)、生物素蛋白偶联试剂盒(Biotin Protein Conjugation Kit), 是一种新型、高效的对感兴趣的蛋白、抗体或其它含有伯氨基的分子进行生物素快速标记的试剂盒。本试剂盒标记的蛋白、抗体等的效果通常优于Biotin-NHS, 可以用于免疫组织化学(Immunohistochemistry)、免疫印迹(Immunoblotting)、酶联免疫试剂盒(ELISA)、蛋白检测、流式细胞分析、Southern、Northern等实验。
- 生物素(Biotin)是一种天然存在的小分子, 它的存在很多情况下不会影响大分子的生物学功能。生物素广泛应用于生物素-(链霉亲和素系统(Biotin-(strept)avidin system), 同时生物素也是羧化酶的重要辅因子, 存在于各种代谢途径中[1-2]。生物素与亲和素(Avidin)或链霉亲和素(Streptavidin)的结合有助于将目标分子(抗体、核苷酸、蛋白A等)与标记系统(酶、荧光探针等)连接起来。这种复合物可以用于多种检测体系, 例如免疫沉淀、免疫组织化学、流式细胞分析、Southern和Northern等。同时, 这种方法也适用于各种目标分子的纯化和表征。
- Biotin-LC-NHS是一种中等长度、胺反应活性的NHS酯生物素化试剂, 全称为琥珀酰亚胺-6-(生物素酰氨基)-己酸, 间隔臂(Spacer arm length)即添加至靶标的总长度约为22.4Å, 由6原子链延长的生物素戊酸基团组成, 其中LC代表长链(Long Chain), 能使溶液中的蛋白、抗体或任何含伯胺的其它生物分子实现简单高效的生物素化, 中等长度的间隔臂极大增加了被修饰分子与生物素之间的长度, 降低了生物素后续与亲和素或链霉亲和素结合的空间位阻, 这样标记产物对于亲和素或链霉亲和素有更好的结合效果。Biotin-LC-NHS具有膜通透性, 因此可用于细胞内标记。Biotin-LC-NHS是最常用的生物素化试剂之一, 可在pH7.0-9.0的缓冲液中与伯氨基(-NH<sub>2</sub>)发生有效反应, 形成稳定的酰胺键[3]。包括抗体在内的蛋白质除了每个肽链的氨基末端, 通常还含有多个赖氨酸(K)残基, 因此具有多个伯胺作为Biotin-LC-NHS标记的靶标[4]。
- Biotin-LC-NHS由于其较长的间隔臂, 生物素的标记效果, 以及标记产物的使用效果, 通常会优于Biotin-NHS。
- 本试剂盒提供了生物素标记试剂(Biotin-LC-NHS)和用于纯化生物素标记生物大分子的脱盐柱(Desalting Column)。本试剂盒的标记流程和原理如图1所示。

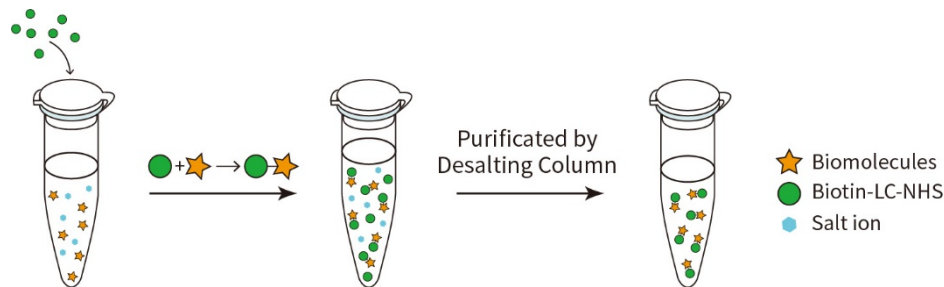


图1. 碧云天生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS) (P0632)的实验流程和原理示意图。

- **本试剂盒标记效率高、标记速度快、操作简单。**本试剂盒提供的Biotin-LC-NHS可高效标记各种带伯胺基的蛋白、抗体或其它分子; 提供了配套的不同柱床体积的Desalting Column (5kDa MWCO), 可轻松去除过量的标记试剂和盐离子并获得生物素标记的生物大分子, 而不需要进行透析或者凝胶过滤。
- **本试剂盒标记时间短、体系灵活。**本试剂盒可以在2小时内完成整个标记反应, 能有效保证了生物大分子的活性。
- 本试剂盒小包装、中包装和大包装都可进行10次标记反应, 每次最多分别可以标记约0.3mg、1.3mg和6.6mg蛋白或抗体。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P0632S-1	Biotin-LC-NHS	2mg
P0632S-2	无水溶剂	400μl
P0632S-3	NaHCO <sub>3</sub>	50mg
P0632S-4	Desalting Column (5kDa MWCO, 0.5ml)	10个

—	说明书	1份
---	-----	----

产品编号	产品名称	包装
P0632M-1	Biotin-LC-NHS	5mg
P0632M-2	无水溶剂	1ml
P0632M-3	NaHCO <sub>3</sub>	100mg
P0632M-4	Desalting Column (5kDa MWCO, 2ml)	10个
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0632L-1	Biotin-LC-NHS	10mg
P0632L-2	无水溶剂	2ml
P0632L-3	NaHCO <sub>3</sub>	500mg
P0632L-4	Desalting Column (5kDa MWCO, 8ml)	10个
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。Desalting Column也可以4°C保存，至少一年有效；Biotin-LC-NHS 4°C保存，至少一个月有效。无水溶剂和NaHCO<sub>3</sub>也可以室温或4°C保存，至少一年有效。

### 注意事项：

- 需自备PBS (C0221A/ST476)。
- 待标记分子的溶液里不能含有除待标记分子上的额外的伯胺基团或胺基离子，推荐使用PBS溶解带标记分子。为提升标记效果，待生物素标记的生物大分子的浓度不能太低。
- Biotin-LC-NHS很容易受潮水解失活，保存时一定要保持干燥；使用试剂盒提供的无水溶剂配制成母液后，可分装后-20°C保存，两个月内有效。-80°C可以保存更长时间。
- 对于不同体积和浓度的待标记分子，请选择适当的标记试剂盒。Desalting Column (5kDa MWCO, 0.5ml)、Desalting Column (5kDa MWCO, 2ml)和Desalting Column (5kDa MWCO, 8ml)，柱床体积分别0.5ml、2ml和8ml，对应的脱盐样品体积上限分别约为130μl、0.5ml和2.5ml，蛋白量上限分别约为0.3mg、1.3mg和6.6mg。
- 对于分子量小于5kDa的生物大分子，推荐使用BeyoDesalt™ G-10 Spin脱盐柱(P2603)、BeyoDesalt™ G-10 Mini脱盐柱(P2605)或BeyoDesalt™ G-10 Max脱盐柱(P2609)，这三种脱盐柱的MWCO为0.7kDa。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

#### 1. 准备工作。

- 将要标记的生物大分子溶解在1X PBS (C0221A)中，使终浓度约为0.5-3mg/ml。如果溶液里有额外的伯胺(如Tris或Glycine)或者胺离子，推荐使用碧云天脱盐柱(P2603/P2605/P2607/P2613/P2615/P2617)进行脱盐处理。
- 5mg/ml Biotin-LC-NHS的配制：称量适量的Biotin-LC-NHS，用试剂盒中的提供的无水溶剂进行溶解配制成5mg/ml Biotin-LC-NHS。如果短期内全部使用完毕，可以使用试剂盒中提供的全部的无水溶剂溶解全部的Biotin-LC-NHS，充分溶解后即5mg/ml Biotin-LC-NHS，例如小包装中的2mg Biotin-LC-NHS用400μl无水溶剂进行溶解。如不立即使用，可分装后-20°C保存，两个月内有效。
- 1M NaHCO<sub>3</sub>的配制：根据样品量配制适量的1M NaHCO<sub>3</sub>溶液，如称取10mg NaHCO<sub>3</sub>，加入119μl超纯水即得1M NaHCO<sub>3</sub>溶液。NaHCO<sub>3</sub>可维持标记反应体系的pH在7-9之间，提高标记效率，一般加入量为样品体积的1/10。注：NaHCO<sub>3</sub>溶液需用现配。

#### 2. 小量样品(不超过130μl, 蛋白浓度不超过3mg/ml)的生物素标记反应。

以下以样品体积为0.1ml为例，其它样品体积可按比例调整。

- 将需要标记的0.1ml生物大分子转移到洁净的1.5ml离心管(FTUB306)，加入10μl新鲜配制的1M NaHCO<sub>3</sub>溶液。
- 根据样品浓度，参照下表计算加入5mg/ml Biotin-LC-NHS的体积。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of Biotin-LC-NHS Solution
0.5mg/ml	0.1ml	1μl
1.0mg/ml	0.1ml	2μl
1.5mg/ml	0.1ml	3μl
2.0mg/ml	0.1ml	4μl

2.5mg/ml	0.1ml	5 $\mu$ l
3.0mg/ml	0.1ml	6 $\mu$ l

- c. 在室温(约25°C)反应30-60分钟或者4°C反应2小时, 反应过程推荐在翘板摇床(也称侧摆摇床)上进行。推荐使用BeyoShaker™ 数字式翘板摇床(E6673)。也可以使用LCD数控型长轴旋转混匀仪(E1505), 推荐的速度为25rpm上下翻转。
- d. 脱盐柱的准备: 移去脱盐柱Desalting Column (5kDa MWCO, 0.5ml)的下堵头, 置于1.5ml离心管或2ml洗脱管中, 1,000  $\times$  g离心1分钟, 丢弃脱盐柱离心下来的保存溶液, 并重新把脱盐柱放回离心管中。使用非水平转头的情况下, 由于离心会使树脂压实形成一个向上的斜面, 该斜面的方向宜在后续步骤中保持, 所以在脱盐柱外壳上的斜面向上位置做标记, 在随后的离心步骤中需要调整好离心管的放入方向, 确保离心后斜面的方向和位置不会改变。
- e. 脱盐柱的预平衡: 向脱盐柱树脂顶部加入0.5ml 1X PBS以平衡脱盐柱, 1,000  $\times$  g离心1分钟, 丢弃溶液, 重复本步骤2-3次。
- f. 上样: 将脱盐柱放入新的1.5ml离心管中, 把步骤3c的样品(不能超过130 $\mu$ l)加入到树脂的中心位置, 使树脂吸入样品。  
注: 样品体积不要超过脱盐柱规定的样品量体积, 否则会降低样品回收率。
- g. 洗脱: 将脱盐柱1,000  $\times$  g离心2分钟, 流穿液含有纯化的生物素标记的生物大分子, 可以直接用于后续实验。如需保存, 请保存在合适的条件。注: 脱盐柱不适合重复使用。
- h. 检测: 后续可以使用辣根过氧化物酶标记Streptavidin (A0305)或碱性磷酸酯酶标记Streptavidin (A0312)检测生物素标记的生物大分子的标记效果。

### 3. 中量样品(不超过0.5ml, 蛋白浓度不超过3mg/ml)的生物素标记反应。

以下以样品体积为0.5ml为例, 其它样品体积可按比例调整。

- a. 将需要标记的0.5ml生物大分子转移到洁净的1.5ml离心管(FTUB306), 加入50 $\mu$ l新鲜配制的1M NaHCO<sub>3</sub>溶液。
- b. 根据样品浓度, 参照下表计算加入5mg/ml Biotin-LC-NHS的体积。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of Biotin-LC-NHS Solution
0.5mg/ml	0.5ml	5 $\mu$ l
1.0mg/ml	0.5ml	6 $\mu$ l
1.5mg/ml	0.5ml	8 $\mu$ l
2.0mg/ml	0.5ml	11 $\mu$ l
2.5mg/ml	0.5ml	13 $\mu$ l
3.0mg/ml	0.5ml	15 $\mu$ l

- c. 在室温(约25°C)反应30-60分钟或者4°C反应2小时, 反应过程推荐在翘板摇床(也称侧摆摇床)上进行。推荐使用BeyoShaker™ 数字式翘板摇床(E6673)。也可以使用LCD数控型长轴旋转混匀仪(E1505), 推荐的速度为25rpm上下翻转。
- d. 脱盐柱的准备: 移去脱盐柱Desalting Column (5kDa MWCO, 2ml)的下堵头, 置于15ml离心管中, 1,000  $\times$  g离心2分钟, 丢弃脱盐柱离心下来的保存溶液, 并重新把脱盐柱放回离心管中。使用非水平转头的情况下, 由于离心会使树脂压实形成一个向上的斜面, 该斜面的方向宜在后续步骤中保持, 所以在脱盐柱外壳上的斜面向上位置做标记, 在随后的离心步骤中需要调整好离心管的放入方向, 确保离心后斜面的方向和位置不会改变。
- e. 脱盐柱的预平衡: 向脱盐柱的树脂顶部加入1.5ml 1X PBS以平衡脱盐柱, 1,000  $\times$  g离心2分钟, 丢弃溶液, 重复本步骤2-3次。
- f. 上样: 将脱盐柱放入新的15ml离心管中, 把步骤3c的样品(不能超过0.5ml)加入到树脂的中心位置, 使树脂吸入样品。  
注: 如果样品体积<400 $\mu$ l, 在树脂吸入样品后再加入100 $\mu$ l超纯水可以增加样品回收率, 但同时会稀释标记样品的浓度。
- g. 洗脱: 将脱盐柱1,000  $\times$  g离心2分钟, 流穿液含有纯化的生物素标记的生物大分子, 可以直接用于后续的实验。如需保存, 请保存在合适的条件。注: 脱盐柱不适合重复使用。
- h. 检测: 后续可以使用辣根过氧化物酶标记Streptavidin (A0305)或碱性磷酸酯酶标记Streptavidin (A0312)检测生物素标记的生物大分子的标记效果。

### 4. 大量样品(不超过2.5ml, 蛋白浓度不超过3mg/ml)的生物素标记反应。

以下以样品体积为2ml为例, 其它样品体积可按比例调整。

- a. 将需要标记的2ml生物大分子转移到洁净的15ml离心管(FTUB515), 加入200 $\mu$ l新鲜配制的1M NaHCO<sub>3</sub>溶液。
- b. 根据样品浓度, 参照下表计算加入5mg/ml Biotin-LC-NHS的体积。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of Biotin-LC-NHS Solution
0.5mg/ml	2ml	20 $\mu$ l
1.0mg/ml	2ml	24 $\mu$ l
1.5mg/ml	2ml	32 $\mu$ l
2.0mg/ml	2ml	44 $\mu$ l
2.5mg/ml	2ml	52 $\mu$ l
3.0mg/ml	2ml	60 $\mu$ l

- c. 在室温(约25°C)反应30-60分钟或者4°C反应2小时, 反应过程推荐在翘板摇床(也称侧摆摇床)上进行。推荐使用BeyoShaker™

数字式翘板摇床(E6673)。也可以使用LCD数控型长轴旋转混匀仪(E1505)，推荐的速度为25rpm上下翻转。

- d. 脱盐柱的准备：移去脱盐柱Desalting Column (5kDa MWCO, 8ml)的下堵头，置于50ml离心管中，1,000×g离心2分钟，丢弃脱盐柱离心下来的保存溶液，并重新把脱盐柱放回离心管中。使用非水平转头的情况下，由于离心会使树脂压实形成一个向上的斜面，该斜面的方向宜在后续步骤中保持，所以在脱盐柱外壳上的斜面向上位置做标记，在随后的离心步骤中需要调整好离心管的放入方向，确保离心后斜面的方向和位置不会改变。注：脱盐柱 (5kDa MWCO, 8ml)放入50ml离心管内进行离心时，需要使用相应的适配器(Adaptor)，如12ml层析柱转50ml离心管适配器(FSA013)。
- e. 脱盐柱的预平衡：向脱盐柱的树脂顶部加入5ml 1X PBS以平衡脱盐柱，1,000×g离心2分钟，丢弃溶液，重复本步骤2-3次。
- f. 上样：将脱盐柱放入新的50ml离心管中，把步骤4c的样品(不能超过2.5ml)加入到树脂的中心位置，使树脂吸入样品。  
注：如果样品体积<1.8ml，在树脂吸入样品后再加入200µl超纯水可以增加样品回收率，但同时会稀释标记样品的浓度。
- g. 洗脱：将脱盐柱 1,000×g离心2分钟，流穿液含有纯化的生物素标记的生物大分子，可以直接用于后续的实验。如需保存，请保存在合适的条件。注：脱盐柱不适合重复使用。
- h. 检测：后续可以使用辣根过氧化物酶标记Streptavidin (A0305)或碱性磷酸酯酶标记Streptavidin (A0312)检测生物素标记的生物大分子的标记效果。

#### 参考文献：

1. Wilc hek M, Bayer EA. Methods Enzymol. 1990. 184:467-9.
2. Waqas B, Wu A, Yim E, Lipner SR. J Dermatolog Treat. 2022. 33(1):573-574.
3. Stabenfeldt SE, LaPlaca MC. Acta Biomater. 2011. 7(12):4102-8.
4. Bian ZM, Field MG, Elnor SG, Kahlenberg JM, Elnor VM. Exp Eye Res. 2018. 170:29-39.

#### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
E6673	BeyoShaker™数字式翘板摇床	1套
E1505	LCD数控型长轴旋转混匀仪	1台
A0305	辣根过氧化物酶标记Streptavidin	0.2/1/5ml
A0312	碱性磷酸酯酶标记Streptavidin	0.2ml
P0632S	生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)	0.3mg×10次
P0632M	生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)	1.3mg×10次
P0632L	生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)	6.6mg×10次
P0635S	脱硫生物素标记和Pull-Down试剂盒(Agarose Resin)	5次
P0637S	脱硫生物素标记和Pull-Down试剂盒(Magnetic Beads)	5次
P0371	生物素定量检测试剂盒(显色法)	100/500次
P0373	生物素定量检测试剂盒(荧光法)	100/500次
P2603	BeyoDesalt™ G-10 Spin脱盐柱	20/100个
P2605	BeyoDesalt™ G-10 Mini脱盐柱	5/20个
P2607	BeyoDesalt™ G-10 Midi脱盐柱	5/20个
P2609	BeyoDesalt™ G-10 Max脱盐柱	5/20个
P2613	BeyoDesalt™ G-25 Spin脱盐柱	20/100套
P2615	BeyoDesalt™ G-25 Mini脱盐柱	5/20个
P2617	BeyoDesalt™ G-25 Midi脱盐柱	5/20个
P2619	BeyoDesalt™ G-25 Max脱盐柱	5/20个
P2621	BeyoDesalt™ G-25脱盐柱(Superfine, 5ml)	1/5个
P2623	BeyoDesalt™ G-25脱盐柱(Fine, 70ml)	1/5个
P2627	BeyoDesalt™ 6FF Spin脱盐柱	20/100套
P2629	BeyoDesalt™ 6FF Mini脱盐柱	5/20个
P2631	BeyoDesalt™ 6FF Midi脱盐柱	5/20个
P2633	BeyoDesalt™ 6FF Max脱盐柱	5/20个
P2635	BeyoDesalt™ 6FF脱盐柱(Superfine, 5ml)	1/5个
P2637	BeyoDesalt™ 6FF脱盐柱(Fine, 70ml)	1/5个
C0221A	PBS	500ml
ST476	PBS (10X)	500ml