

DBCO快速标记试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P1281S	DBCO快速标记试剂盒	0.3mg×10次
P1281M	DBCO快速标记试剂盒	1.3mg×10次
P1281L	DBCO快速标记试剂盒	6.6mg×10次

产品简介:

- 碧云天研发生产的DBCO快速标记试剂盒, 即DBCO Quick Labeling Kit, 也称DBCO蛋白标记试剂盒(DBCO Protein Labeling Kit)、DBCO蛋白偶联试剂盒(DBCO 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DBCO快速标记的试剂盒。本试剂盒标记的蛋白、抗体等能在温和的条件下快速、高效、自发地偶联叠氮化物标记的(Azide-tagged)的生物分子, 以进行标记、追踪、纯化或分离, 可以用于蛋白-蛋白、蛋白-生物分子、DNA-蛋白的相互作用研究等, 是医学和生命科学研究中的重要工具。
- DBCO, 即Dibenzocyclooctyne或Dibenzylcyclooctyne, 中文名为二苯并氮杂环辛炔, 它与叠氮化物(Azide)是生物正交偶联时的配对联用化合物, 可以在生物体系中发生环张力促进的叠氮-炔环加成(Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC)反应, 该反应条件温和, 不需要任何催化剂, 不影响正常的生物过程, 在细胞或者复杂的细胞或组织裂解液中几乎没有脱靶标记[1, 2]。该反应是最常见的点击化学(Click chemistry)反应之一, 广泛应用于生物偶联和标记等, 是无催化剂生物连接的强有力工具。DBCO-NHS是一种具有胺反应活性的NHS酯试剂, 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DBCO化, 本试剂盒提供的DBCO-NHS包含有中等长度的间隔臂, 极大增加了被修饰分子与DBCO之间的长度, 降低了DBCO后续与Azide修饰分子结合的空间位阻, 这样标记产物对于Azide修饰分子有更好的结合效果。DBCO-NHS是最常用的DBCO化试剂之一, 可在pH7.0-9.0的缓冲液中与伯氨基(-NH₂)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DBCO-NHS标记的靶标[4]。
- 本试剂盒提供了标记试剂(DBCO-NHS)和用于纯化DBCO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DBCO快速标记试剂盒(P1281)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DBCO-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DBCO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
P1281S-1	DBCO-NHS	3mg
P1281S-2	无水溶剂	400μl
P1281S-3	NaHCO ₃	50mg
P1281S-4	Desalting Column (5kDa MWCO, 0.5ml)	10个
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P1281M-1	DBCO-NHS	7.5mg
P1281M-2	无水溶剂	1ml
P1281M-3	NaHCO ₃	100mg
P1281M-4	Desalting Column (5kDa MWCO, 2ml)	10个
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P1281L-1	DBCO-NHS	15mg
P1281L-2	无水溶剂	2ml
P1281L-3	NaHCO ₃	500mg
P1281L-4	Desalting Column (5kDa MWCO, 8ml)	10个
—	说明书	1份

保存条件：

Desalting Column 4°C保存，一年有效；其余-20°C保存，一年有效。DBCO-NHS 4°C保存，至少一个月有效。无水溶剂和NaHCO₃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溶解待标记分子。为提升标记效果，待DBCO标记的生物大分子的浓度不能太低。
- DBCO-NHS很容易受潮水解失活，保存时一定要注意保持干燥；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)或者铵离子，推荐使用碧云天脱盐柱(P2603/P2605/P2607/P2613/P2615/P2617)进行脱盐处理。
- 7.5mg/ml DBCO-NHS的配制：称量适量的DBCO-NHS，用试剂盒中的提供的无水溶剂进行溶解配制7.5mg/ml DBCO-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DBCO-NHS，充分溶解后即得7.5mg/ml DBCO-NHS，例如小包装中的3mg DBCO-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 NaHCO₃的配制：根据样品量配制适量的1M NaHCO₃溶液，如称取10mg NaHCO₃，加入119μl超纯水即得1M NaHCO₃溶液。NaHCO₃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：NaHCO₃溶液需现用现配。

2. 小量样品(不超过130μl，蛋白浓度不超过3mg/ml)的DBCO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 NaHCO₃溶液。
- 根据样品浓度，参照下表计算加入7.5mg/ml DBCO-NHS的体积。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of DBCO-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	5μl
3.0mg/ml	0.1ml	6μl

- 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×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×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2c的样品(不能超过130μl)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×g离心2分钟，流穿液含有纯化的DBCO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BeyoMag™ Azide Magnetic Beads (Azide磁珠) (ST441)检测DBCO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DBCO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50μl新鲜配制的1M NaHCO₃溶液。
- b. 根据样品浓度，参照下表计算加入7.5mg/ml DBCO-NHS的体积。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of DBCO-NHS Solution
0.5mg/ml	0.5ml	5μl
1.0mg/ml	0.5ml	6μl
1.5mg/ml	0.5ml	8μl
2.0mg/ml	0.5ml	11μl
2.5mg/ml	0.5ml	13μl
3.0mg/ml	0.5ml	15μl

- 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×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×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<400μl，在树脂吸入样品后再加入100μl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DBCO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BeyoMag™ Azide Magnetic Beads (Azide磁珠) (ST441)检测DBCO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DBCO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200μl新鲜配制的1M NaHCO₃溶液。
- b. 根据样品浓度，参照下表计算加入7.5mg/ml DBCO-NHS的体积。

Concentration of Biomolecule Solution	Volume of Biomolecule Solution	Volume of DBCO-NHS Solution
0.5mg/ml	2ml	20μl
1.0mg/ml	2ml	24μl
1.5mg/ml	2ml	32μl
2.0mg/ml	2ml	44μl
2.5mg/ml	2ml	52μl
3.0mg/ml	2ml	60μl

- 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DBCO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BeyoMag™ Azide Magnetic Beads (Azide磁珠) (ST441)检测DBCO标记的生物大分子的标记效果。

参考文献：

1. Manuel M, Wolfgang K, Philipp D, Elke H.H, Karl M. J Proteome Res. 2020. 19(5):2071-79.
2. John CJ, Ellen MS, Carolyn RB. J Am Chem Soc. 2010. 132(11):3688-90.
3. Stabenfeldt SE, LaPlaca MC. Acta Biomater. 2011. 7(12):4102-8.
4. Bian ZM, Field MG, Elner SG, Kahlenberg JM, Elner VM. Exp Eye Res. 2018. 170:29-39.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P0630S	Avi标签蛋白生物素标记试剂盒(BirA法)	20次
P0630M	Avi标签蛋白生物素标记试剂盒(BirA法)	100次
P0630L	Avi标签蛋白生物素标记试剂盒(BirA法)	500次
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
P0639S	FITC快速标记试剂盒	0.3mg×10次
P0639M	FITC快速标记试剂盒	1.3mg×10次
P0639L	FITC快速标记试剂盒	6.6mg×10次
P1251S	AF350快速标记试剂盒	5次
P1253S	AF488快速标记试剂盒	5次
P1256S	AF555快速标记试剂盒	5次
P1261S	AF594快速标记试剂盒	5次
P1265S	AF647快速标记试剂盒	5次
P1281S	DBCO快速标记试剂盒	0.3mg×10次
P1281M	DBCO快速标记试剂盒	1.3mg×10次
P1281L	DBCO快速标记试剂盒	6.6mg×10次
P1283S	Azide快速标记试剂盒	0.3mg×10次
P1283M	Azide快速标记试剂盒	1.3mg×10次
P1283L	Azide快速标记试剂盒	6.6mg×10次
P1285S	Alkyne快速标记试剂盒	0.3mg×10次
P1285M	Alkyne快速标记试剂盒	1.3mg×10次
P1285L	Alkyne快速标记试剂盒	6.6mg×10次