

生物素定量检测试剂盒(显色法)

产品编号	产品名称	包装
P0371S	生物素定量检测试剂盒(显色法)	100次
P0371M	生物素定量检测试剂盒(显色法)	500次

产品简介:

- 碧云天生产的生物素定量检测试剂盒(显色法), 即Biotin Quantitation Assay Kit (Colorimetric), 是基于生物素(Biotin)与链霉亲和素(Streptavidin)的亲合力强于HABA与Streptavidin的亲合力, 通过生物素、生物素标记的抗体或蛋白等的强竞争使HABA与Streptavidin解离, 导致HABA与Streptavidin结合时500nm处吸光度(A_{500})的降低, 从而定量检测抗体或蛋白等被生物素标记水平或样品中生物素浓度的试剂盒。
- 生物素定量检测试剂盒, 也被称为生物素标记定量检测试剂盒(Biotin Labeling Quantitation Assay Kit)、生物素化水平检测试剂盒(Biotinylation Level Assay Kit)或生物素标记效率检测试剂盒(Biotin Labeling Efficiency Assay Kit)。
- HABA, 即4-Hydroxyazobenzene-2'-carboxylic Acid, 中文名称为4'-羟基偶氮苯-2-羧酸, 是一种小分子化合物, CAS号为1634-82-8, 分子式为 $C_{13}H_{10}N_2O_3$, 分子量为242.23, 是一种能与链霉亲和素发生弱相互作用的染料。游离的HABA在356nm处吸光度有最大吸收峰, 当HABA与链霉亲和素(Streptavidin)或亲和素(Avidin)结合形成复合物后产生红移现象, 其最大吸收峰红移至500nm处。与生物素和链霉亲和素的高亲和力($K_d=1 \times 10^{-15}M$)相比, HABA和链霉亲和素的亲和力较弱($K_d=5.8 \times 10^{-6}M$), 所以当溶液中存在生物素时, 生物素会强竞争使HABA与链霉亲和素解离, 导致HABA与Streptavidin结合时500nm处的吸光度降低。因此HABA常用于测定抗体或蛋白等被生物素化程度, 吸光度与样品的生物素摩尔量成负相关(图1) [1-2], 即吸光度越低, 抗体或蛋白的生物素化越高。

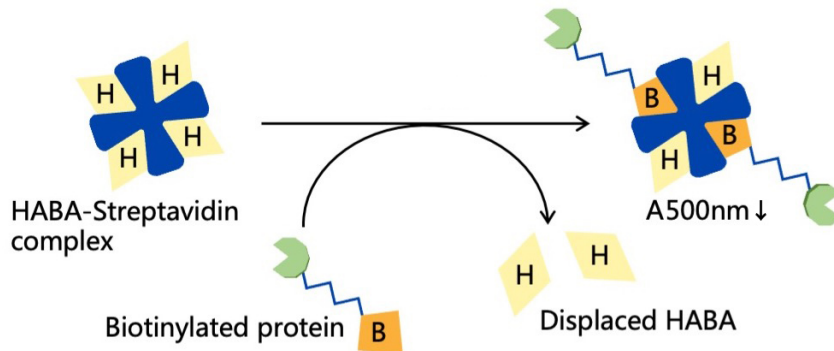


图1. 碧云天生物素定量检测试剂盒(显色法)(P0371)的工作原理图。

- 本试剂盒定量检测抗体或蛋白被生物素标记的水平是基于比尔-朗伯定律(Beer-Lambert law), 又称比尔定律或比耳定律(Beer's law), 即当一束平行单色光垂直通过某一均匀非散射的吸光物质时, 其吸光度(Absorbance, A)与吸光物质的浓度(Concentration, C)及吸收层厚度(length, L)成正比, 用公式表示为: $A = \epsilon \times C \times L$ [3]。当使用HABA进行生物素定量实验时, A是样品在500nm波长(λ)处的吸光度(无单位); ϵ 是500nm波长(λ)处的吸收系数或消光系数, HABA与Streptavidin复合物消光系数为 $34500M^{-1}cm^{-1}$; C为用摩尔浓度表示的样品浓度(mol/l或mmol/ml); L为路径长度, 根据推荐的反应体积(200 μ l)及标准平底96孔板(FPT010/FPT011)进行实验时, L为固定数值0.5cm。
- 本试剂盒操作简单, 检测速度快, 完成检测仅需约5分钟, 不仅适合少量样本的检测, 也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。
- 碧云天提供‘生物素定量计算表格’下载, 只需输入 A_{500} 测定数值、生物素标记的抗体或蛋白的分子量、浓度和稀释倍数, 即可自动得到生物素与抗体或蛋白的摩尔比, 即每个抗体或蛋白被生物素标记的个数, 计算方便、快速。
- 按照每孔200 μ l反应体系, 本试剂盒检测生物素浓度的下限为2 μ M (400pmol), 通常每孔需要5-20 μ g生物素标记的抗体或蛋白。如果待检测样品总量有限或浓度较低(例如: 生物素标记的多肽、DNA或RNA), 推荐使用荧光法的生物素定量检测试剂盒(P0373), 荧光法相比于显色法的灵敏度提高约50倍, 按照每孔反应体系为100 μ l, 检测生物素浓度的下限为40nM (4pmol), 通常每孔需要50ng-1 μ g生物素标记的抗体或蛋白或5-100pmol生物素标记的多肽、DNA或RNA。
- 按使用说明操作, 本试剂盒小包装可以检测100个样品, 中包装可以检测500个样品。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
------	------	----

P0371S-1	HABA/Streptavidin Premix	2ml
P0371S-2	Reaction Buffer	20ml
P0371S-3	Biotin Standard (500μM)	1ml
P0371S-4	Biotin-BSA (Positive Control)	200μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0371M-1	HABA/Streptavidin Premix	10ml
P0371M-2	Reaction Buffer	100ml
P0371M-3	Biotin Standard (500μM)	5ml
P0371M-4	Biotin-BSA (Positive Control)	500μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。

注意事项：

- Reaction Buffer在-20°C保存后融化如果有沉淀析出，可37°C水浴加热直至完全溶解。
- 所有试剂需完全解冻并平衡至室温后再使用，使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒要求的条件保存。
- Biotin-BSA (Positive Control)仅作为生物素标记的阳性对照，不提供具体的生物素标记数量。
- 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. 生物素标记或生物素的定量检测。

- 将HABA/Streptavidin Premix、待测生物素标记的抗体或蛋白样品或含有生物素的样品平衡至室温。
- 将160μl Reaction Buffer，20μl HABA/Streptavidin Premix依次加至96孔平底板(FPT010/FPT011)，轻轻混匀，避免起泡。
- 使用具有检测500nm吸光度功能的酶标仪进行吸光度检测，此数值记录为A₅₀₀ HABA/Streptavidin (A₅₀₀ H/S)。
- 将96孔平底板从酶标仪中取出，向不同孔中分别加入20μl的Biotin-BSA (Positive control)、Reaction Buffer (Negative control)或样品，轻轻混匀，避免起泡。
- 再次使用具有检测500nm吸光度功能的酶标仪进行吸光度检测，此数值记录为A₅₀₀ HABA/Streptavidin/Biotin (A₅₀₀ H/S/B)。

注：如果A₅₀₀ H/S/B<0.25，建议用Reaction Buffer对生物素标记的抗体或蛋白进行稀释后再次检测；如果A₅₀₀ H/S/B>0.9，建议对生物素标记的抗体或蛋白进行浓缩后再次检测。

2. 生物素标记或生物素的直接定量计算。

- 计算加入样品前后HABA/Streptavidin Premix 500nm吸光度的差值：

$$\Delta A_{500} = A_{500} \text{ H/S} - A_{500} \text{ H/S/B}$$

- 计算反应体系中Biotin的摩尔浓度(mM)：

$$\text{Biotin (mM)} = \frac{\text{Biotin (nm)}}{\text{Reaction mixture (ml)}} = \frac{\Delta A_{500}}{34500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 0.5 \text{ cm}}$$

注1：HABA/Streptavidin复合物在500nm吸光度的消光系数为34,500M⁻¹cm⁻¹。

注2：通常96孔平底板200μl溶液的光路长度为0.5cm。

- 碧云天提供 ‘生物素定量计算表格’ 下载，只需输入各项数值，就可自动得到生物素/抗体或蛋白的摩尔比。如果是生物素标记抗体或蛋白，计算被生物素标记的抗体或蛋白的摩尔浓度(mM)：

$$\text{Protein (mM)} = \frac{\text{Protein concentration (mg/ml)}}{\text{Molecular Weight of protein (Da)}}$$

注：Protein concentration (mg/ml)指未经过任何稀释被测抗体或蛋白的浓度。如果蛋白浓度不知道，可以不进行计算。

- 如果是生物素标记抗体或蛋白，计算生物素/抗体或蛋白的摩尔比(计算所得数值即为每个抗体或蛋白被标记生物素的平均个数)：

$$\frac{\text{Biotin (mM)}}{\text{Protein (mM)}} = \frac{\text{Biotin (mM)} \times 10 \times \text{Dilution factor}}{\text{Protein (mM)}}$$

注1：‘10’指20μl样品加入到180μl反应液(步骤1d)后被稀释了10倍。

注2：Dilution factor指因初始时生物素标记的抗体或蛋白浓度过高导致A₅₀₀ H/S/B<0.25，而额外对生物素标记的抗体或蛋白进行稀释的倍数。

- 计算示例：

BSA: MW 66430Da, concentration 2.6mg/ml, A₅₀₀H/S=0.8693, A₅₀₀H/S/B=0.6227

$$(a) \text{ Protein (mM)} = \frac{\text{protein concentration (mg/ml)}}{\text{MW of protein (mg/mmol)}} = \frac{2.6 \text{ (mg/ml)}}{66430 \text{ (mg/mmol)}} = 3.9 \times 10^{-5}$$

$$(b) \Delta A_{500} = A_{500} \text{ H/S} - A_{500} \text{ H/S/B} = 0.8693 - 0.6227 = 0.2466$$

$$(c) \text{ Biotin (mM)} = \frac{\text{Biotin (nm)}}{\text{Reaction mixture (ml)}} = \frac{\Delta A_{500}}{34500 \text{ M}^{-1} \times 0.5 \text{ cm}} = \frac{0.2466}{34500 \text{ M}^{-1} \times 0.5 \text{ cm}} = 1.429 \times 10^{-5}$$

$$(d) \frac{\text{Biotin (mM)}}{\text{Protein (mM)}} = \frac{\text{Biotin (mM)} \times 10 \times \text{dilution factor}}{\text{Protein (mM)}} = \frac{1.429 \times 10^{-5} \times 10 \times 1}{3.9 \times 10^{-5}} = 3.65 \text{ biotin molecules per BSA molecule}$$

3. 生物素标记或生物素的定量检测和计算(Biotin标准曲线法)。为避免可能的消光系数和光径的差错，可以尝试Biotin标准曲线法。

- 将HABA/Streptavidin Premix、Biotin Standard (500 μ M)和待测生物素标记的抗体或蛋白样品平衡至室温。
- Biotin标准曲线组**：分别取0、1、2、4、6、8、10、12、14、16 μ l的Biotin Standard (500 μ M)溶液加至96孔平底板(FPT010/FPT011)，并用Reaction Buffer补足至20 μ l，然后每孔依次加入160 μ l Reaction Buffer，20 μ l HABA/Streptavidin Premix，轻轻混匀，避免起泡。此时，Biotin标准曲线的Biotin浓度和物质的量分别为0、2.5、5、10、15、20、25、30、35、40 μ M和0、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8nmol。
- 样品组**：将20 μ l样品，160 μ l Reaction Buffer，20 μ l HABA/Streptavidin Premix加至96孔平底，轻轻混匀，避免起泡。
- 使用具有检测500nm吸光度功能的酶标仪进行吸光度检测，记录A₅₀₀读值。Biotin浓度为0的孔记为空白对照(Blank Control)：A₅₀₀ Blank Control，Biotin标准曲线组记为A₅₀₀ Biotin Standard，样品组记为A₅₀₀ Sample。
注：如果A₅₀₀ Sample < 0.25，建议用Reaction Buffer对生物素标记的抗体或蛋白进行稀释后再次检测；如果A₅₀₀ Sample > 0.9，建议对生物素标记的抗体或蛋白进行浓缩后再次检测。
- 以Biotin物质的量(nmol)为X轴， $\Delta A_{500} \text{ Biotin Standard} = A_{500} \text{ Blank Control} - A_{500} \text{ Biotin Standard}$ 为Y轴，建立标准曲线(直线线性关系)(如图2所示)，拟合得到公式。

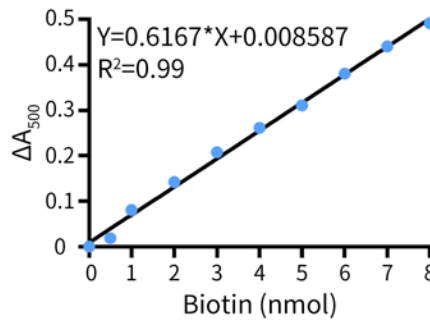


图2. 碧云天生物素定量检测试剂盒(显色法) (P0371)的Biotin标准曲线示意图。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- 将 $\Delta A_{500} \text{ Sample} = A_{500} \text{ Blank Control} - A_{500} \text{ Sample}$ 作为Y值代入拟合得到的公式，求解得到的X值即为每个孔中含有生物素(Biotin)物质的量(nmol)。
- 计算样品中生物素标记或生物素的浓度(μ M):

$$\text{Sample } (\mu\text{M}) = \frac{\text{Sample (nmol)}}{20\mu\text{l}} \times 10^3$$
 注：20 μ l为样品体积。

参考文献：

- Brattbauer GL. Methods Mol Biol. 2010. 588:257-70.
- Hofstetter H, Morpurgo M, Hofstetter O, Bayer EA, Wilchek M. Anal Biochem. 2000. 284(2):354-66.
- Johann Heinrich Lambert. Beer-Lambert Law. Comprehensive Biotechnology (Second Edition). 2011.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
A0277	生物素标记山羊抗兔IgG(H+L)	1ml
A0279	生物素高效标记山羊抗兔IgG(H+L)	0.5ml
A0286	生物素标记山羊抗小鼠IgG(H+L)	1ml
A0288	生物素高效标记山羊抗小鼠IgG(H+L)	0.5ml
A0308	Biotin标记辣根过氧化物酶	0.2ml
D3106	生物素3'末端DNA标记试剂盒	20次
D3118	生物素随机引物DNA标记试剂盒	10次
P0371S	生物素定量检测试剂盒(显色法)	100次
P0371M	生物素定量检测试剂盒(显色法)	500次
P0373S	生物素定量检测试剂盒(荧光法)	100次

P0373M	生物素定量检测试剂盒(荧光法)	500次
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
P2151-1ml	BeyoMag™ Streptavidin Magnetic Beads (链霉亲和素磁珠)	1ml
P2151-200μl	BeyoMag™ Streptavidin Magnetic Beads (链霉亲和素磁珠)	200μl
P2151-5ml	BeyoMag™ Streptavidin Magnetic Beads (链霉亲和素磁珠)	5ml
P5084-1mg	Recombinant Streptavidin	1mg
P5084-5mg	Recombinant Streptavidin	5mg
P5084-20mg	Recombinant Streptavidin	20mg
P5084-100mg	Recombinant Streptavidin	100mg
ST2051-1g	D-Biotin (≥98%, Reagent grade)	1g
ST2051-5g	D-Biotin (≥98%, Reagent grade)	5g
ST2051-25g	D-Biotin (≥98%, Reagent grade)	25g
ST2051-100g	D-Biotin (≥98%, Reagent grade)	100g

Version 2024.01.15