

生物素定量检测试剂盒(荧光法)

产品编号	产品名称	包装
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

产品简介:

- 碧云天生产的生物素定量检测试剂盒(荧光法), 即Biotin Quantitation Assay Kit (Fluorometric), 是基于荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术, 通过生物素(Biotin)的强竞争使淬灭剂HABA与FITC荧光染料标记的Streptavidin解离, 导致在激发光(Excitation, Ex) 492nm/发射光(Emission, Em) 520nm处的荧光值升高, 从而定量检测蛋白、多肽、DNA、RNA或小分子化合物等被生物素标记的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C₁₃H₁₀N₂O₃, 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。荧光染料(Fluorescent dye, F)标记的Streptavidin与HABA (Quencher, Q)形成复合物, 因为荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET), Streptavidin上标记的荧光基团被淬灭(左)。与生物素和链霉亲和素的高亲和力(K_d=1×10⁻¹⁵M)相比, HABA和链霉亲和素的亲和力较弱(K_d=5.8×10⁻⁶M), 所以生物素、生物素标记的蛋白、多肽、DNA、RNA或小分子化合物等可通过强竞争置换HABA, 导致激发光(Excitation, Ex) 492nm/发射光(Emission, Em) 520nm的荧光值升高, 荧光值与样品的生物素摩尔量成正相关(图1) [1-2], 即荧光信号越强, 样品的生物素化越高。

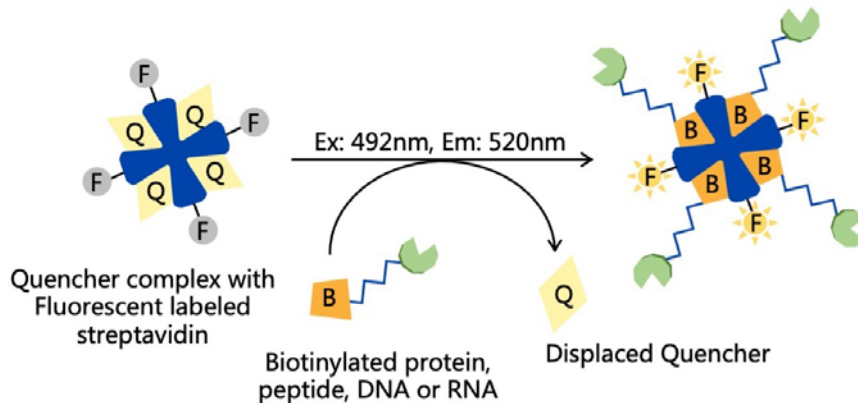


图1. 碧云天生物素定量检测试剂盒(荧光法) (P0373)的工作原理图。

- **本试剂盒应用范围宽。**不仅可以检测生物素标记的蛋白, 也可以检测生物素标记的多肽、DNA、RNA或小分子化合物以及样品中的生物素浓度。
- **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。
- **本试剂盒灵敏度高。**按照每孔100μl反应体系, 本试剂盒检测生物素浓度的下限为40nM (4pmol), 通常每孔仅需要50ng-1μg生物素标记的蛋白或5-100pmol生物素标记的多肽、DNA、RNA或小分子化合物, 荧光法相比于显色法(P0371)的灵敏度提高约50倍。
- 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
P0373S-1	HABA/Streptavidin-FITC Premix	5ml
P0373S-2	Reaction Buffer	10ml
P0373S-3	Biotin Standard (5μM)	1ml
P0373S-4	Biotin-BSA (Positive Control)	200μl
P0373S-5	Protease (0.1U/μl)	100μl

—	说明书	1份
---	-----	----

产品编号	产品名称	包装
P0373M-1	HABA/Streptavidin-FITC Premix	25ml
P0373M-2	Reaction Buffer	50ml
P0373M-3	Biotin Standard (5 μ M)	5ml
P0373M-4	Biotin-BSA (Positive Control)	500 μ l
P0373M-5	Protease (0.1U/ μ l)	500 μ l
—	说明书	1份

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存，一年有效。其中HABA/Streptavidin-FITC Premix须避光保存。

注意事项：

- Reaction Buffer在-20 $^{\circ}$ C保存后融化若有沉淀析出，可37 $^{\circ}$ 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。
- 检测时建议使用96孔黑板，推荐选购碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)。
- 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. Biotin标准曲线的设置。

- a. 分别取0、1、2、4、6、8、10、12、14、16 μ l的Biotin Standard (5 μ M)溶液加入96孔板中，并用Reaction Buffer补足至50 μ l，此时标准品Biotin浓度为0、100、200、600、400、1000、1200、1400、1600nM。
- b. 每孔加入50 μ l HABA/Streptavidin-FITC Premix，此时反应体系中的Biotin量分别为0、5、10、20、30、40、50、60、70、80pmol。
- c. 避光，室温静置5分钟。
- d. 使用多功能酶标仪进行荧光测定，激发光(Excitation)为492nm，发射光(Emission)为520nm。

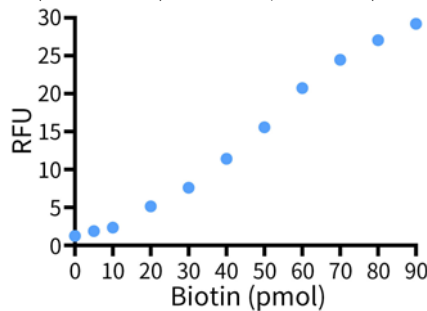


图2. 碧云天生物素定量检测试剂盒(荧光法) (P0373)的Biotin标准曲线示意图。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

2. 蛋白酶消化被生物素标记的蛋白样品(选做)。

蛋白酶消化可以使蛋白样品三级结构被破坏，内部生物素基团充分暴露，从而提高生物素定量的准确性。

- a. 取49 μ l蛋白样品，如果蛋白样品浓度过高，可以用Reaction Buffer对蛋白样品进行适当稀释。
注：可设置Biotin-BSA阳性对照，取25 μ l Biotin-BSA (Positive Control)，加入Reaction Buffer补足至49 μ l。
- b. 每个样品分别加入1 μ l Protease (0.1U/ μ l)，37 $^{\circ}$ C消化过夜。

3. 生物素或生物素标记的定量检测。

- a. 阳性对照：将5 μ l Biotin-BSA (Positive Control)加入到96孔板中，用Reaction Buffer补足至50 μ l，或将步骤2中经50 μ l Protease消化过夜的Biotin-BSA (Positive Control)样品加入96孔板中。
- b. 将50 μ l样品或步骤2中经Protease消化过夜的蛋白样品加入96孔板中，如果样品不足50 μ l，用Reaction Buffer补足至50 μ l，并记录加入样品的体积为 V_{Sample} 。
- c. 各孔加入50 μ l HABA/Streptavidin-FITC Premix，避光，室温静置5分钟。
- d. 使用多功能酶标仪进行荧光测定，激发光(Excitation)为492nm，发射光(Emission)为520nm。
注1：为提高生物素定量的准确性，建议每个样品做3组平行检测。
注2：因蛋白酶可能会影响反应，静置时间不应超过15分钟。

4. 生物素或生物素标记的定量计算。

- a. 标准曲线法(二选一)：以Biotin物质的量为X轴，多功能酶标仪读取荧光值(Relative fluorescence unit, RFU)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。

- b. 两点法(二选一): 根据RFU_{Sample} 数值选择两个数值相近的RFU_{Biotin Standard} 建立直线线性关系, 拟合得到公式。例如: RFU_{Sample} 为8, 与之数值相近的30pmol和40pmol Biotin Standard的RFU分别为7.59和11.44, 根据这两点拟合得到公式 Y=0.385X-3.96。

注1: HABA/Streptavidin-FITC Premix本底有一定的荧光值, 因此未加Biotin Standard的RFU_{Blank Control}不为0是正常现象, 并不影响后续计算。

注2: RFU_{Sample} 无需减去RFU_{Blank Control}。

注3: 当检测读数在两个标准品读数之间时, 使用这两个标准品采用 ‘两点法’ 比 ‘标准曲线法’ 的计算结果通常更为准确。

- c. 将RFU_{Sample} 作为Y值代入公式, 求解得到的X值即为每个孔中含有生物素(Biotin)物质的量(pmol), 同时可以计算出生物素或生物素标记的浓度。
- d. 计算被生物素标记的蛋白、多肽、DNA、RNA或小分子化合物等的物质的量(pmol):

$$\text{Sample (pmol)} = \frac{\text{Sample concentration (mg/ml)}}{\text{Molecular Weight of Sample (Da)}} \times V_{\text{Sample}} (\mu\text{l}) \times 10^6$$

注: Sample concentration (mg/ml)指未经过任何稀释待测样品的浓度。

- e. 计算生物素/蛋白、多肽、DNA、RNA或小分子化合物等的摩尔比(Degree of labeling, DOL):

$$\text{DOL} = \frac{\text{Biotin (pmol)}}{\text{Sample (pmol)}}$$

注: 计算所得数值即为每个蛋白、多肽、DNA、RNA或小分子化合物等被生物素标记的平均个数。

- f. 计算示例:

BSA: MW 66,430Da, concentration 0.1mg/ml, RFU_{Sample}=8

(a) 根据两点法拟合得到公式 Y=0.385X-3.96, 8=0.385X-3.96, X=Biotin (pmol)= 31 pmol

(b) Sample (pmol) = $\frac{\text{Sample concentration (mg/ml)}}{\text{Molecular Weight of Sample (Da)}} \times V_{\text{Sample}} (\mu\text{l}) \times 10^6 = \frac{0.1 \text{ (mg/ml)}}{66430 \text{ (mg/mmol)}} \times 5 (\mu\text{l}) \times 10^6 = 7.52 \text{ pmol}$

(c) DOL = $\frac{\text{Biotin (pmol)}}{\text{Sample (pmol)}} = \frac{31 \text{ pmol}}{7.52 \text{ pmol}} = 4.1 \text{ Biotin molecules per BSA molecule}$

参考文献:

1. Brattbauer GL. Methods Mol Biol. 2010. 588:257-70.
2. Hofstetter H, Morpurgo M, Hofstetter O, Bayer EA, Wilchek M. Anal Biochem. 2000. 284(2):354-66.

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 ($\geq 98\%$, Reagent grade)	25g
ST2051-100g	D-Biotin ($\geq 98\%$, Reagent grade)	100g

Version 2024.02.29