

生物素定量检测试剂盒(荧光法)

产品货号: BA2986

产品规格: 100T/500T

产品说明:

乐业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 $C_{13}H_{10}N_2O_3$, 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。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($K_d=1 \times 10^{-15}M$)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), 即荧光信号越强, 样品的生物素化越高。

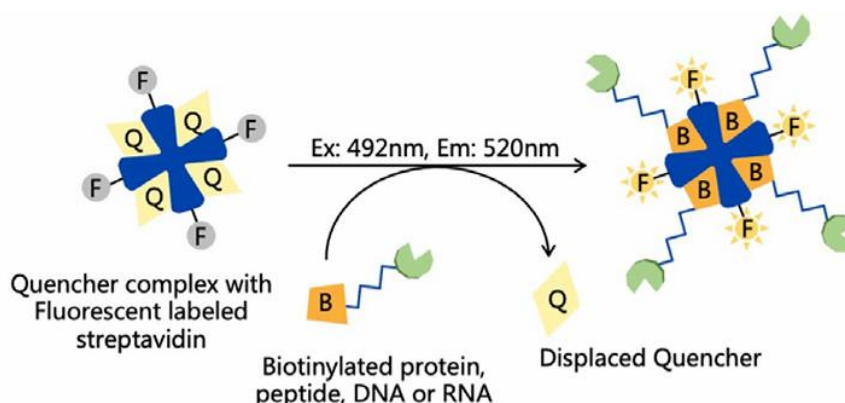


图1. 乐业生物素定量检测试剂盒(荧光法) 的工作原理图。

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100 μ l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-1 μ g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。

产品组成:

试剂名称	100T	500T	保存条件
HABA/Streptavidin-FITC Premix	5ml	25ml	-20°C, 避光



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

Reaction Buffer	10ml	50ml	-20°C
Biotin Standard (5μM)	1ml	5ml	-20°C
Biotin-BSA (Positive Control)	200μl	500μl	-20°C
Protease (0.1U/μl)	100μl	500μl	-20°C

注意事项:

1. Reaction Buffer 在-20°C 保存后融化若有沉淀析出, 可 37°C 水浴加热直至完全溶解。
2. 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。
3. 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。
4. 检测时建议使用 96 孔黑板。
5. 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。
6. 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、16μl 的 Biotin Standard (5μM)溶液加入 96 孔板中, 并用 Reaction Buffer 补足至 50μl, 此时标准品 Biotin 浓度为 0、100、200、400、600、800、1000、1200、1400、1600nM。
 - b. 每孔加入 50μl 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。

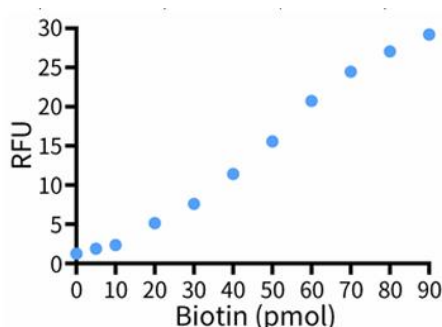


图 2. 乐业生物素定量检测试剂盒(荧光法)的 Biotin 标准曲线示意图。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

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 49μl 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 25μl Biotin-BSA (Positive Control), 加入 Reaction Buffer 补足至 49μl。
 - b. 每个样品分别加入 1μl Protease (0.1U/μl), 37°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 5μl Biotin-BSA (Positive Control)加入到 96 孔板中, 用 Reaction Buffer 补足至 50μl, 或将步骤 2 中经 50μl Protease 消化过夜的 Biotin-BSA (Positive Control)样品加入 96 孔板中。
 - b. 将 50μl 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 50μl, 用 Reaction Buffer 补足至 50μl, 并记录加入样品的体积为 V_{Sample} 。
 - c. 各孔加入 50μl 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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 $Y=0.385X-3.96$, $8=0.385X-3.96$, $X=\text{Biotin (pmol)}=31\text{pmol}$

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

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

保存条件:

-20°C 保存, 一年有效。其中 HABA/Streptavidin-FITC Premix 须避光保存。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com