

一. 概述

采用生物素-亲和素系统 (Biotin-Avidin-System, BAS) 制备生物素标记的蛋白质, 可用于酶免疫分析 (EIA) 等免疫学的测定、组织染色等诸多领域。由于抗体和酶经过生物素的标记能保持原有生物活性, 利用亲和素与生物素结合具有高亲和性 ( $K_a=10^{15}M^{-1}$ ) 的特点, 能够降低背景和提高检测灵敏度。

一般而言, 生物素适合标记针对各种抗原的第一抗体(一抗) 和抗IgG、IgM抗体等的第二抗体(二抗)。利用生物素标记抗体进行抗原抗体反应后, 与酶标记(辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等) 或荧光标记 (FITC等) 的亲和素、链霉亲和素反应, 然后检测吸光度或荧光。

生物素通过化学修饰能够与蛋白(抗体等) 的官能团结合。由于亲和素和生物素的结合部位在深处, 在大分子上标记生物素时, 偶尔会出现和亲和素结合的阻碍, 通过改造生物素变成长臂生物素, 能够避免与亲和素结合的阻碍。

生物素标记试剂按照标记对象划分, 通常有如下3种。

1. 琥珀酰亚胺生物素 (Succinimidyl Biotin)  
在分子内具有活性酯, 与赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基等游离氨基结合, 适用于标记蛋白质的氨基部位。
2. 马来酰亚胺型生物素 (Maleimide-type Biotin)  
与半胱氨酸等的巯基结合, 适用于标记蛋白质的巯基部位或巯基化合物。
3. 肼基型生物素 (Hydrazido-type Biotin)  
与糖的还原末端的醛基结合, 适用于标记蛋白质、糖等大分子的醛基部位。

本章主要介绍利用这些试剂(盒) 制备生物素标记抗体的方法。

二. 用Biotin Labeling Kit-NH<sub>2</sub>标记 (货号: LK03)

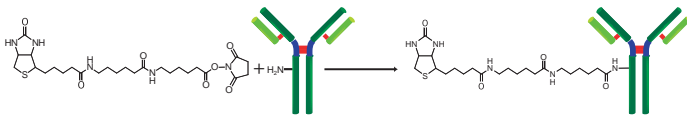


图1. 生物素标记IgG氨基部位的机理

. 试剂盒内含

1个sample可以标记50-200  $\mu$ g的靶分子:

- NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin ..... 3 管
- WS Buffer ..... 4 ml  $\times$  1 瓶
- Reaction Buffer ..... 0.5 ml  $\times$  1 管
- 过滤管 ..... 3 只

. 储存条件

试剂盒在0-5  $^{\circ}C$  保存。NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin开封后, 在-20  $^{\circ}C$  保存。

. 注意事项

1. 用本试剂盒标记的蛋白质的分子量要 $>50,000$ 。
2. 在标记过程中, IgG或者Biotin-IgG标记物始终存在于过滤管的滤膜上。
3. 如果IgG溶液中含有分子量 $>10,000$ 的其他蛋白质, 如BSA或明胶时, 在使用该试剂盒标记前, 先要纯化IgG溶液。IgG溶液能够用IgG Purification Kits (不包含于本试剂盒中) 来纯化。
4. 如果IgG溶液含有小的不溶物, 离心后取上清液来进行标记。
5. 1管NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin可以标记50~200  $\mu$ g蛋白质。

. 所需的设备和材料

1. 微型离心机
2. 10  $\mu$ l和100~200  $\mu$ l移液器
3. 37  $^{\circ}C$  培养箱
4. 微量管

. 操作步骤



将100  $\mu$ l WS Buffer以及含有100  $\mu$ g IgG的样品溶液加入到过滤管中。<sup>a)</sup>



在8,000-10,000  $\times$  g离心10 min。<sup>b)</sup>



将10  $\mu$ l DMSO加入到NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin中并用移液器吹打使其溶解。<sup>c)</sup>



将100  $\mu$ l Reaction Buffer以及8  $\mu$ l NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin溶液加入到过滤管中, 吹打使其混合。<sup>d)</sup>



将过滤管放入培养箱中, 在37  $^{\circ}C$  培养10 min。



6 将100 μl WS Buffer加入到过滤管中，在8,000-10,000 × g 离心10 min，<sup>b)</sup>除去滤液。



7 将200 μl WS Buffer加入到过滤管中，在8,000-10,000 × g 离心10 min，<sup>b)</sup>重复该步骤一次。



8 将200 μl WS Buffer加入到过滤管中吹打10-15次来回回收标记产物。<sup>e)</sup>将该溶液转移到微量管中，在0-5 °C下保存。

- 样品溶液的体积不应超过100 μl。如果蛋白质浓度低于0.5 mg/ml，重复操作步骤1和2直至总的蛋白质聚积量达到50~200 μg。如果聚积过程中滤液的体积超过400 μl，则在进行后续的离心操作前应除去滤液。
- 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin在管子的底部，向管底加入10 μl DMSO，吹打数次使其溶解。
- 如果蛋白质的量为200 μg，在操作步骤4时加入所有的NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin-DMSO溶液。
- 并不一定要使用WS Buffer来回回收标记产物，可以选择任何适合于该实验的缓冲液来替代。

### 三. 用氨基标记生物素进行标记

#### . 试剂

Biotin-OSu (货号：B304)；Biotin-AC<sub>5</sub>-OSu (货号：B305)；Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub>-OSu (货号：B306)；  
10 mmol/l Bicine Buffer (pH 8.5)  
DMSO  
NAP-5 (GE Healthcare公司)  
PBS (pH 7.4) (8.0 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

#### . 操作步骤

- 参照下表配制50 mmol/l的生物素标记试剂溶液：

生物素标记试剂	溶解方法(50 mmol/l)
Biotin-OSu	3.4 mg/DMSO 200 μl
Biotin-AC <sub>5</sub> -OSu	4.5 mg/DMSO 200 μl
Biotin-(AC <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> -OSu	5.7 mg/DMSO 200 μl

\*由于生物素标记试剂遇水易分解，所以需要现配现用。

### 2. 蛋白质的生物素标记操作方法

- 用10 mmol/l Bicine Buffer (pH 8.5) 溶解蛋白质，制成蛋白质溶液。
  - 在蛋白质溶液中加入配制好的生物素标记试剂溶液，蛋白质：生物素标记试剂的混合摩尔比为1:2~1:10。
  - 充分混合后，在水浴恒温摇床 (25 °C) 中培养2~4 h。
- #### 3. 标记蛋白质的凝胶过滤及纯化。
- 打开层析柱上的盖子，弃去填充液。
  - 打开层析柱出口的盖子，用PBS分数次洗脱，每根层析柱收集大约10 ml的洗脱液，使凝胶平衡。
  - 用移液器吸取500 μl标记好的蛋白质溶液加入到层析柱中，弃去此时的流出液。
  - 在层析柱的出口处放置一个2 ml的样品管，在层析柱中加入1ml PBS，收集流出的生物素标记蛋白质。

### 四. 用Biotinylation Kit (Sulfo-OSu) 中的生物素标记 (货号：BK01)

#### . 试剂盒内含

Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu (生物素试剂) ..... 10 mg × 4 管  
NaHCO<sub>3</sub>粉末 ..... 4 瓶  
PBS Table ..... 4 片  
Gel Filtration Column ..... 4 根  
样品管 ..... 8 只

#### . 注意事项

- 本试剂盒请在0~5 °C 储存。
- Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu溶液需要现配现用 (由于Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu易水解，尽量避免在水溶液的状态保存)。
- 标记好的蛋白质请在0~5 °C 保存 (加入0.1%的叠氮钠等防腐剂)。

#### . 操作步骤

- 配制溶液
  - NaHCO<sub>3</sub>缓冲液  
在含有NaHCO<sub>3</sub>粉末的容器中加入10 ml超纯水溶解。
  - PBS缓冲液  
在100 ml容量瓶中加入1 片PBS，先用少量超纯水溶解后，再用超纯水补充至100 ml，制成10 mmol/l的PBS缓冲液。
  - 蛋白质溶液  
在样品管中精确称量1.0~5.0 mg蛋白质并记录称量值后，用移液器加入500 μl操作步骤1)中的NaHCO<sub>3</sub>缓冲液。盖上盖子后，用漩涡振荡器等搅拌溶解蛋白质。

4) Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu溶液

在1支含有Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu的管子中加入适量纯水溶解。为了控制标记率，根据不同的标记对象，请参考表1调整Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu溶液的浓度及加入量。

\* 由于Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu易水解，溶解后请尽快标记。

2. 生物素标记操作方法

- 1) 请参考表1在配制好的蛋白质溶液中加入合适浓度和用量的Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu溶液。
- 2) 盖紧盖子充分混合后，在25℃水浴恒温摇床中培养2 h。

表1 Biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub> Sulfo-OSu标记各种蛋白质的标记率

蛋白质	MW	蛋白质溶液浓度	生物素溶液		混合比 <sup>a)</sup>	标记 <sup>b)</sup> (mol/mol)
			浓度	加入量(μl)		
rProtein A	42,000	5 mg/500 μl	10 mg/355 μl	5.7	2.0	1.8
				14.3	5.0	4.5
				28.6	10.1	7.5
		2.5 mg/500 μl		2.9	2.0	1.5
				7.1	5.0	4.3
				14.3	10.1	8.1
		1.25 mg/500 μl		1.4	2.0	1.8
				3.6	5.1	3.7
				7.1	10.0	7.3
BSA	68,000	2.5 mg/500 μl	10 mg/567 μl	2.9	2.1	1.6
				7.1	5.1	3.6
				14.3	10.2	6.4
IgG	150,000	2.5 mg/500 μl	10 mg/1,218 μl	2.9	2.1	1.3
				7.1	5.2	3.6
				14.3	10.5	6.6

以上数据为本公司实际检测的结果，如实验条件变动，结果有可能改变。标记率是根据HABA法测得。

a) 1 mol蛋白质：生物素的摩尔数

b) 1 mol蛋白质上所结合的生物素的摩尔数

3. 蛋白质标记后的凝胶过滤纯化

- 1) 打开层析柱上的盖子，弃去填充液。
- 2) 打开层析柱出口的盖子，用PBS分数次洗脱，每根层析柱收集大约10 ml的洗脱液，使凝胶平衡。
- 3) 用移液器吸取500 μl标记好的蛋白质溶液加入到层析柱中，弃去此时的流出液。
- 4) 在层析柱的出口处放置一个2 ml的样品管，在层析柱中加入1ml PBS，收集流出的生物素标记蛋白质。

\* 经过层析，生物素标记蛋白质的最终浓度为标记时的1/2。

按照下列公式计算生物素标记蛋白质的最终浓度：

$$A \text{ (mol/l)} = (X/MW_{\text{protein}}) \times (1,000/Y) \times 0.5$$

X：蛋白质的重量

MW<sub>protein</sub>：蛋白质的分子量

Y：溶解蛋白质的NaHCO<sub>3</sub>缓冲液体积

五. 用Biotin Labeling Kit-SH标记(货号：LK10)

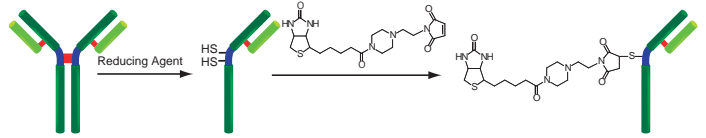


图1. 生物素标记IgG巯基部位的机理

. 试剂盒内含

- SH-Reactive Biotin ..... 3 管
- WS Buffer ..... 4 ml × 1 瓶
- Reducing Agent ..... 3 管
- Reaction Buffer ..... 1 ml × 1 管
- 过滤管 ..... 3 支

. 储存条件

试剂盒在0~5℃保存。SH-Reactive Biotin开封后在-20℃保存。

. 注意事项

1. 用该试剂盒标记的蛋白质的分子量要>50,000。
2. 在标记过程中，IgG或者Biotin-IgG标记物始终存在于过滤管的滤膜上。
3. 如果蛋白质溶液中含有分子量>10,000的其他蛋白质，如BSA或明胶时，在使用该试剂盒标记前，先要纯化IgG溶液。IgG溶液能够用IgG Purification Kits (不包含于本试剂盒中)来纯化。
4. 如果蛋白质溶液含有小的不溶物，离心后取上清液来进行标记。
5. 1 管SH-Reactive Biotin可以标记50~200 μg蛋白质。

. 所需的设备和材料

1. 微型离心机
2. 10 μl和100~200 μl移液器
3. 37℃培养箱
4. 微量管
5. DMSO

. 操作步骤



1 将100  $\mu$ l WS Buffer以及含有100  $\mu$ g IgG的样品溶液加入到过滤管中。<sup>a)</sup>



2 在8,000-10,000  $\times$  g离心10 min。<sup>b)</sup>



3 将150  $\mu$ l WS Buffer加入到Reducing Agent管中，并用移液器吹打使其溶解。



4 将100  $\mu$ l Reducing Agent溶液转移到过滤管的滤膜上，吹打使IgG在膜上溶解。



5 在37  $^{\circ}$ C培养30 min。加入100  $\mu$ l Reaction Buffer，在8,000-10,000  $\times$  g离心10 min。<sup>b)</sup>



6 将10  $\mu$ l DMSO加入到SH-Reactive Biotin中，吹打使其溶解。<sup>c)</sup>



7 将100  $\mu$ l Reaction Buffer与8  $\mu$ l SH-Reactive Biotin溶液加入到过滤管中，吹打使其混合。<sup>d)</sup>



8 在37  $^{\circ}$ C培养30 min。将100  $\mu$ l WS Buffer加入到过滤管中，在8,000-10,000  $\times$  g离心10 min。<sup>b)</sup>



9 加入200  $\mu$ l WS Buffer，在8,000-10,000  $\times$  g离心10 min。<sup>b)</sup>再重复该步骤一次。



10 加入200  $\mu$ l WS Buffer，吹打10-15次来回收标记产物。<sup>e)</sup>将该溶液转移到微量管中，在0-5  $^{\circ}$ C下保存。

- a) 样品溶液的体积不应超过100  $\mu$ l。如果蛋白质浓度 $<$ 0.5 mg/ml，重复操作步骤1和2直至总的IgG聚积量达到100  $\mu$ g。如果聚积过程中滤液的体积超过400  $\mu$ l，则在后续离心操作前应除去滤液。
- b) 如果溶液在离心后仍然残留在膜上，可以再离心5 min或者适当增加转速直至膜上没有残留液体。
- c) NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin/SH-Reactive Biotin在管子的底部，向管底加入10  $\mu$ l DMSO，吹打数次使其溶解。
- d) 如果IgG的量为200  $\mu$ g，在步骤4时加入所有的NH<sub>2</sub>-Reactive Biotin溶液。
- e) 并不一定要使用WS Buffer来回收标记产物，可以选择任何适合于该实验的缓冲液来替代。

六. 用巯基标记物进行生物素标记  
. 试剂

- Biotin-PE-maleimide (货号：B300)
- Biotin-PEAC<sub>5</sub>-maleimide (货号：B299)
- 10 mmol/l HEPES Buffer (pH8.0)
- 1,4-Dithiothreitol (DTT)
- DMSO
- NAP-5 (GE Healthcare公司)
- NAP-10 (GE Healthcare公司)
- PBS (pH 7.4) (8.0 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

. 抗体的生物素标记操作步骤

1. 制备含巯基的抗体
  - 1) 用PBS溶解DTT (浓度为200 mmol/l)，制成DTT溶液。
  - 2) 精确称量1.0~5.0 mg抗体并记录，加入500  $\mu$ l 10 mmol/l HEPES Buffer (pH 8.0) 溶解蛋白质，制成抗体溶液。
  - 3) 在抗体溶液加入2  $\mu$ l DTT溶液，充分混合。



## 2. 凝胶过滤纯化

- 1) 打开NAP-5层析柱上的盖子，弃去填充液。
- 2) 打开层析柱出口的盖子，用PBS分数次洗脱，每根层析柱收集大约10 ml的洗脱液，使凝胶平衡。
- 3) 用移液器吸取500  $\mu$ l标记好的抗体溶液加入到层析柱中，弃去此时的流出液。
- 4) 在层析柱的出口处放置一根管子，在层析柱中加入1ml PBS，收集流出的抗体。

## 3. 生物素标记

- 1) 用DMSO溶解Biotin-PE-maleimide (浓度为50 mmol/l, 4.7 mg/200  $\mu$ l或10 mg/424  $\mu$ l)。  
\* 用Biotin-PEAC<sub>5</sub>-maleimide时浓度为5.9 mg/200  $\mu$ l或10 mg/342  $\mu$ l。
- 2) 在纯化好的抗体溶液中加入配制好的生物素标记试剂溶液，抗体：生物素标记试剂的混合摩尔比为1:10左右。
- 3) 充分混合后，在水浴恒温摇床 (25 )中过夜培养。

## 4. 标记抗体的凝胶过滤纯化

- 1) 打开NAP-10层析柱上的盖子，弃去填充液。
- 2) 打开层析柱出口的盖子，用PBS分数次洗脱，每根层析柱收集大约15 ml的洗脱液，使凝胶平衡。
- 3) 用移液器吸取1 ml标记好的抗体溶液加入到层析柱中，弃去此时的流出液。
- 4) 在层析柱的出口处放置一根管子，在层析柱中加入1.5 ml PBS，收集流出的生物素标记抗体。

## 七. 用HABA法计算蛋白质的生物素标记率

## . 原理

生物素对蛋白质的标记率采用HABA (4-Hydroxy-azobenzene-2'-carboxylic acid) 的方法计算。

HABA和亲和素结合后在500 nm会有吸收。由于生物素-亲和素的亲和性比HABA-亲和素的高，所以在HABA-亲和素溶液中加入生物素标记蛋白，生物素会取代HABA和亲和素结合。因为HABA和亲和素解离会导致在500 nm的吸光度减少，故利用此原理可以计算生物素的标记率。

## . 试剂

亲和素 .....	10 mg
HABA .....	14 mg
DMSO .....	500 $\mu$ l
PBS Buffer (pH 7.4) .....	20 ml
8.0 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	

## . 测定及计算方法

- 1) 在2 ml样品管中精确称量14.0 mg HABA后，用移液器加入500  $\mu$ l DMSO溶解制成HABA溶液。
- 2) 在20 ml容量瓶中精确称量10.0 ( $\pm$ 0.1) mg 亲和素后，加入15 ml PBS溶解。然后用移液器加入200  $\mu$ l上述配制好的HABA溶液后，补充PBS至20 ml，充分混合，制成HABA-亲和素溶液。
- 3) 用移液器吸取900  $\mu$ l配制好的HABA-亲和素溶液至微型比色槽 (容量1 ml, 长1 cm) 中，测定在500 nm的吸光度，重复测定3次的平均值作为Abs<sub>A</sub>，这时的Abs<sub>A</sub>值大约为1.5。
- 4) 用移液器吸取900  $\mu$ l配制好的HABA-亲和素溶液至2 ml样品管中，然后加入100  $\mu$ l纯化的标记蛋白质溶液，旋紧盖子后，用Vortex混匀。
- 5) 静置5 min (以上)，用移液器转移至微型比色槽中，测定在500 nm的吸光度，作为Abs<sub>B</sub>。如果蛋白质浓度过高，会造成生物素比亲和素多，有时会出现无法计算出和蛋白质结合的准确生物素数量的情况。所以如果Abs<sub>B</sub><0.7，建议先适当稀释蛋白质溶液 (稀释倍率：Z)，然后加入HABA-亲和素溶液，计算出标记率。
- 6) 按照以下公式计算出样品中的生物素浓度B(mol/l)。  
$$B(\text{mol/l})=Z \times [10^{-2} \times (0.9 \times \text{Abs}_A - \text{Abs}_B)/34]$$
- 7) 也可以计算出1个分子蛋白质上结合的生物素数量。

例如按照 .用Biotinylation Kit (Sulfo-OSu) 中的生物素标记方法，标记X g分子量为MW<sub>protein</sub>的蛋白质，纯化后的蛋白质浓度A(mol/l)可以表示如下：

$$A(\text{mol/l}) = (X/\text{MW}_{\text{protein}}) \times 10^3$$

在1个分子蛋白质上结合的生物素数量 (mol/mol) =B/A。