

生物素标记蛋白/抗体实验步骤和注意事项

海狸纳米科技（苏州）有限公司

生物素，是一个小分子，经活化后可与蛋白、抗体等生物大分子结合，不仅可以很好地保持大分子的生物活性，而且与亲和素结合使用时具有多级放大作用。配合 BeaverBeads™ Streptavidin Matrix 链霉亲和素磁珠系列产品，用于免疫沉淀、免疫检测（ELISA）及各类核酸、蛋白质杂交反应，可大幅度缩短吸附生物素标记分子所需的时间并简化操作设备。

生物素总类

- 1) 标记蛋白质氨基的活化生物素：N-羟基丁二酰亚胺酯（BNHS）。
- 2) 标记蛋白质醛基的活化生物素：酰肼（BHZ）和肼化生物胞素（BCHZ）。
- 3) 标记蛋白质巯基的活化生物素：3-(N-马来酰亚胺-丙酰)-生物胞素（MPB）。
- 4) 标记蛋白质核酸的活化生物素：常用于标记核酸分子的活化生物素有光生物素、生物素脱氧核苷三磷酸、BNHS 和 BHZ。

生物素标记蛋白的一般步骤

- 1) 蛋白质溶液配制：采用 NaHCO_3 Buffer（0.1 M, pH 8.0）或 H_3BO_3 Buffer（0.5 M, pH 8.6）配制 1 mg/mL 蛋白质溶液。
- 2) 蛋白质透析：交互用 NaHCO_3 Buffer（0.1 M, pH 8.0）或 H_3BO_3 Buffer（0.5 M, pH 8.6）对蛋白质充分透析。
- 3) 生物素溶液配制：用 DMSO 配制 BNHS 溶液 1 mg/mL。
- 4) 向 1 mL 蛋白质溶液（即含蛋白质 1 mg）加入 BNHS 溶液（BNHS 用量根据蛋白调节）。

- 5) 在室温下持续搅拌 2~4 小时。
- 6) 加入 1 M NH_4Cl (每 25 μg BNHS 加 1 μL) , 在室温下搅拌 10 分钟。
- 7) 在 4°C , 用 PBS 充分透析 , 以除去游离的生物素。
- 8) 将样品上 1 mL 的分子筛柱 , 以 PBS 缓慢洗脱 , 收集 1 mL/管 , 蛋白质在 1~3 mL 之间洗下。
- 9) 最后 , 样品加入叠氮钠 (终浓度 0.5 g/L) 及 BSA (终浓度 1.0 g/L) 。将结合产物置 4°C , 避光保存。亦可加入 50%重蒸甘油 , 置 -20°C 保存。

生物素标记注意事项

- 1) 标记反应时 , 活化生物素与待标记抗原或抗体应有适当的比例 , 用 BNHS 量过量也是不利的 , 抗原的结合位点可能因此被封闭 , 导致抗体失活。生物素:IgG 用量比(mg/mg)宜为 2:1, IgG 应用浓度 0.5~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 生物素 1~3 个/Ag , 3~5 个/Ab ;
- 2) 生物素与抗原、抗体等蛋白质结合后 , 不影响后者的免疫活性 ; 标记酶时则结果有不同 , 碱性磷酸酶标记后活性将降低 ;
- 3) 依抗原或抗体分子所带可标记基团的种类 (氨基、醛基或巯基) 以及分子的酸碱性 , 选择相应的活化生物素和反应条件 ; 活化生物素通过侧链与蛋白分子连接 , 可与不同的功能基团 , 如羰基、氨基、巯基、异咪唑基及苯酚基 , 也可与糖基共价结合 ;
- 4) 一个蛋白分子可被多个生物素标记 ;
- 5) 如在反应混合液中有叠氮钠或游离氨基存在 , 会抑制标记反应。因此 , 蛋白质在反应前要对 NaHCO_3 Buffer (0.1 M, pH 8.0) 或 H_3BO_3 Buffer (0.5 M, pH 8.6) 充分透析 ;

- 6) 所用的 BNHS 及待生物素化蛋白质之间的分子比按蛋白质表面的 ϵ -氨基的密度会有所不同，选择不当则影响标记的效率，应先用几个不同的分子比来筛选最适条件。
- 7) 由于抗体的氨基不易接近可能造成生物素化不足，此时可加入去污剂如 Triton X-100，Tween-20 等。
- 8) 当游离 ϵ -氨基（赖氨酸残基的氨基）存在于抗体的抗原结合位点时，或位于酶的催化位点时，生物素化会降低或损伤抗体蛋白的结合力或活性。此时，应试用其它交联方法。
- 9) 交联反应后，应充分透析，否则，残余的生物素会对生物素化抗体与亲和素的结合产生竞争作用。
- 10) 在细胞的荧光标记实验中，中和亲和素的本底低，但由于链霉亲和素含有少量正电荷，故对某些细胞可导致高本底。