

HABA 法生物素标记效率检测试剂盒

产品介绍:

2- (4-羟基苯偶氮) 苯甲酸(2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic acid ,英文缩写 HABA)可以与亲和素特异性结合,其结合复合物为一种黄色或者橘黄色,在 500nm 有最大吸光值;但是其结合力远远低于生物素与亲和素的结合,当溶液中存在生物素的时候,生物素会强竞争让 HABA 解离下来,引起吸光值下降。基于此原理,可以根据 500nm 吸光值的变化计算出蛋白标记生物素的量(被标记蛋白与生物素的摩尔比)。

生物素标记摩尔比的计算是基于比尔-朗伯定律(Beer-Lambert law),又称比尔定律或比耳定律(Beer's law),是分光光度法的基本定律,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: $A = \epsilon \cdot C \cdot L$ 其中 A 为光度, ϵ 为摩尔吸光系数,所以此处公式为 $A_{500} = \epsilon_{500} \cdot C \cdot L$ (此处 $\epsilon_{500} = 34,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

适用范围:

本试剂盒适用于蛋白或抗体生物素标记效率的检测

主要组分:

组分名称 (Components)	规格	组分说明
HABA- Avidin 混合液(干粉)	1VL	临用前加 ddH ₂ O 定容到 10ml
PBS(pH7.2)	30ml	100mM 磷酸钠, 150mM NaCl

储存条件:

本试剂盒在低温下运输,收到后请置于 2-8°C 保存,保存时间 24 个月。

实验操作可以选择分光光度法或微孔酶标板法:

分光光度法:

- A. 取 900uL HABA- Avidin 混合液放入 1cm 光程比色杯,在 500nm 波长测量吸光值,记录为 $A_{500(\text{H-A})}$;最好测量三次取平均值;
- B. 在比色杯中加入 100uL 待测的生物素标记蛋白(Biotinylated Protein,简称 BP),充分混匀后,在 500nm 波长测量吸光值,吸光值稳定 20 秒以上,记录为 $A_{500(\text{H-A-BP})}$;最好测量三次取平均值;如果 $A_{500(\text{H-A-BP})} < 0.35$,请用 PBS 稀释待测样品,再次重复此步骤。

微孔酶标板法:

- A. 取 180uL HABA- Avidin 混合液放入微孔板中，在 500nm 波长测量吸光值，记录为 $A_{500(H-A)}$ ；最好测量三次取平均值；
- B. 在微孔板中加入 20uL 待测的生物素标记蛋白 (Biotinylated Protein,简称 BP)，震荡或移液器吹打充分混匀后，在 500nm 波长测量吸光值，吸光值稳定 20 秒以上，记录为 $A_{500(H-A-BP)}$ ；最好测量三次取平均值；如果 $A_{500(H-A-BP)} < 0.3 * A_{500(H-A)}$ ，请用 PBS 稀释待测样品，再次重复此步骤。

标记效率计算方法:

1) 蛋白摩尔浓度计算： $mM / mL = \frac{\text{蛋白浓度 (mg/mL)}}{\text{蛋白分子量 (mg/mmol)}}$

2) 生物素摩尔浓度计算(分光光度计法)： $mM / mL = \frac{\Delta A_{500}}{34000 * 1}$

其中吸光值变化(分光光度比色皿)： $\Delta A_{500} = (0.9 * A_{500(H-A)}) - A_{500(H-A-BP)}$

3) 生物素摩尔浓度计算 (微孔板法)： $mM / mL = \frac{\Delta A_{500}}{34000 * 0.58}$

其中吸光值变化(微孔酶标板)： $\Delta A_{500} = A_{500(H-A)} - A_{500(H-A-BP)}$

备注：使用标准 96 孔微孔板，200ul 液体，其液面高度 (光程) 为 0.58cm

4) 标记摩尔比计算：

生物素：蛋白 = $[(\text{生物素摩尔浓度} * 10) / \text{蛋白原始摩尔浓度}] * \text{稀释倍数}$

本试剂仅供实验室研究使用