

我们建议您根据以下常规实验步骤使用 NHS esters 标记生物分子

1. 计算所需 NHS esters 的量:

NHS esters 质量[mg]=8×氨基化合物质量[mg] ×NHS esters 摩尔质量[Da]/氨基化合物摩尔质量[Da]

8 是 NHS ester 对氨基化合物的摩尔倍数，是单一标记的实验数值，适用于许多常规蛋白和多肽。然而，在一些情况下需要增加或减少 NHS ester 的用量，取决于蛋白结构、试剂和溶解度。APEXBIO 产品的摩尔质量可以在相关产品页面查询。

2. 决定反应混合物体积。

标记反应可以在纳摩尔至几十克规模下进行。最小体积约 10-20 uL，浓度越高（每 mL 反应混合物中含 1-10 mg 氨基生物分子）反应越佳。

3. 将 NHS ester 溶于 1/10 反应体积的 DMF 或 DMSO 中。建议使用无氨基的 DMF 作为溶剂。配成溶液的 NHS ester 可以置于-20° C 保存 1-2 个月。

4. 将生物分子溶于 9/10 反应体积的 pH 值为 8.3-8.5 的缓冲液中。

可以选择 0.1 M 碳酸氢钠溶液和 0.1 M 磷酸盐缓冲液。注意 pH 值是实验的关键，另外还要避免使用含有氨基的缓冲液（Tris 有时可以使用，但不推荐）。

当做大规模的标记时（使用几百毫克的 NHS ester），注意反应混合体系会随着 NHS ester 不断被水解而酸化，需要监控 pH 值，或使用更高浓度的缓冲液。

5. 标记反应

将 NHS ester 溶液加入到生物分子溶液中，振动混匀。置于冰上过夜，或室温放置 4 小时以上。

6. 纯化标记物

用合适的方法纯化缀合物：最普遍的纯化大分子的方法为凝胶过滤法，也可以选择沉淀法或色谱法。有机杂质（比如 N-羟基丁二酰亚胺、NHS ester、水解产生的酸）较容易分离，蛋白和核酸可以使用乙醇或丙酮沉淀进行纯化。