

蛋白生物素化实验步骤

A. 计算公式

生物素标记的程度取决于蛋白质上氨基的分布、蛋白质浓度和所用试剂的量。与涉及浓缩蛋白溶液的反应相比,使用稀释溶液的标记反应需要更高摩尔倍数的生物素试剂以实现相同的掺入水平。如果使用 20 倍摩尔过量的生物素试剂标记 1-10 mg/mL 抗体 (在 0.5-2 mL 中),则每个抗体分子标记 4-6 个生物素基团。如果使用 50 倍摩尔的生物素试剂标记 50-200 μ g 抗体 (在 200-700 μ L 中),则每个抗体分子标记 1-3 个生物素基团。调节 Sulfo-NHS-Biotin 与蛋白质的摩尔比,以获得所需的掺入水平。

1. 计算 20 倍摩尔比率的反应体系中,需要加入多少毫摩尔的生物素试剂:

$$\text{ml protein} \times \frac{\text{mg protein}}{\text{ml protein}} \times \frac{\text{mmol protein}}{\text{mg protein}} \times \frac{20 \text{ mmol Biotin}}{\text{mmol protein}} = \text{mmol Biotin}$$

*20 = 生物素的摩尔过量倍数

2. 计算需要多少微升 10 mM 生物素试剂溶液 (B 部分第 3 步) 加入反应体系:

$$\text{mmol Biotin} \times \frac{1,000,000 \mu\text{l}}{\text{L}} \times \frac{\text{L}}{10 \text{ mmol}} = \mu\text{l Biotin}$$

B. 生物素化标记反应

1. 如果生物素试剂冷冻储存,取出瓶子充分平衡至室温后于第 3 步打开。
2. 根据 A 部分的计算公式,将蛋白质溶解于 PBS 中。
注意:若蛋白质已经溶解于 pH 7.2-8.0、无胺的缓冲液中,可以不用更换缓冲液或者用 PBS 稀释。蛋白质溶解于 Tris 或其它含胺的缓冲液中时必须更换合适的缓冲液。
3. 配置 10 mM 生物素试剂溶液,现配现用。
4. 加入适当体积的 10 mM 生物素试剂溶液 (见 A 部分计算公式) 于蛋白溶液中。
5. 置于冰上 2 小时或室温孵育 30 分钟。
注意:除非有常规蛋白降解的可能性或微生物生长,反应时间延长并无损害。
6. 蛋白标记到这一步已完成,尽管溶液中仍有过量未反应的和水解的生物素试剂,已经可以用 ELISA 和 Western blot 实验初步测试标记蛋白。一旦证实蛋白的适当功能和标记后,标记好的蛋白需要使用脱盐或透析的方式纯化以获得最佳性状和稳定性。如果用 Pierce Biotin Quantitation Kit 来确定插入的生物素水平,蛋白必须先脱盐或透析以去除未反应的生物素。

细胞表面蛋白生物素化实验步骤

可对培养板中的悬浮细胞或贴壁细胞进行标记。标记贴壁细胞时,Sulfo-NHS-Biotin 扩散至细胞的所有表面会受到限制,并且标记主要发生在暴露的细胞表面。必须洗去细胞中残留的培养基;否则,含胺组分将竞争并淬灭与细胞表面蛋白的反应。使用更浓缩的细胞悬浮液是最有效的,因为在反应中需要更少的生物素试剂。通常,终浓度为 2-5 mM 的生物素试剂是有效的。NHS 反应在高 pH 下进行得更快;因此,在下面的实验条件中选取 pH 8.0 以最快的速度完成标记。

1. 用冰冷的 PBS (pH 8.0) 洗涤细胞 3 次，以除去细胞中含胺的培养基和蛋白质。
2. 将细胞悬浮在 PBS (pH 8.0) 中，浓度为 $\sim 25 \times 10^6$ 个细胞/ml。
3. 向每毫升细胞悬浮液中加入 1.0 mg Sulfo-NHS-Biotin 试剂 (得到 ~ 2 mM 生物素试剂)。或者，向每毫升细胞悬浮液中加入 200 μ L 的 10 mM 生物素试剂溶液 (参见前面的步骤 B.3)。
4. 将反应混合物在室温下孵育 30 分钟。
注意：在 4 $^{\circ}$ C 下进行此孵育可能会降低生物素试剂的主动内化。
5. 用 PBS 和 100 mM 甘氨酸洗涤细胞 3 次，淬灭并除去过量的生物素试剂和副产物。