

# HABA 法生物素标记效率检测试剂盒

## 产品简介：

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:  $A = \epsilon * C * L$  其中 A 为光度,  $\epsilon$  为摩尔吸光系数,所以此处公式为  $A_{500} = \epsilon_{500} C L$  (此处  $\epsilon_{500} = 34,000 M^{-1} cm^{-1}$ )

## 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 <sub>2</sub> 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 2 年以上。

## 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：

- 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  $A_{500(H-A)}$ ;最好测量三次取平均值;
- 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  $A_{500(H-A-BP)}$ ;最好测量三次取平均值;如果  $A_{500(H-A-BP)} < 0.35$ ,请用 PBS 稀释待测样品,再次重复此步骤。

### 微孔酶标板法：

- 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;
- 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：

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

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

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

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

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

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\***

#### 案例演示 :

以 ANTBDY 超级生物标记试剂盒 (货号 : ATB01004) 标记 Anti-Covid-19 Spike Mab (货号 : nCoV-S-hMab-B), 标记后

测算标记比, 分光光度计法。

本案例中被标记蛋白为抗体, 分子量 (MW) 为 150,000, 浓度为 5.0mg/mL,  $A_{500(\text{H-A})} = 1.090$ ,  $A_{500(\text{H-A-BP})} = 0.585$ ,

抗体摩尔浓度计算 :  $\text{mM} / \text{mL} = 5 / 150000 = 3.33 * 10^{-5}$

$\Delta A_{500} = (0.9 * 1.090) - 0.585 = 0.396$

生物素摩尔浓度计算 :  $\text{mM} / \text{mL} = 0.396 / (34000 * 1) = 1.16 * 10^{-5}$

抗体 : 生物素 (摩尔比) =  $(3.33 * 10^{-5}) / (1.16 * 10^{-5} * 10) = 1.3.48$