

Инструкция к набору Protein Biotinylation Kit для биотинилирования белков

Contents

Русский: Инструкция к набору Protein Biotinylation Kit для биотинилирования белков	3-7
---	-----

Инструкция к набору Protein Biotinylation Kit для биотинилирования белков

Protein Biotinylation Kit — готовый к использованию набор для ковалентного мечения очищенных белков, пептидов и антител биотином (от 3 до 5 меток на 1 молекулу белка) с помощью активированного NHS-эфира биотина. Набор обеспечивает быстрое и воспроизводимое биотинилирование первичных аминогрупп (ϵ -аминогруппы остатков лизина и N-концевые аминогруппы) без существенного влияния на биологическую активность белка.

В набор входят компоненты для проведения 1 или 10 реакций с 100 мкг антител или других белковых молекул с молекулярной массой $M_r \sim 150$ кДа, а также микроколоники для очистки целевой молекулы от непрореагировавшего реагента методом гель-фильтрации.

Важно! Для мечения белков с существенно отличающихся по массе для получения степени мечения 3-5 необходимо брать на 1 реакцию $100 \text{ мкг} \times M_r(\text{белка})/150 \text{ кДа}$.

Состав набора

Компонент набора	Количество	
	BB21-1гхп 1 реакций	BB21-10гхп 10 реакций
S6115, Desalting receptacle vial, 1.5 mL, 1 pcs	1	—
A8115, Desalting spin column with waste vial, 1 pcs	1	—
16115, Desalting receptacle vial, 1.5 mL, 10 pcs	—	1
18115, Desalting spin column with waste vial, 10 pcs	—	1
2897-10nmol, Биотин-XX-NHS-эфир, 10 nmol	1	10
11125, PBS tablet, for 100 mL of buffer, 1 pcs	1	1
15050, ДМСО (диметилсульфоксид) для мечения, 1 mL	1	1
1584-05mL, Раствор азиды натрия, 3%, 0.5 mL	1	1
1689-15mL, Гидрокарбонат натрия, 126 mg	1	1

Хранить при температуре от +4°C до +20°C. Не замораживать! Транспортировка: до трех недель при комнатной температуре. Избегайте хранения на свету. Берегите от влаги.

Срок хранения 12 месяцев.

Протокол

1. Подготовка белка

- Препарат целевого белка (антитела и др.) не должен содержать примеси свободных аминокислот или других белков (например, БСА), а также компонентов буферных растворов с pH 2–7,5 или 9–12. Если белок находится в буферном растворе с pH 8–8,5 на основе бикарбоната натрия и гарантированно не содержит других примесей, его можно использовать в реакции без дополнительной очистки. Если вы не уверены, что препарат антитела не содержит примесей, то обязательно проведите процедуру очистки. Для очистки белка (при необходимости) рекомендуется использовать один из следующих методов: диализ, гель-фильтрация или ультрафильтрация на колонках, с использованием 0,1 М раствора гидрокарбоната натрия*.
- Оптимальные условия для проведения мечения: концентрация белка 1 мг/мл в растворе 0,1 М гидрокарбоната натрия без посторонних примесей. Присутствие консервирующего агента азида натрия в растворе антитела (до концентрации 0,04%) не оказывает влияния на реакцию.
- Если концентрация белка ниже 1 мг/мл, то ее необходимо довести до 1 мг/мл с помощью концентрирования (ультрафильтрацией) и последующего разбавления. Для полной очистки от возможных примесей рекомендуется провести два цикла концентрирования/разбавления. После каждого концентрирования белок необходимо разбавлять 0,1 М гидрокарбонатом натрия.
- Если концентрация белка выше 1 мг/мл, перед разбавлением рекомендуется провести его однократную промывку на колонке для ультрафильтрации с помощью 0,1 М гидрокарбоната натрия. Для полной очистки от возможных примесей рекомендуется провести два цикла концентрирования/разбавления. После промывки белок разбавляется 0,1 М гидрокарбонатом натрия.
- Концентрацию белка рекомендуется контролировать спектрофотометрически (для этих целей лучше всего подходит бесцветный спектрофотометр).

Важно! Концентрация белка в реакционной смеси влияет на степень мечения. Например, при постановке реакции со 100 мкг белка в объеме менее 100 мкл будет получен модифицированный белок со степенью мечения более 5 молекул биотина на белковую молекулу. При постановке реакции со 100 мкг белка в объеме, большем 100 мкл, будет получен модифицированный белок со степенью мечения менее 3 молекул биотина на белковую молекулу.

* Для приготовления 0,1 М гидрокарбоната натрия необходимо к содержимому пробирки с сухим гидрокарбонатом натрия, входящей в состав набора, добавить 15 мл деионизированной воды.

2. Постановка реакции

В пробирку с лиофилизированным реагентом для биотинилирования добавьте раствор белка в 0,1 М гидрокарбонате натрия (рекомендуемые количества — 100 мкг** белка в 100 мкл), перемешайте на вортексе до полного растворения реагента и инкубируйте 1 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C.

** Если необходимо провести реакцию с меньшим количеством белка, необходимо развести лиофилизированный реагент в 10 мкл безводного ДМСО и взять для реакции по 1 мкл раствора на каждые 10 мкг белка. Раствор реагента в ДМСО не подлежит хранению.

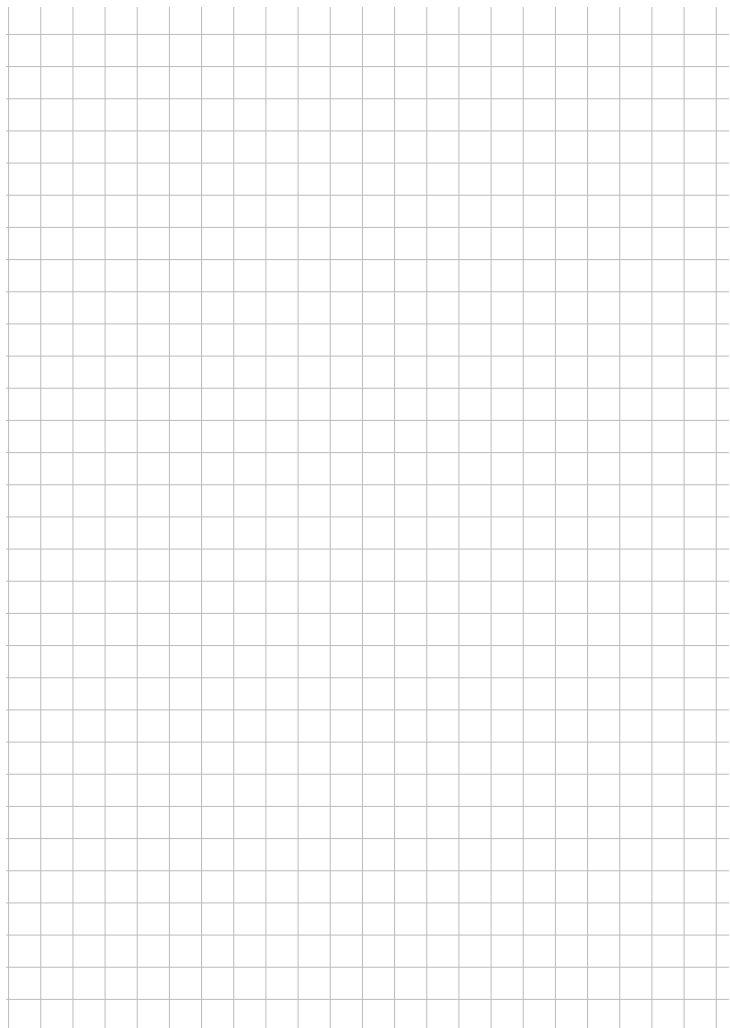
3. Очистка белка от избытка реагента

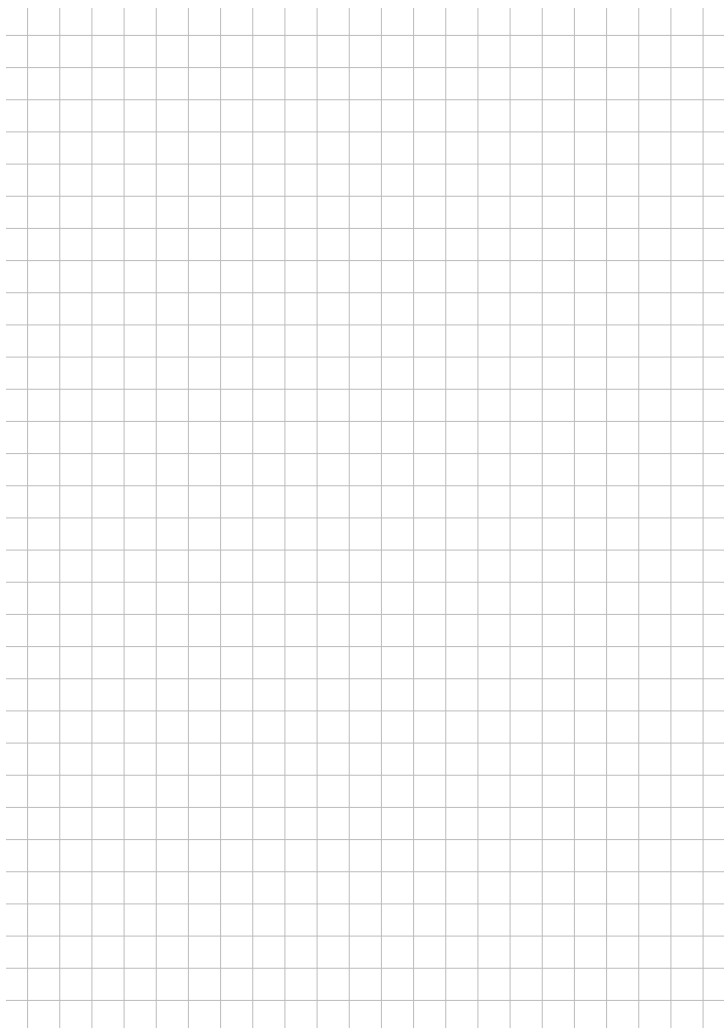
1. Предварительно растворите таблетку буфера PBS в 100 мл воды.
2. Подготовьте колонку. Убедитесь, что колонка имеет комнатную температуру. Сорбент ресуспендируйте на вортексе. Снимите с колонки колпачки, поместите ее в пробирку для сбора жидкости и центрифугируйте получившуюся конструкцию 2 мин при 1000 g (необходимо строго соблюдать установленную скорость; для стандартного ротора радиусом 6 см, 1000 g соответствует 3800 об/мин; при центрифугировании необходимо соблюдать ориентацию колонки в роторе: выступ на верхней части колонки должен быть направлен от центра ротора). После центрифугирования удалите фильтрат.

3. Нанесите на колонку 400 мкл PBS, центрифугируйте 2 мин при 1000 g. После центрифугирования удалите фильтрат.
4. Перенесите колонку в 1,5 мл пробирку для сбора биотинилированного белка, входящую в набор.
5. Нанесите в центр колонки 100 мкл*** реакционной смеси, инкубируйте в течение 1 мин, центрифугируйте 2 мин при 1000 g. В пробирке соберется очищенный биотинилированный белок****.

*** Для очистки на колонку можно наносить от 50 до 100 мкл. Если реакция проводилась в меньшем объеме, рекомендуется после реакции довести объем препарата минимум до 50 мкл путем добавления буфера PBS.

**** После центрифугирования к препарату антитела можно добавить раствор азид натрия (имеется в наборе) в объеме 1% от объема препарата. При необходимости препарат антитела можно разделить на аликвоты по мере центрифугирования. В этом случае аликвоту, с которой ведется работа, следует хранить при +4°C, остальные аликвоты — при -20°C. При +4°C допустимо хранить только те растворы, в которые добавлен азид натрия.







22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

