

Biotin Ligase (生物素连接酶)

产品套装编号: **B0101A**

| 产品内容 | 产品编号 | 包装规格 |
|------------------------------------|---------|-------------|
| Biotin Ligase (750 U/ μ l) | B01010A | 100 μ l |
| D-Biotin | B01011A | 1 ml |
| 10 \times Biotin Ligase Buffer A | B01012A | 1 ml |
| 10 \times Biotin Ligase Buffer B | B01013A | 1 ml |

保存条件: -20 $^{\circ}$ C

■ 产品概述:

生物素连接酶 (Biotin Ligase、BirA、EC 6.3.4.15)能活化生物素形成生物素酰 -5'-腺苷酸, 将生物素特异地转移到生物素受体蛋白 (如AviTag融合蛋白) 上, 使蛋白生物素化。

■ 来源:

重组蛋白 (*Escherichia coli*)

■ 酶活性单位定义:

底物蛋白 (多肽) 浓度为 38 μ M 的条件下, 于30 $^{\circ}$ C 孵育30 min, 将 1 pmol蛋白 (多肽) 生物素化所需的酶量定义为一个活性单位。

■ 纯度:

纯度 >95%, 无可检测的蛋白酶活性。

■ 应用:

生物素受体蛋白的生物素化。

■ 储存条件:

- 干冰运送, 解冻后分装, 避免反复冻融。
- 长期保存置于-80 $^{\circ}$ C, 短期内使用置于-20 $^{\circ}$ C, 频繁使用可短时置于4 $^{\circ}$ C。在4 $^{\circ}$ C条件下保存三个月可保持 >90% 的酶活性。
- 10 \times Biotin Ligase Buffer A、B和D-Biotin储存于-20 $^{\circ}$ C, 可反复冻融。

■ 产品成分:

- Biotin Ligase储存缓冲液: 50 mM Imidazole, 50 mM NaCl, 5% Glycerol, 5 mM Mercaptoethanol, pH 6.8
- 10 \times Biotin Ligase Buffer A: 0.5 M Bicine, pH 8.3
- 10 \times Biotin Ligase Buffer B: 100 mM ATP, 100 mM MgOAc, 500 μ M D-Biotin
- D-Biotin: 500 μ M D-Biotin

■ 反应体系示例

| 反应物组成 | 体积 | 终浓度 |
|---------------------------|--------|---------|
| 10×Biotin Ligase Buffer A | 2.5 μl | 1× |
| 10×Biotin Ligase Buffer B | 2.5 μl | 1× |
| Biotin Ligase | 1.5 μl | 45 U/μl |
| 蛋白（多肽）底物 (1nmol) | 18.5μl | 40 μM |

总体积 25 μl，于30℃孵育 30~40 min使底物完全生物素化

■ 注意事项:

1. 本产品的底物为AviTag融合蛋白 (<http://www.genecopoeia.com/product/avitag/>)。
2. Buffer A和Buffer B已经针对生物素化反应进行优化，底物浓度不超过 40 μM。如果底物浓度达40~80 μM，则要加入额外的生物素，反应如下：1份10× Biotin Ligase Buffer A，1份10×Biotin Ligase Buffer B，7份酶底物混合物和1份D-Biotin。如果底物浓度超过80 μM，请酌情稀释底物或与技术人员联系获取帮助。
3. 在相同的酶量下，高浓度的底物（高至40 μM）可以保证快速完成生物素化，底物浓度越低，生物素化所需时间越长。使用相同量的生物素连接酶，40 μM底物可以在30分钟内完成生物素化，而4 μM底物则需要5小时。如果需要在30 min内使4 μM底物完成生物素化，相同的底物量应加入10倍量的酶。
4. 如底物蛋白（多肽）需保存在较低温度时，可适当降低反应温度并应延长酶促反应时间。
5. 氯化钠（>100 mM）、甘油（>5% W/V）、硫酸铵（>50 mM）等许多常见的缓冲液成分会抑制生物素连接酶的活性。当底物蛋白（多肽）确有必要使用这些试剂时，应尽量降低浓度。
6. 底物中可含有Tris(pH 8.0)，最佳浓度为10 mM，不超过50 mM。

■ FAQ:

- Q: 如何阻止蛋白酶降解底物？
- A: 本产品的生物素连接酶经严格质量控制，没有蛋白酶活性。如果用于生物素化的底物蛋白是未经纯化的粗提蛋白，建议加入适量的蛋白酶抑制剂，以防止在生物素化的过程中发生降解。
- Q: 如何确定参与反应的最适本酶量及反应条件？
- A: 由于不同蛋白质性质差别很大、生物酶反应存在一定的不确定性，说明书中所述反应条件并不完全适用于所有蛋白。建议用户可以进行预实验：可先取少量蛋白，分成若干份相同量的底物，加入不同稀释度的酶，相应量的Buffer A、B，30℃ 1 h（或其它时间、温度条件）反应，以SDS-PAGE Loading Buffer终止反应后，电泳并转移至NC膜上进行Western Blotting检测（BSA封闭后直接以市售的HRP-Streptavidin孵育，DAB显色），比较生物素化情况，选取最适条件。由于Streptavidin与Biotin结合力极强，因而用于Western Blotting检测时，只需很少生物素化蛋白即可观察结果。
- Q: 如果我的底物蛋白浓度相当低且不容易浓缩，进行生物素化时该怎么办？
- A: 在进行相同底物量的酶促反应时加入更多的酶并适当延长反应时间。但有一个问题不容忽视，酶是蛋白质，在酶量增加的时候，引入体系中的蛋白量亦增加了，如果后续的实验不容许出现大量杂蛋白，那么延长反应时间将是唯一的选择。
- Q: 去污剂对于生物素化反应有无影响？
- A: 经过实验检测，0.2%的Tween 20对反应没有任何影响。

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。



复能基因
FulengGen

地址:广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D区8楼, 510663
客服电话:020-32068595 电子邮箱:support@fulengen.com 网址:www.fulengen.com