

Biotin-Protein Ligase / BirA Enzyme (生物素连接酶)

产品编号: BI001

包装规格: 20 µg×2, 300000 U in total

产品内容	产品编号	包装规格
Biotin-Protein Ligase (1mg/ml)	BI001-01	20 µl×2 vials
10×Biotin Ligase Buffer A	BI001-02	1 ml
10×Biotin Ligase Buffer B	BI001-03	1 ml
Additional D-Biotin	BI001-04	1 ml (500 µM)

储存条件: -80℃密闭保存一年有效, 低温运输。

■ 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)

■ 活性及纯度

Biotin-Protein Ligase 生物活性 ≥ 7,500 Units/µg

纯度 > 95%, 无可检测的蛋白酶活性。

■ 酶活性单位定义

底物蛋白(多肽)浓度为 40 µM 的条件下, 于 30℃ 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。

■ 储存条件

1. 干冰运送, 解冻后分装, 避免反复冻融;
2. 长期保存置于 -80℃, 短期内使用置于 -20℃, 频繁使用可短时置于 4℃。在 4℃ 条件下保存三个月可保持 > 90% 的酶活性;
3. Ligase Buffer A、B 和 D-Biotin 储存于 -20℃, 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×Biotin Ligase Buffer A: 0.5 M Bicine, pH 8.3

10×Biotin Ligase Buffer B: 100 mM ATP, 100 mM MgOAc, 500 µM D-Biotin

D-Biotin: 500 µM 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	0.17 µl	6.4 ng/µl
蛋白（多肽）底物	1 nmol	40 µM
dH ₂ O（灭菌蒸馏水）	up to 25 µl	

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.igenebio.com/product/biotin-protein-ligase/>）。
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，请酌情用 10 mM Tris-HCl，pH 8.0 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。

■ FAQs

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 °C 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 或脱脂奶粉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。

BI001-082222

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。