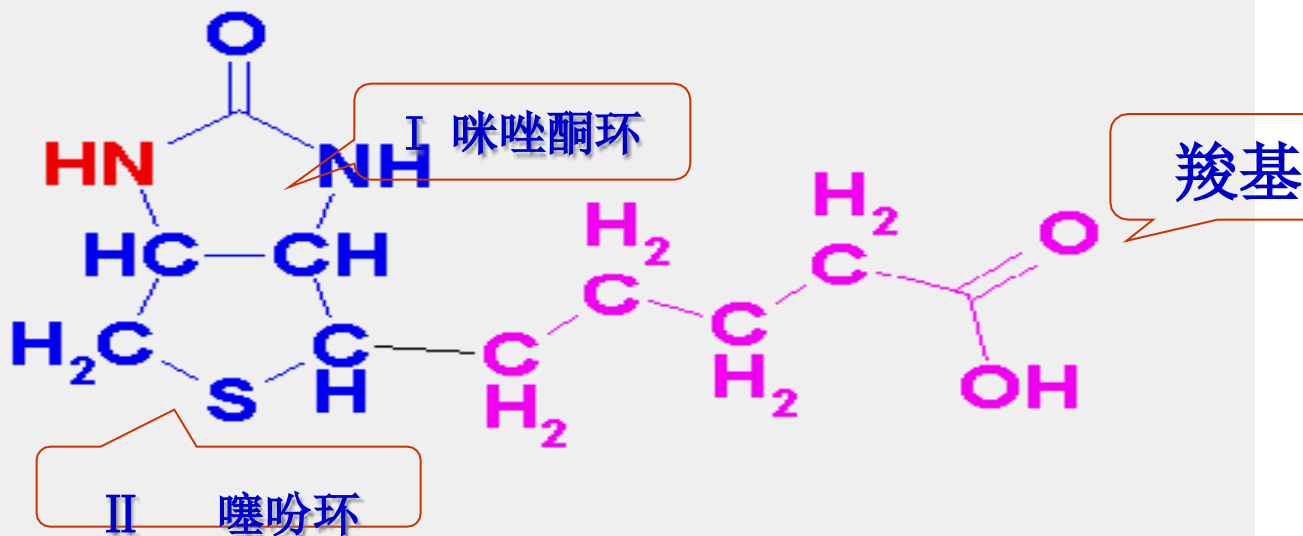


生物素-亲和素放大技术

第一节 生物素理化性质与标记

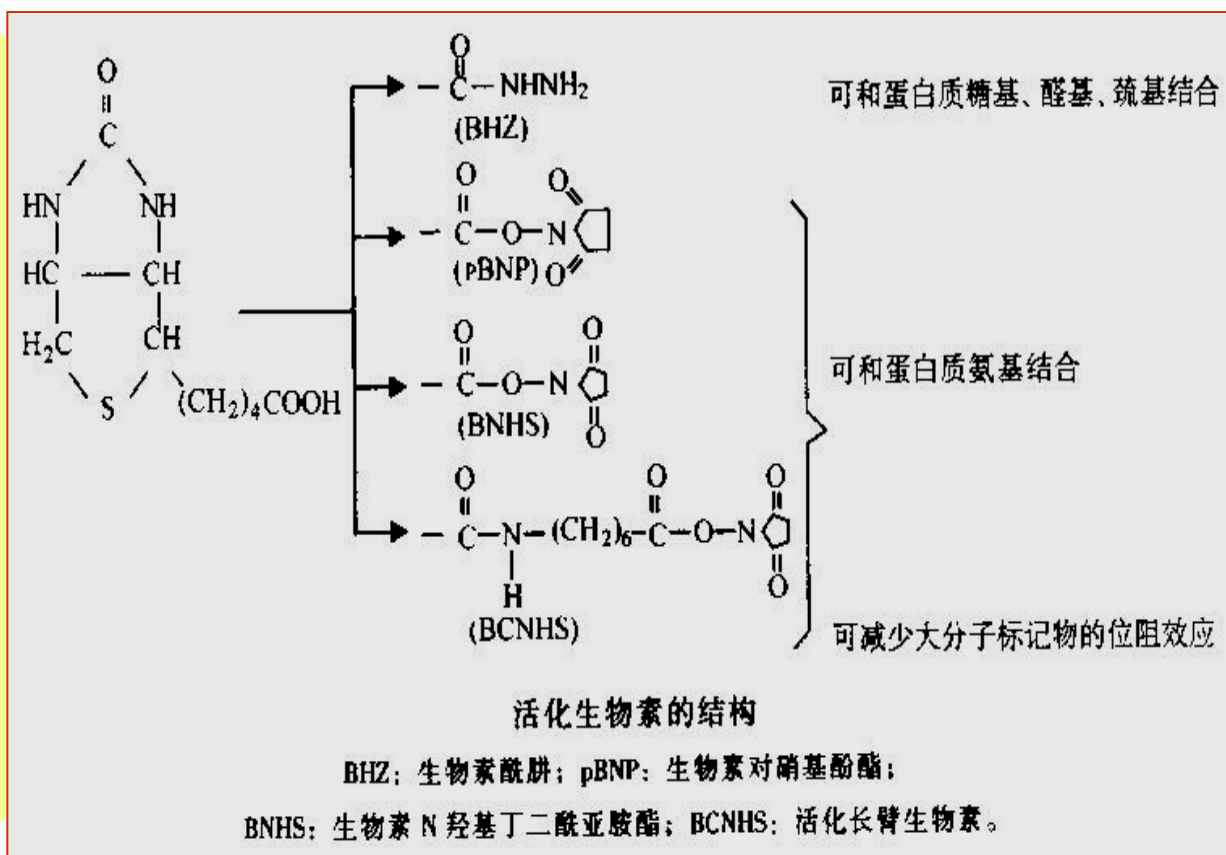
- 维生素H
- 动、植物组织中广泛分布, 卵黄和肝含量高
- MW 244.31kD.

- I环为咪唑酮环, 可与亲合素结合
- II环为噻吩环, C2上戊酸侧链的末端羧基是结合生物大分子的唯一结构



一、活化生物素

生物素侧链的末端羧基经化学修饰后制成带各种活性基团的衍生物—活化生物素（生物素化衍生物）



生物素活化

活化生物素易与抗原、抗体酶及核酸分子中相应基团偶联形成生物素化标记物

标记蛋白质**氨基**的活化生物素

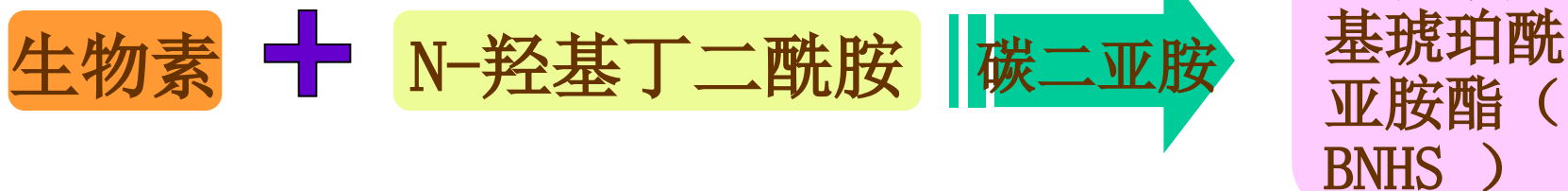
标记蛋白质**醛基**的活化生物素

标记蛋白质**巯基**的活化生物素

标记**核酸**的活化生物素

活化生物素

标记蛋白质氨基的活化生物素



- BNHS分子可与蛋白质赖氨酸的氨基形成肽键
- BNHS适用标记抗体和中性或偏碱性的蛋白质

如何减小空间位阻？

- 长臂活化生物素 (BCNHS) : 生物素和N-羟基丁二酰亚胺之间添加了两个6-氨基己糖分子基团，形成连结臂，生物素与大分子基团的距离

标记蛋白质醛基的活化生物素

生物素酰肼(BHZ)：水合肼与生物素的合成物
主要用于标记偏酸性糖蛋白

肼化生物胞素(BCHZ)：生物素与赖氨酸连接
后，再与无水肼反应而成。

除醛基外， BCHZ还可标记氨基

标记蛋白质巯基的活化生物素

马来酰亚胺-丙酰-生物胞素 (MPB)

能特异地与蛋白质巯基结合的活化
生物素

标记核酸的活化生物素

➤ 光生物素 (photobiotin)

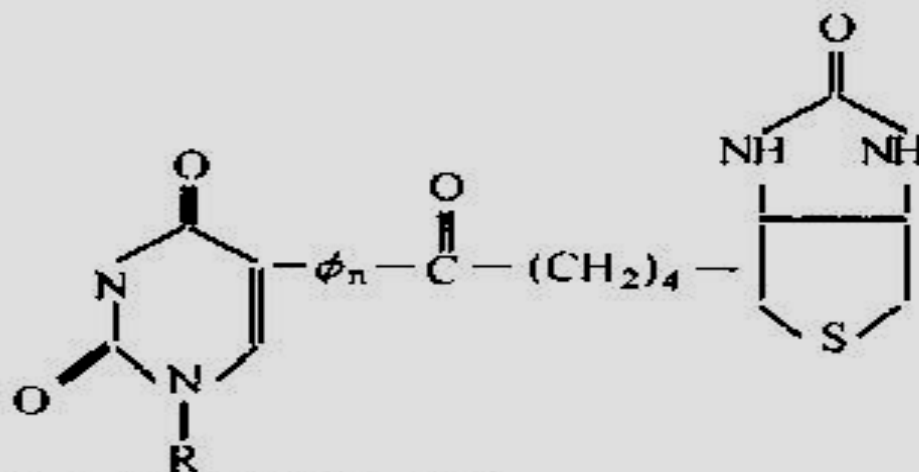
侧链上连接的芳香基叠氮物基团，经光照后，变为芳香基硝基苯，可直接与腺嘌呤氨基结合，形成B-核酸探针

➤ 生物素脱氧核苷三磷酸 (Bio-dUTP)

作为TTP的结构类似物，可采用缺口移位法掺入到双链DNA中。

➤ BNHS和BHZ

可直接标记核酸，但对碱基配对有影响。



R: 三磷酸脱氧核糖基

Bio-4-dUTP: $\phi_4 = -CH=CHCH_2NH-$

Bio-11-dUTP: $\phi_{11} = \phi_4 - \overset{\text{O}}{\parallel}{C} - (CH_2)_5 - NH -$

生物素化 dUTP 结构示意图

二、生物素标记蛋白质

- 活化生物素通过侧链与蛋白分子连接；
- 一个蛋白分子可被多个生物素标记—多价性；
- 对BNHS多标记抗体，BHZ则多标记微酸性抗原；
抗原、抗体标记后活性不变；
- 可对标记材料（如酶）标记：碱性磷酸酶标记后活性将降低；

- **选择活化生物素：**依抗原或抗体分子所带可标记基团的种类（氨基、醛基或巯基）以及分子的酸碱性；
- **控制生物素：蛋白质比例**
生物素：IgG 用量比(mg/mg)宜为2:1， IgG应用浓度0.5~5 μ g/ml； 生物素1~3个/Ag， 3~5个/Ab；
- **使用交联臂减少空间阻力**

第二节 亲合素、链霉亲合素的理化性质与标记

亲合素(avidin, AV) 和链霉亲合素(streptavidin, SA)是生物素的天然特异性结合物。而且，二者均为大分子蛋白，因此几乎所有用于标记的物质均可以同亲合素（AV）或链霉亲合素（SA）结合。

一、理化特性

亲合素 (A)

链霉亲合素 (SA)

结构	四亚基糖蛋白	四肽链蛋白 无糖基
PI	10.5	6
结合位	色氨酸	色氨酸
生物素	4	4
Ka	10^{15}	10^{15}
活性	13~15	15~18

第三节 生物素-亲合素系统的特点

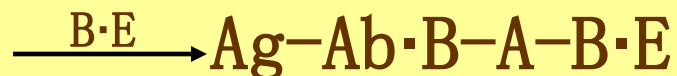
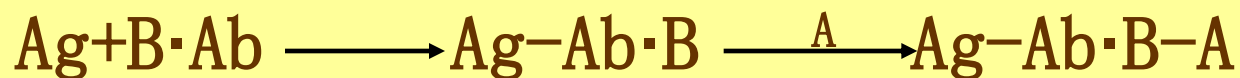
- 一、灵敏度
- 二、特异性
- 三、稳定性
- 四、适用性
- 五、其他

第四节 生物素-亲合素系统的应用

生物素与亲合素之间结合的亲合力高、特异性强，各自均可以与各型大小分子结合，以及二者在结合反应时具有的多级放大作用等优越性，使BAS及其相关技术被广泛应用在各种标记免疫分析技术领域，尤其为标记免疫检测自动化分析做出了极大的贡献。

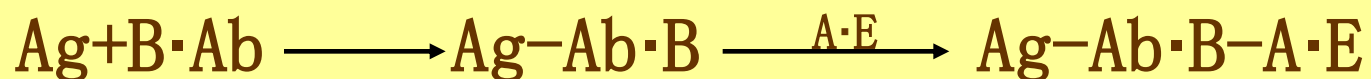
一、生物素-亲合素系统基本类型及原理

BAB法:



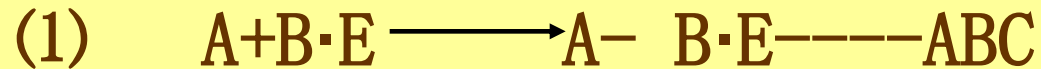
特点：以游离A分别连接B-Ab和B-E

BA法



特点：以A-E/SA-E代替BAB法中的A，省
却了加B-E的步骤

ABC法



特点: 将BAB法中的A先与B-E结合, 制备成复合物ABC

二、生物素-亲合素系统在酶免疫测定中的应用

BAS在ELISA中的应用

生物素-亲合素系统在均相酶免疫测定

三、生物素-亲合素系统在荧光免疫技术中的应用

BAS用于荧光抗体技术，通常采用BA法，即用荧光素直接标记亲合素（或链酶亲合素）；也可采用游离亲合素（或链酶亲合素）搭桥，两端分别连接生物素化抗体和荧光素标记的生物素（BAB法）或荧光标记的抗亲合素（或链酶亲合素）抗体的夹心法。

四、生物素-亲合素系统在放射免疫测定中的应用

BAS主要与免疫放射分析(IRMA)检测体系偶联，用于对终反应的放大(BA法)

BAS也可用于IRMA反应后B、F成分的分离

五、生物素-亲合素系统在分子生物学中的应用

以生物素标记核酸探针进行的定位检测

用BAS制备的亲和吸附剂进行基因的分离纯化

将免疫测定技术与PCR结合建立免疫-PCR(immuno-PCR)用于抗原的检测