

使用说明书

Instruction Manual

TargetMol
YOUR TARGET MOLECULES

NHS 磁珠 (2 μm) Mag Beads NHS (2 μm)

产品描述

TargetMol NHS 磁珠 (2 μm) 表面为 NHS 基团修饰, 能够与带有伯胺基团的蛋白和其他分子形成稳定的肽键, 用于亲和纯化抗体、抗原和其他生物分子。与传统的羧基、氨基磁珠相比, 表面含 NHS 基团的磁珠无需事先采用 EDC/NHS 或戊二醛进行活化, 只需简单地将含伯氨基的生物配体溶解在溶解于偶联缓冲液中, 室温下将蛋白与 NHS 磁珠混合 1~2 h 便可将生物配体共价偶联到磁珠上。磁珠偶联过程必需在不含任何氨基的缓冲溶剂中进行。人工操作时, 使用磁性分离架实现磁珠与溶剂分离。也可采用自动化设备操作, 自动化操作适合用于多样品的筛选。

产品特点

- 简便, 无需活化, 可直接与生物配体共价偶联。
- 高效, 生物配基偶联效率可达 90% 以上, 大大高于羧基磁珠, 同时配基的结合载量更高。
- 快速, 1~2 h 便可完成生物配基偶联。
- 温和, 室温或 4°C 偶联, 偶联体系 pH 为 5~9。
- 稳定, 形成稳定的酰胺键, 防止配基脱落。
- 良好的生物相容性, 减少非特异性吸附。

不同链霉亲和素磁珠的比较

产品名称	C0098	C0100	C0102	C0103
平均粒径	300 nm	2 μm	10-30 μm	30-150 μm
磁珠基材	聚合物		琼脂糖	
配基	N-羧基琥珀酰亚胺			
配基密度	-		20~30 $\mu\text{mol/mL}$ 磁珠	
结合能力*	$\geq 30 \mu\text{g}$ 兔 IgG/mg 磁珠		20~30 mg 兔 IgG/mL 磁珠	
磁珠悬液浓度	10 mg/mL		20% (V/V)	
保存溶液	DMAC		无水异丙醇	

*磁珠与配体的结合能力与生物配体的本身特性相关, 此处仅为参考值。

产品应用

- 适用于含伯氨基的蛋白、抗体、酶、多肽、核酸等生物分子的共价偶联。
- 体外诊断: 可以快速、准确地检测疾病标志物。
- 免疫检测: 磁珠与抗体结合用于捕获和检测特定抗原。
- 细胞分选: 磁珠可以与特异性抗体偶联, 通过磁性分离技术, 从复杂的细胞混合物中分选出目标细胞。
- 免疫沉淀/共沉淀: 可以捕获和富集特定蛋白质或核酸。
- 蛋白/抗体分离纯化: 磁珠具有高效的结合能力和低非特异性吸附, 用于纯化特定蛋白质或抗体, 提高目标物质的纯度和回收率。

自备试剂

试剂	可选配方
Washing Buffer A	1 mM 盐酸, 使用前预冷至 4°C
Coupling Buffer A	100 mM 2-吗啉乙磺酸 MES, pH 4.8 (用于等电点小于 7 的生物分子的偶联)
Coupling Buffer B	200 mM NaHCO_3 , pH 8.3 (用于等电点大于 7 的生物分子的偶联)
Blocking Buffer	3 M 乙醇胺, pH 9.0
Storage Buffer	1×PBS, 可根据需求添加 0.1% proclin-300 或 0.05% 叠氮化钠

1. **磁珠洗涤:** 磁珠洗涤步骤应严格遵循说明书的指示, 使用冷却的 Washing Buffer A 进行快速洗涤, 以防止在洗涤过程中 NHS 基团发生水解, 影响后续偶联效果。
2. **蛋白偶联中的 Coupling Buffer 选择:** 蛋白偶联时, 首先需要通过实验筛选出合适的 Coupling Buffer。可选择的缓冲液包括: Coupling Buffer A、Coupling Buffer B、50 mM 硼酸溶液 (pH 8.5)、以及 100 mM 磷酸缓冲液 (含 100 mM NaCl, pH 7.4) 这四种。根据实验结果确定最适合的缓冲体系, 以确保高效的偶联反应。

3. **蛋白浓度选择:** 在确定了合适的 Coupling Buffer 后, 还需要调整蛋白溶液的浓度。蛋白浓度越高, 偶联到磁珠上的蛋白量越大。这是因为 NHS 基团与蛋白的偶联反应和 NHS 基团的水解反应同时进行, 需要找到最佳平衡点。当然, 这要根据使用需求进行优化。如果只需要偶联少量蛋白, 使用低浓度蛋白即可满足需求, 从而降低成本。
4. **封闭步骤:** 在封闭步骤中, 可以使用试剂盒提供的 3 M 乙醇胺, 或选择 Tris 缓冲液 (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) 进行封闭, 封闭时间不得少于 2 h。如果化学封闭后背景信号依然较高, 可以在封闭后额外添加 BSA 封闭步骤以进一步降低非特异性吸附。

操作说明

以下为基于 500 μ L Mag Beads NHS 磁珠样品的操作步骤, 用户可根据实验需求按比例调整:

1. 蛋白溶液配制

- 1) 用 Coupling Buffer 将待偶联蛋白溶解, 配制浓度为 0.1-3.0 mg/mL 的蛋白溶液 (若使用 Magrose Beads NHS, 则浓度应 \geq 3.0 mg/mL)。
- 2) 对于已经储存在 buffer 中的蛋白, 需先透析或脱盐, 去除含伯氨基的物质后, 再用 Coupling Buffer 配制蛋白溶液。
- 3) 将配制好的蛋白溶液保存在 4°C 备用。
注: a) 蛋白浓度 \geq 2.0 mg/mL 有助于提高偶联效率, 需综合考虑成本与使用需求。b) 蛋白溶液中应避免含有带伯氨基的成分, 如 Tris、甘氨酸、明胶、BSA 等。

2. 磁珠清洗

- 1) 将磁珠用漩涡振荡器振荡充分混匀, 然后使用移液器吸取 500 μ L 磁珠悬液置于 1.5 mL EP 管中。
- 2) 将 EP 管放入磁性分离器, 静置 1 min, 进行磁性分离, 吸去上清液, 取下 EP 管。
- 3) 向 EP 管中加入 1 mL 2~8°C 的 Washing Buffer A, 涡旋混匀 15 s。进行磁性分离, 吸去上清液。
注: NHS 基团易水解, 应先预冷 Washing Buffer A, 再进行洗涤。

3. 蛋白质固定

- 1) 向洗涤后的磁珠中立即加入 500 μ L 蛋白溶液, 涡旋混匀 30 s。
注: 需预先配制蛋白溶液, Washing Buffer A 洗涤完毕后, 应立即加入蛋白溶液进行偶联反应。
- 2) 将 EP 管涡旋 15 s, 置于垂直混合仪上, 室温混合 2 h。为确保均匀反应, 可在反应前 30 min 内, 每 5 min 取下 EP 管涡旋混匀 15 s。之后, 每 15 min 取下 EP 管涡旋混匀 15 s。
注: 若需要, 可以在 4°C 下过夜反应。
- 3) 进行磁性分离, 保留流穿液以备分析。

4. 磁珠封闭

- 1) 向 EP 管中加入 500 μ L Blocking Buffer, 涡旋 30 s, 进行磁性分离, 吸去上清液。
- 2) 重复上述封闭操作 4 次。
- 3) 加入 500 μ L Blocking Buffer, 涡旋混匀 30 s, 将 EP 管置于垂直混合仪上, 室温反应 2 h。
- 4) 进行磁性分离, 吸去上清液。
- 5) 向 EP 管中加入 1 mL 超纯水, 混合均匀后进行磁性分离, 吸去上清液。

5. 磁珠保存

- 1) 向 EP 管中加入 1 mL Storage Buffer, 充分混合, 进行磁性分离, 吸去上清液, 重复此操作 2 次。
- 2) 最后, 加入 500 μ L Storage Buffer, 混合均匀后, 将磁珠储存在 4°C 备用。
注: 最终偶联蛋白的磁珠浓度为 10 mg/mL (若使用 Magrose Beads NHS, 则为 20% (V/V))。

保存条件

4°C, 1 年。

注意事项

1. 避免对磁珠进行冷冻、干燥和高速离心等操作。
2. 为了减少磁珠的损失, 每次磁性分离的时间不应少于 1 min。
3. 从磁珠保存管中取出磁珠之前, 应充分震荡以确保均匀悬浮。操作过程中注意避免产生气泡。
4. 建议使用质量较好的移液器吸头和反应管, 以避免因磁珠和溶液附着而造成损失。
5. 磁珠与溶液混合过程中, 如果溶液粘稠导致翻转离心管无法重悬磁珠, 可以使用移液器吹打或瞬时漩涡混合, 使磁珠充分重悬。
6. 磁珠对水分敏感。为了保证产品质量, 在取样之后需立即盖上瓶盖, 并用封口膜密封, 于 4°C 保存。
7. 由于 NHS 基团在 280 nm 处有吸收峰, 磁珠偶联蛋白的结合量不能通过 OD280 测定, 可使用 BCA 试剂盒 (C0050) 进行测定。
8. 蛋白稳定剂 (如 BSA, gelatin) 会抑制抗体与磁珠的结合, 因此在磁珠偶联抗体过程中, 需要确保抗体保存体系中不存在含伯氨基的蛋白稳定剂。
9. 缓冲液中含有带伯胺的物质会抑制蛋白质偶联到磁珠表面, 去除伯胺物质可采用透析和脱盐的方法。
10. 蛋白质和磁珠的偶联效率因蛋白质种类和性质差异而不同。一般而言, 蛋白质浓度为 \geq 3.0 mg/mL 时利于蛋白质偶联, 对于不同的蛋白其浓度需要优化。
11. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
12. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

