

使用说明书

Instruction Manual

TargetMol
YOUR TARGET MOLECULES

NHS 琼脂糖磁珠 (10-30 μm)

Magrose Beads NHS (10-30 μm)

产品描述

TargetMol NHS 琼脂糖磁珠 (10-30 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。

