

Antibody Coupling Kit A

(适用于羧基磁珠与抗体的偶联)

修订日期：2021年1月 (Rev. 001)

仅供科研使用，不可用于治疗 and 诊断用途。

缓冲液套装组分与储存条件

储存条件 缓冲液套装中的各组分均应存储于2 – 8 °C下。

套装组分 缓冲液套装中各组分见下表：

组分名称	体积
Buffer AC	65 mL
Buffer KA	11 mL
Buffer QA	25 mL
Buffer SA	11 mL
Buffer WA	50 mL

适用范围 仅供科研使用。不可用于人和动物的治疗与诊断。

产品描述

关于该套装

概述

纳微的Antibody Coupling Kit A缓冲液套装用于将抗体共价偶联到羧基磁珠表面。该套装同样可用于将其他蛋白类生物配基（酶、大分子抗原、凝集素等）与羧基磁珠进行共价偶联。偶联后的磁珠可用于多种应用场景，包括但不限于免疫检测、免疫沉淀与共沉淀、细胞免疫分离等。

该套装既适用于纳微的MagneStar® MP-COOH系列磁珠，也可与其他品牌的羧基磁珠配合使用。

该套装的优点

- 此套装的偶联工艺稳定性高，重复性好，所制备的磁珠试剂具有极小的批间差异。
 - 优化的偶联与封闭条件可有效降低磁珠表面的非特异性吸附，提高检测灵敏度。
 - 优化的清洗条件能够去除磁珠表面弱吸附的抗体，避免储存过程中磁珠表面配基的脱落。
-

使用方法

影响偶联反应的因素

抗体（或其他配基）的影响

选择合适的抗体是保证后续免疫实验成功最为关键的因素。

注意！ 不是所有的抗体对所有的免疫实验都适用。

另外，当抗体偶联到磁珠表面后，抗体的性质（亲合力、稳定性、动力学等）都会发生变化，必须根据具体的实验要求对偶联后的试剂性能进行验证。

磁珠的表面性质

- 羧基磁珠进行偶联时，表面的羧基先与EDC和sulfo-NHS反应得到活化的酯类中间体，再与抗体上的氨基反应实现抗体与磁珠的共价偶联。
 - 羧基磁珠活化后表面带负电荷，因此抗体上正电荷密度较高的区域会优先结合到磁珠表面。这会影响抗体偶联的效率以及在磁珠表面的活性。
 - 羧基磁珠表面的基团密度也会影响偶联后抗体的活性，过高的羧基密度往往不利于保持抗体的活性。
-

抗体储存的添加剂

- 商业化的抗体中往往会带有添加剂以提高其存储稳定性。
 - 一般而言，防腐剂类（叠氮化钠、Proclin®、硫柳汞）不会影响抗体与磁珠的偶联，而高比例的甘油最好事先去除，因为过高的溶剂粘度会影响偶联效率。
 - 如果抗体储存液中有BSA之类蛋白稳定剂，则必须事先去除，避免其与抗体竞争磁珠表面的反应位点。
-

影响偶联反应的因素（续）

抗体的用量

- 一般初始的推荐用量为每mg磁珠加入10 - 30 μg 抗体。最佳用量需要根据不同的抗体及后续实验要求进行优化。
 - 增加抗体的用量有助于提高磁珠表面的偶联量，但同时也会降低偶联效率，增加成本。
 - 若抗体用量过低，则偶联后的磁珠整体反应性不足，同时暴露的表面有可能导致非特异性吸附。
 - 若抗体用量过高，除偶联效率下降外，还可能在表面产生非共价的弱吸附，有可能在储存过程中从表面脱落。
-

抗体性质的差异

不同的抗体自身性质的差别很大，这种差别包括等电点、亲疏水性（溶解度）、对抗原的亲合力、结合动力学常数、存储稳定性等。

这些性质的差异会影响偶联效率、偶联后的抗体反应性以及存储稳定性等。

抗体的聚集与脱落

某些抗体在存储过程中有可能产生部分聚集。聚集的抗体偶联到磁珠表面后，在存储过程中可能会出现脱落。

为避免出现这种问题，建议用0.2 μm 的PES材质的滤膜过滤后使用。

偶联流程

概述

以下流程适用于将抗体（或其他蛋白类配基）偶联到羧基磁珠表面。若使用纳微的MagneStar® MP-COOH系列磁珠，则整个套装可以用于总共100 mg磁珠的偶联反应。若使用其他品牌的羧基磁珠，磁珠用量需要进行相应的调整。

其他需另外准备的材料

- MagneStar® MP-COOH或者其他品牌的羧基磁珠
 - 需确保抗体中不含有蛋白类稳定剂，抗体的浓度一般不低于1 mg/mL
 - 配合反应容器使用的磁力架
 - 旋转混匀仪（注意不要带有磁性）
 - EDC与sulfo-NHS
 - pH调节到9.0的去离子水
-

偶联反应的规模

下列偶联反应条件对应的磁珠用量为100 mg。其他反应规模可等比例调节各步骤中缓冲液及试剂用量。

偶联反应前的准备

- 将整个缓冲液套装从冷藏室取出，在室温下平衡30分钟以上。
 - 将磁珠分散液从冷藏室取出，在室温下于混匀仪上混匀30分钟以上。
 - 将EDC及sulfo-NHS两种试剂取出，在室温下平衡30分钟以上。
-

偶联反应过程

1. 移取适当体积的磁珠分散液（其中磁珠总量为100 mg），置于磁力架上磁吸分离，移去上清液，加入10 mL pH 9.0的去离子水，涡旋混匀30秒，超声1分钟，然后磁吸分离，去除上清液。此过程再重复2次，总共3次。
-

偶联流程（续）

偶联反应过程（续）

2. 再加入Buffer AC 10 mL，涡旋30秒，超声1分钟，然后磁吸分离，去除上清液。重复上述过程1次。
 3. 用Buffer AC配制浓度为10.9 mg/mL的Sulfo-NHS溶液，sulfo-NHS的称量量不低于12 mg。待Sulfo-NHS固体充分溶解后。量取9 mL加入到步骤2的磁珠中，充分混匀。
 4. 用上述配制好的含Sulfo-NHS的Buffer AC配制浓度为10 mg/mL的EDC缓冲液，EDC的称量量不低于11 mg。待EDC充分溶解后，取1 mL加入上述磁珠溶液中。充分混匀，在混匀仪上室温（22 - 28 °C）反应30分钟。
 5. 将活化后的磁珠磁吸分离，加入Buffer AC 10 mL，涡旋30秒，超声1分钟后分离磁珠，此步骤再重复2次。
 6. 向清洗后的磁珠加入相应浓度的抗体溶液（推荐抗体与磁珠的浓度比例为10 - 30 ug/mg，视客户需求而定），充分混匀，然后置于混匀仪上，在室温下反应2小时。
 7. 反应完成后，磁吸分离磁珠，向其中加入Buffer KA 10 mL，涡旋30秒，超声1分钟，使磁珠充分混匀，然后置于混匀仪上，在室温下反应30分钟。
 8. 孵育完成后，磁吸分离磁珠，向其中加入Buffer QA 10 mL，涡旋30秒，超声1分钟，使磁珠充分混匀，然后置于混匀仪上孵育3分钟。
 9. 磁吸分离磁珠，向其中加入Buffer SA 10 mL，涡旋30秒，超声1分钟，使磁珠充分混匀，然后置于混匀仪上孵育3分钟。
 10. 磁吸分离磁珠，向其中加入Buffer QA 10 mL，涡旋30秒，超声1分钟，使磁珠充分混匀，然后置于混匀仪上孵育3分钟。
 11. 完成上述封闭步骤后，磁吸分离磁珠，用Buffer WA清洗4次，每次10 mL，再加入Buffer WA 10 mL，在2 - 8°C下孵育过夜后备用。
-

偶联流程（续）

长期储存条件

在Buffer WA中保存的已包被抗体（蛋白）的磁珠在2 - 8 °C条件下可保存6个月。如需更长的存储有效期，可以向储存缓冲液中加入Proclin®系列抑菌剂，总浓度在 0.05 - 0.1% w/v。

注意事项

偶联抗体后的磁珠有效期必须通过实验验证来确定。并非所有的抗体都适合长期储存于冷藏条件下。

在预期的有效期及对应的储存条件下，应定期取出小量试样，在实际应用场景中进行性能测试。

适用的磁珠产品

相关产品

纳微的下列羧基磁珠产品均可配合该缓冲液套装使用：

目录代码	产品名称	标称粒径	固含量	标准包装
MPHCC-150	MagneStar MP1-COOH	1.5 μm	2.0%	5/25/ 100 mL
MPHCC-300	MagneStar MP3-COOH	3.0 μm	2.0%	
MPHCC-550	MagneStar MP5-COOH	5.5 μm	2.0%	

苏州纳微科技股份有限公司

全球客户服务热线：400-828-1622 电话：0512-6295 6000(805) 传真：0512-6295 6018

地址：苏州市工业园区百川街2号 网址：www.nanomicrotech.com 邮箱：lifesci@nanomicrotech.com

