

NHS Magnetic Beads

保存: 2~8℃保存, 有效期1年。

产品说明:

Mag NHS 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试剂盒自带的 Coupling Buffer 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, 具有操作简单、偶联条件温和、生物配体偶联快速高效等优点。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。

产品信息:

1. 需准备的试剂

序号	试剂名称	备注
1	Washing Buffer A	1mM 盐酸, 使用前冷却到 4℃
2	Coupling Buffer A	100mM 2-吗啉乙磺酸 (MES), pH4.8 (用于等电点小于 7 的生物分子的偶联)
3	Coupling Buffer B	200mM NaHCO ₃ , pH8.3 (用于等电点大于 7 的生物分子的偶联)
4	Blocking Buffer	3M 乙醇胺, pH9.0
5	Storage Buffer	1xPBS, 可根据需求添加 0.1% Proclin-300

2. 磁珠基本信息

磁珠基材	交联磁性琼脂糖微球
磁珠粒径	30 μm ~150 μm
配基	N-羟基琥珀酰亚胺
配基密度	20~30 μmol/mL 磁珠
结合能力	20~30 mg 兔 IgG/mL 磁珠
磁珠悬液浓度	20% (v/v) 磁珠悬液
保存液	无水异丙醇

注 1: 磁珠与配体的结合能力与生物配体的本身特性相关, 此处仅做参考值。

注 2: 1 mL 磁珠悬液中含有 200 μL 磁珠。

蛋白偶联操作流程及优化点

1. 蛋白溶液的配制

2. 磁珠的洗涤

3. 蛋白偶联：（优化）

(1) Coupling Buffer 的种类。首先通过实验确定最合适的 Coupling Buffer

(2) 确定合适的 Coupling Buffer 后，再通过实验优化蛋白溶液的浓度

4. 封闭

5. 磁珠保存

6. 注意事项：

(1) 其中磁珠洗涤要严格按照说明书采用冷却的 Washing Buffer A 快速洗涤，以防磁珠在洗涤过程中 NHS 基团水解；

(2) 蛋白偶联过程中，首先要通过实验确定合适的 Coupling Buffer（主要包括 Coupling Buffer A、Coupling Buffer B、50 mM 硼酸溶液，pH 8.5、100 mM 磷酸缓冲液，100 mM NaCl，pH 7.4 这四种）；

(3) 确定合适的 Coupling Buffer 后，再以此 Coupling Buffer 为基础，确定合适的偶联蛋白浓度，因为蛋白浓度越高，偶联到磁珠上的蛋白的量会越大（这是由于 NHS 基团跟蛋白偶联和 NHS 基团本身水解是一对竞争反应）。当然此处要综合考虑使用性能和成本，有些客户偶联少量的蛋白便可满足使用需求，这时采用低浓度的蛋白便可，这样可以降低成本。

(4) 封闭这一步可以采用试剂盒中自带的 3 M 乙醇胺，也可使用 Tris 缓冲液（100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0），封闭时间不得低于 2 h，如果化学封闭后背景仍然很高，还可以额外加一步 BSA 封闭。

蛋白偶联操作步骤

以下操作过程以取磁珠样品 500 μ L，采用 1.5 mL EP 管为例介绍。用户可根据自身需求按比例调整：

1. 蛋白溶液配制：

取适量待偶联蛋白用 Coupling Buffer 溶解，配成浓度为 ≥ 3.0 mg/mL 的蛋白溶液。已经保存于 buffer 中的蛋白，需要通过透析或者脱盐的方法彻底除去原有 buffer 里含伯胺基的物质，然后再用 Coupling Buffer 配成浓度为 ≥ 3.0 mg/mL 的蛋白溶液，将配制好的蛋白溶液于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

注：(1)为了达到更好的性能，蛋白浓度 ≥ 3.0 mg/mL，这样偶联效率会更高，此处需综合考虑成本和使用要求；

(2)蛋白溶液中不能含有带伯氨基的成分，比如 Tris，甘氨酸，明胶，BSA 等；

2. 磁珠清洗

1) 取 500 μ L 20%的磁珠悬浮液于 1.5 mL EP 管中。

注：磁珠取样前要反复颠倒、使用涡旋振荡器使其混合均匀，以保证实验的同一性，每取一次样需要重新混匀。

2) 将 EP 管置于磁性分离架内，富集磁珠，去除上清液。

3) 加 1 mL 2~8 $^{\circ}$ C 的 Washing Buffer A 于离心管中，涡旋 15 s，使磁珠混合均匀。

4) 将 EP 管置于磁性分离架内，富集磁珠，去除上清液。

3. 蛋白质固定

1) 加 200 μ L 蛋白溶液于 EP 管中，涡旋 30 s，使其混合均匀。

注：磁珠洗涤后要立即加入蛋白溶液。

2) 将 EP 管涡旋 15 s，置于垂直混合仪上，室温混合 2~4 h。如果垂直混合不均匀，则反应前 30 min，每隔 5 min 取下 EP 管涡旋 15 s。此后，每隔 15 min，取下 EP 管涡旋 15 s。

注：如有需要可以在 4°C 反应过夜。

3) 采用磁性分离架富集磁珠，保存流穿液。

4. 磁珠封闭

1) 加 1 mL Blocking Buffer 于 EP 管中，涡旋 30 s，将 EP 管置于磁性分离架内，富集磁珠，弃上清液。

注：Blocking Buffer 除了试剂盒中提供的 3 M 乙醇胺外，也可以使用 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl,

pH 8.0 等其它封端试剂。

2) 重复“步骤 4-1”四次。

3) 加 1 mL Blocking Buffer 于 EP 管中，涡旋 30 s，将 EP 管置于垂直混合仪中室温反应 2 h。

4) 将 EP 管置于磁性分离架内，富集磁珠，弃上清液。

5) 加 1 mL 超纯水于 EP 管中，充分混合，用磁力架富集磁珠，弃上清液。

5. 保存

1) 加 1 mL Storage Buffer (比如含 0.05%叠氮化钠的 PBS 缓冲液，或者客户根据自己实际需求选择合适的保存溶液) 于 EP 管中，充分混合，用磁力架富集磁珠，弃上清液。重复该操作 2 次。

2) 加入 1mL Storage Buffer 于 EP 管中，充分混合，4°C 保存备用。

注：最终偶联蛋白的磁珠浓度为 10% (v/v)。

注意事项

1. 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。

2. 禁止将磁珠干燥或冷冻。干燥和冷冻操作可能导致磁珠的聚集从而丧失结合活性。

3. 可通过直接法 (BCA) 检测偶联到磁珠表面的蛋白含量。使用 280 nm 附近的波长来测定蛋白含量是不可取的，因为 NHS 基团在 280 nm 波长附近有很强的吸收，会严重干扰检测结果。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。

4. 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。

5. NHS 基团易水解，故在用 Washing Buffer A 洗涤时，一定要参照说明书进行。

6. 蛋白溶液要预先配制好，Washing Buffer A 洗涤完毕后，要立即加入蛋白溶液进行偶联反应。

7. 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 ≥ 3.0 mg/mL 时利于蛋白质偶联；然而，对于不同的蛋白其浓度需要优化。