

NHS Magnetic Beads

保存: 2~8°C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. 试剂盒的组成

序号	试剂盒组成	备注	数量
1	Beads Magnetic NHS	10mg/mL	1mL/5mL
2	Washing Buffer A	使用前冷却到 4°C	5mL/15mL
3	Coupling Buffer A	100mM 2-吗啉乙磺酸 (MES), pH4.8	5mL/15mL
4	Coupling Buffer B	200mM NaHCO ₃ , pH8.3	5mL/15mL
5	Blocking Buffer	3M 乙醇胺, pH9.0	10mL/30mL
6	Storage Buffer	1×PBS, 可根据需求添加 0.1% proclin-300	客户自备

2. 磁珠基本信息

注: 结合能力与生物配体本身特性有关, 此处仅做参考值。

产品信息	Mag NHS
粒径	~2μm
结合能力*	≥30μg 兔 IgG/mg
浓度	10mg/mL
保存溶液	DMAC

*注: 结合能力与生物配体本身特性有关, 此处仅做参考值。

蛋白偶联操作流程及优化点（仅供参考）

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、50mM 硼酸溶液，pH 8.5、100mM 磷酸缓冲液，100mM 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（仅供参考）

一、使用前准备

以下操作过程以取磁珠样品 500 μ L，采用 1.5mL 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 0.1-3.0 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 0.1-3.0 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 \geq 2.0 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 磁珠于 1.5mL 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，以保证实验的同一次性。

(2) 将 EP 管置于磁性分离架内，富集磁珠，去除上清液。

(3) 加 1mL 2~8 $^{\circ}$ C 预冷的 Washing Buffer A 于 1.5mL EP 管中，涡旋 15s，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. 生物配体固定：

(1) 加 500 μ L 蛋白溶液于 EP 管中，涡旋 30s，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 15s，置于垂直混合仪上，室温混合 1~2 h。如果垂直混合不均匀，则反应前 30min，每隔 5min 取下 EP 管涡旋 15s。此后，每隔 15 min，取下 EP 管涡旋 15s。

注：如有需要可以 4 $^{\circ}$ C 过夜反应。

(3) 采用磁性分离架富集磁珠，保存流穿液

3. 磁珠封闭：

(1) 加 500 μ L Blocking Buffer 于 EP 管中，涡旋 30s，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 100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 8.0 等其它封端试剂。

(2) 重复“步骤 (1)”四次。

(3) 加 500 μ L 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 1mL 超纯水于 EP 管中，充分混合，用磁力架富集磁珠，弃上清液。

4. 保存：

(1) 加 1mL Storage Buffer (需客户自备，比如含 0.05%叠氮化钠或 0.1%proclin-300 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 0.5mL Storage Buffer 于 EP 管中，充分混合，4 $^{\circ}$ C 保存备用。

注：最终偶联蛋白的磁珠浓度为 10mg/mL。

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 $^{\circ}$ 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. 使用 280nm 附近的波长来测定蛋白含量是不可取的，因为 NHS 基团在 280nm 波长附近有很强的吸收，会严重干扰检测结果。
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. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 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 0.1-3.0 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。