

# 二硫键固定专用磁珠 (MSP-MBA-F1)

## 产品简述

- 用 MSP-COOH-F1 羧基连接二硫键修饰基团制备，连接臂长于 11 个原子
- 二硫键还原和巯基共价修饰同步进行，固定表面含二硫键蛋白(天然抗体)
- 天然抗体接近化学计量地固定在磁珠表面，并达到饱和固定化的理论容量
- 天然抗体经二硫键修饰固定化后，与大分子反应更快、对大分子分离效价更高
- 悬浮稳定性好、非特异吸附低、磁分离响应速度快；偶联蛋白性能批间波动<6%

## 性能/规格

| 指标/特征  | 性能数据/性状                                    |
|--------|--|
| 保存液    | N, N-二甲基甲酰胺                                |
| 产品形态   | 有机溶剂中，混悬液                                  |
| 保质期    | 2~8 °C、产品不开封、避光保存，保质期不短于 4 周               |
| 蛋白偶联过程 | 二硫键还原和偶联同步进行，室温 45 min；简单快速                |
| 蛋白偶联容量 | 天然多抗饱和偶联仅需~10 mg/g 磁珠，约为 MSP-COOH-F1 的 60% |
| 分离效价   | 分离相同大分子抗原性能，不低于 MSP-COOH-F1 固定多抗的 1.4 倍    |
| 吸附反应速度 | 表面偶联抗体后，与大分子抗原的反应速度快于羧基磁珠偶联的抗体             |
| 非特异吸附  | 表面的活泼官能团按所推荐方案封闭后，对蛋白非特异吸附可忽略              |

## 应用过程示例

### 一、试剂、器械和设备

- 1、缓冲液：25 mM MES, pH 6.0；4 °C 保存(称预冷 MES 液)；如未说明，都为此 MES 液。
- 2、还原剂：用 MES 液配制三羧乙基磷储备液，4 °C 三周内用；稀释到 125 μM 后 1h 内用。
- 3、蛋白溶液：配制 0.3 g/L 蛋白(抗体)溶于预冷 MES 液，4 °C 保存，配制后 1h 内用。
- 4、MSP-MBA-F1 磁珠：剧烈漩涡震荡磁珠悬液，确保充分混匀；磁力保留磁珠去有机溶剂，用 MES 缓冲液洗磁珠三次；最后悬浮在 MES 缓冲液中，尽快使用。
- 5、封闭液：6.0 mM 巯基乙磺酸钠、巯基丙磺酸钠或半胱氨酸(调 pH 到 6.0)。
- 6、洗涤液：20 mM HEPES 或 Tris-HCl 缓冲液或磷酸钠(pH 7.4)，使用前恢复到室温。
- 7、保存液：20 mM HEPES 或磷酸钠，pH 7.4，加 0.09%叠氮钠，0.01%吐温 20，4 °C 保存。
- 8、机械搅拌装置、漩涡振荡器、四维混合仪、滚轴混合器、冰箱、加液器、EP 管等。

## 二、蛋白还原和偶联：1.0 mg MSP-MBA-F1 磁珠饱和偶联天然抗体仅需约 10 $\mu\text{g}$

- 1、将 MSP-MBA-F1 磁珠充分震荡混匀，取 3.3 mg 磁珠到 1.5 mL 离心管中，磁力保留磁珠去上清液；用 4  $^{\circ}\text{C}$  MES 缓冲液(pH 6.0)涡旋振荡洗 3 次，每次 200  $\mu\text{l}$ ；
- 2、磁力去上清，迅速加入 50  $\mu\text{l}$  MES，剧烈漩涡振荡重悬磁珠，加入蛋白溶液 100  $\mu\text{l}$ ，温和漩涡振荡混匀；再加入 50  $\mu\text{l}$  还原剂，温和漩涡振荡混匀，25  $^{\circ}\text{C}$ 在四维混合~45 min；
- 3、加 200 $\mu\text{l}$  封闭液，温和混匀保持磁珠悬浮；室温持续温和混合反应约 30 min；
- 4、磁力保留封闭后蛋白磁珠，去上清液；每次用 200  $\mu\text{l}$  洗涤液，用移液器吹打洗涤三次；
- 5、磁力保留蛋白磁珠，去上清液，再加入 330  $\mu\text{l}$  保存液，温和混匀；2 - 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

## 三、相关提示

- 1、以上为示例流程，适合大多数表面含二硫键蛋白在 MSP-MBA-F1 磁珠表面的偶联；
- 2、所用蛋白样品中切忌不能含有叠氮钠、巯基化合物、其它含二硫键的物质；
- 3、用 280 nm 吸收测定蛋白浓度与实际浓度通常有很大偏差；已知氨基酸序列及在 280 nm 消光系数的纯化重组蛋白，用 280 nm 吸收测定蛋白才可靠；针对不同的蛋白，最好以牛血清白蛋白为参考用考马斯亮蓝染料结合法测定蛋白浓度；
- 4、磁珠与蛋白的投料比、偶联反应的 pH、偶联反应时间、封闭液的选择等，对不同蛋白宜分别优化，以最大化所得磁珠蛋白加合物的分离性能；
- 5、针对不同蛋白及后续不同的测定系统，需优化蛋白保存液的成分；后续使用辣根过氧化物酶检测系统，则磁珠蛋白加合物的保存液中需不含叠氮钠类辣根酶抑制剂。

## 警示

1. 冷冻、干燥和离心都会引起磁珠团聚无法再分散，也就无法使用；
2. 示例适合多数天然抗体；对不同蛋白可调节MES缓冲液pH优化偶联；
3. 使用本产品前，务必充分振荡使磁珠成为均匀悬液，再去有机溶剂和洗涤；
4. 本产品易粘在移液器吸头和反应管；需避免因粘附磁珠而造成磁珠损失；
5. 产品保存液为有机溶剂，需回收单独处理；切记避免吞咽，必须远离儿童；
5. 本产品严禁用于人体，可用于研究及体外诊断。

## 附录 1: 蛋白二硫键固定磁珠产品规格和货号

| 产品名称                    | 产品型号       | 产品货号         | 规格     | 形式      | 到货周期                | 产品特征及应用描述   |
|-------------------------|------------|--------------|--------|---------|---------------------|---|
| 蛋白二硫键固定磁珠(适合天然抗体; 专利产品) | MSP-MBA-F1 | 18020106-10  | 10 mg  | 悬液, 塑料瓶 | 定制; 订单确认后, 五个工作日内发货 | 用MSP-COOH-F1羧基连接二硫键修饰官能团制备(连接臂11个原子), 适合固定表面有二硫键的蛋白(如天然抗体); 饱和偶联消耗抗体量低于Dynabeads Myone Carboxyl的60%, 也低于MSP-COOF-F1; 偶联的抗体吸附大分子抗原速度比羧基偶联抗体快, 分离效价更高 |
|                         |            | 18020106-20  | 20 mg  | 悬液, 塑料瓶 |                     |   |
|                         |            | 18020106-100 | 50 mg  | 悬液, 塑料瓶 |                     |   |
|                         |            | 18020106-200 | 100 mg | 悬液, 塑料瓶 |                     |   |

## 附录 2: 蛋白二硫键固定磁珠设计 and 应用过程优化

应用磁分离技术常需先将天然抗体固定在微米磁珠表面。经磁珠表面羧基活化后与抗体氨基反应、通过抗体的糖链氧化成醛后与磁珠表面氨基偶联等策略均适用。但磁珠表面氨基易氧化, 这类产品货架周期短而限制了其应用。料表面羧基活化固定化蛋白容易实施, 但优化过程耗时; 蛋白中含有很多氨基, 偶联过程中避免团聚成为优化的难点; 羧基活化后固定化抗体的取向随机化, 使部分固定化抗体因位阻而难以发挥作用, 且固定化抗体与大分子抗原的反应达到平衡需要较长的时间。显然, 选择天然抗体蛋白上远离抗原识别点的结构区域进行位点选择性共价固定化, 无疑更有利于获得高比活性的固定化抗体。

天然抗体表面有非必须二硫键且这些二硫键大多远离抗原结合位点; 将天然抗体二硫键还原, 再通过巯基参与的取代反应或加成反应进行共价修饰而固定化, 是一种有吸引力的天然抗体位点选择性固定化策略, 但这种策略至今未有产品应用。2-溴甲基丙烯酸是蛋白表面二硫键选择性共价修饰剂。公司产品 MSP-COOH-F1 表面有优良非特异吸附性能, 将其羧基衍生化后连接 2-溴甲基丙烯酸获得用于蛋白(天然抗体)二硫键位点选择性固定化的独特磁珠 MSP-MBA-F1, 此产品已获得中国发明专利授权(ZL201610963764.X, 授权日期 2017-10-17)。用 MSP-COOH-F1 连接 2-溴甲基丙烯酸制备 MSP-MBA-F1 的过程中进一步延长了连接臂, 使 MSP-MBA-F1 所偶联抗体位阻更小而分离效价更高、与大分子抗原反应速度更快。在选择性还原剂作用下, 天然抗体还原所得巯基反应活性高、在 MSP-MBA-F1 表面饱和固定化时抗体消耗量更低, 显著降低了天然抗体的消耗成本。数据详见附录 3。

但 2-溴甲基丙烯酸中有必需双键, 故 MSP-MBA-F1 货架周期短, 需要定制。本公司已设计了货架周期足够长的第二代蛋白二硫键固定化专用基团, 产品即将推出供测试。

## 附录 3: 蛋白二硫键固定磁珠性能表征

### S3.1 MSP-MBA-F1偶联天然多抗PolyAb(ECAP)后的悬浮稳定性

MSP-MBA-F1偶联天然多抗(PolyAb(ECAP))后, 悬浮在20 mM磷酸钠(pH 7.4)中, 调节570 nm消光为1.25; 监测室温下20 min内570 nm消光变化。结果表明(图S1), MSP-MBA-F1偶联抗体后的悬浮稳定性优于对应羧基磁珠, 且时间越长差异越大。

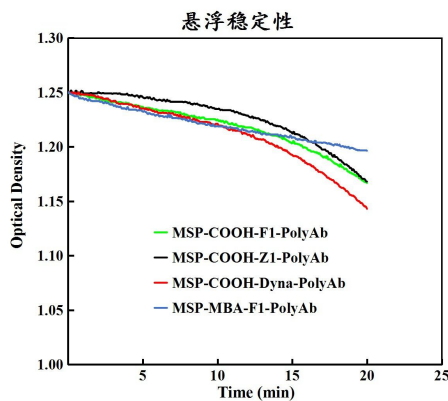


图 S1. 悬浮稳定性

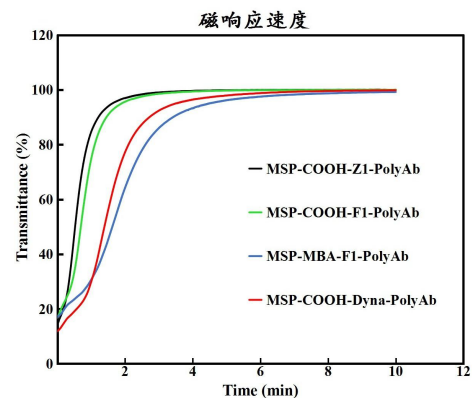


图 S2. 磁响应速度

### S3.2 MSP-MBA-F1 偶联天然多抗 PolyAb(ECAP)后的磁响应速度

MSP-MBA-F1偶联抗体后, 悬浮于20 mM磷酸钠 pH 7.4缓冲液且调570 nm透过率为10%或消光1.00。外加钕铁硼N35磁场, 连续监测透过率变化过程。结果表明(图S2), MSP-MBA-F1偶联抗体后磁响应速度, 与知名进口羧基磁珠产品偶联相同多抗相当。

### S3.3 MSP-MBA-F1 偶联天然多抗 PolyAb(ECAP)的投料比

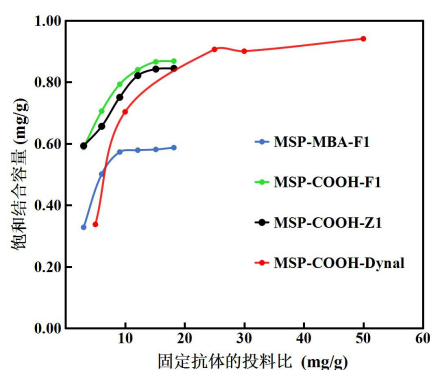


图 S3. 偶联多抗的投料比

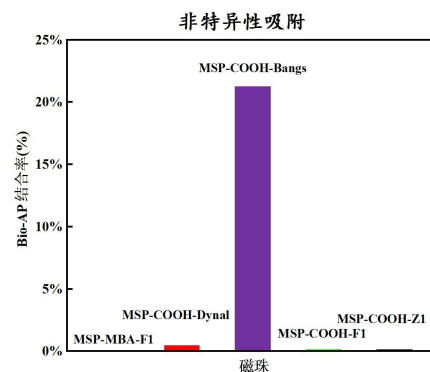


图 S4. 非特异性吸附

1.65 mg MSP-MBA-F1 洗涤后加 50  $\mu$ l MES, 剧烈漩涡振荡重悬磁珠, 加 20 mM MES (pH 6.0)溶解的不同量多抗, 温和漩涡振荡混匀; 再加入 50  $\mu$ l 还原剂, 温和漩涡振荡混匀, 25  $^{\circ}$ C持续混合反应约 45 min; 用 20 mM PBS (pH 7.4)缓冲液洗磁珠 3 次; 取 PolyAb(ECAP)磁珠 4.0  $\mu$ g, 加 1.0 M Tris-HCl (pH7.4)稀释的 300 ng ECAP, 室温吸附 30 min (吸附率<5%);



用4-硝基苯基磷酸酯测定吸附碱性磷酸酶活性(5.0 mM 显色底物, 二乙醇胺缓冲液, pH 9.8, 室温反应 30 min, 碱终止反应后测 405 nm 吸收增量)。结果表明(图 S3), MSP-MBA-F1 表面饱和偶联天然抗体的消耗量最小, 对应的应用成本更有优势。

### S3.4 MSP-MBA-F1偶联天然多抗PolyAb(ECAP)的非特异性吸附

15 μg MSP-MBA-F1, 加封闭液巯基丙磺酸钠直接封闭30 min, 再加1.0 M Tris-HCl (pH 7.4) 稀释的50 ng生物素修饰牛小肠碱性磷酸酶, 室温吸附30 min (吸附率<5%); 参照此前, 用4-硝基苯基磷酸酯测定吸附酶的活性。结果表明(图S4), 用推荐方法将MSP-MBA-F1表面二硫键修饰官能团封闭后, 其非特异吸附仍然低于常用的进口羧基磁珠。

### S3.5 MSP-MBA-F1 偶联天然多抗 PolyAb(ECAP)的分离效价

在1.0 M Tris-HCl (pH 7.4)中, 加不同量偶联多抗磁珠和相同40 ng ECAP; 25 °C持续四维混合吸附30 min; 磁分离吸附的ECAP, 用上述吸附缓冲液洗涤磁珠; 参照此前, 用4-硝基苯基磷酸酯测定吸附碱性磷酸酶的活性。结果表明(图S5), MSP-MBA-F1表面饱和偶联天然抗体对ECAP的分离性能更高。

### S3.6 MSP-MBA-F1 偶联天然多抗 PolyAb(ECAP)与吸附抗原的速度

用科斯迈SMART 6500全自动化学发光免疫分析仪, 调整吸附反应时间, 测定用不同磁珠偶联多抗后所吸附分离ECAP催化反应的发光信号。结果表明(见图S6), MSP-MBA-F1表面饱和偶联天然抗体对ECAP的吸附反应达到平衡仅需10 min, 显著短于用Dynabeads Myone Carboxyl偶联的相同多抗, 也短于MSP-COOH-Z1或MSP-COOH-F1偶联的相同多抗。

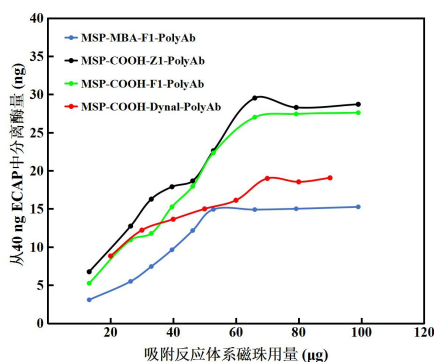


图 S5. 偶联抗体分离效价

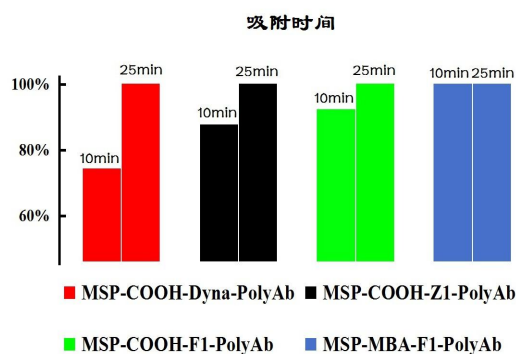


图 S6. 抗体磁珠吸附抗原时间