

# 羧基磁珠 (MSP-COOH)

## 产品简述

- 超顺磁  $Fe_3O_4$  颗粒(处于外部磁场时有磁性; 呈  $Fe_3O_4$  颗粒特有的黑色)
- 表面用小分子两性离子对进行多层共价修饰, 含大量带电基团故强亲水
- 表面亲水修饰过程中同步生成羧基官能团, 且有至少 6 个原子的线性连接臂
- 对水溶蛋白(无膜结合域大肠杆菌碱性磷酸酶)及疏水小分子非特异吸附可忽略
- MSP-COOH-Z1 羧基活化后, pH 6.0 时表面有少量负电荷; 高效偶联  $pI \leq 6.0$  蛋白
- MSP-COOH-F1 羧基活化后, pH 6.0 时表面有大量净负电荷; 高效偶联  $pI > 6.0$  蛋白
- 悬浮稳定性好、非特异吸附低、磁分离响应快; 偶联蛋白性能批间波动  $< 6\%$

## 性能/规格

指标/特征	性能/性状
保存液	20 mM 磷酸钠, pH 7.4, 0.09%叠氮钠, 0.1%抗氧化剂
产品形态	中性缓冲液, 混悬液
保质期	2~8 °C、不开封、避光保存; 保质期不短于 36 个月
可活化羧基	~27 $\mu\text{mol/g}$ 羧基磁珠 (DMF 中, 用过量 DCC 及 NHS 室温活化过夜的活泼酯量)
蛋白偶联量	~13.5 mg 链亲和素/g 羧基磁珠 (据水溶小分子显色探针量换算链亲和素量)
非特异吸附	对常见蛋白非特异吸附, 低于检测限 (检测方法详见附录)
亚型选择	MSP-COOH-Z1 偶联 $pI < 6.0$ 蛋白效力高; MSP-COOH-F1 偶联 $pI > 6.0$ 蛋白(天然抗体)效力高; 偶联控制在 pH 6.0 并降温, 避免偶联反应过快而出现团聚物

## 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(以下简称**预冷 MES 液**, 用于**活化及偶联**)。
2. **活化剂**: NHS 和 EDC 溶于上述 pH 6.0 的 MES 缓冲液、浓度都为 25 g/L; 1h 内用。
3. 蛋白溶液: 配制 0.6 g/L 蛋白(抗体)溶于预冷 MES 液, 4 °C 保存, 配制后 1h 内用。
4. 羧基磁珠 MSP-COOH: 使用前剧烈漩涡震荡磁珠悬液, 确保充分混合并**分散均匀**。
5. 封闭液: ~1% BSA, 或 0.5 M 牛磺酸, 或 1.0 M 甘氨酸, 溶于 pH 6.0 的 MES 液。
6. 洗涤液: 20 mM HEPES 或 Tris-HCl 缓冲液或 PBS, pH 7.4, 使用前恢复到室温。
7. 保存液: 20 mM HEPES 或 PBS, 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、羧基活化和蛋白偶联:

提示: 磁珠量为湿重; ~25  $\mu\text{g}$  单抗(考马斯亮蓝法测定)能饱和 1.0 mg 羧基磁珠

## 1 用 EDC 和 NHS 活化磁珠表面羧基

- 1) 将羧基磁珠剧烈漩涡震荡分散均匀，取 3.3 mg 羧基磁珠到 2.0 mL 圆底离心管中，磁力保留磁珠去上清液；用预冷 MES 缓冲液每次 200  $\mu$ l 剧烈漩涡振荡洗 3 次；
- 2) 磁力保留磁珠去上清，迅速加入 100  $\mu$ l NHS 溶液，立即剧烈漩涡振荡分散均匀；再加入 100  $\mu$ l EDC 溶液，立即剧烈漩涡振荡混匀；25  $^{\circ}$ C 在四维混合仪上持续混合 30 min，此期间隔 2 min 漩涡振荡混匀 1 次，直到反应停止；
- 3) 磁力保留磁珠去上清液，每次 200  $\mu$ l 预冷 MES 液剧烈振荡洗 2 次，尽快用于偶联蛋白。  
注意：如发现磁珠团聚，必需用漩涡混合仪剧烈振荡，或者超声分散磁珠后再使用。

## 2 蛋白与活化磁珠的偶联

- 1) 加入预冷 MES 液 100  $\mu$ l 剧烈漩涡振荡使活化磁珠重新分散均匀(确保磁珠无团聚，如需则剧烈漩涡振荡或超声分散)；准备 pH 6.0 MES 溶解的预冷蛋白液 100  $\mu$ l (~0.6 g/L)；将活化磁珠悬液分批转移到预冷蛋白液中(维持混悬液在 0~4  $^{\circ}$ C，降低蛋白偶联速度)；每次加入磁珠后，立即温和混匀(手指弹试管或温和漩涡震荡，以免团聚)；将活化磁珠与蛋白混悬液在 4  $^{\circ}$ C 温和混匀后，保持在此温度下 10~15 min 并间隔 3.0 min 混匀一次；最后，将混悬液转移到~25  $^{\circ}$ C 恒温并持续温和混合~90 min (此期间隔 5 min 温和混匀磁珠混悬液，但应避免剧烈振荡造成蛋白变性)，或维持在 4  $^{\circ}$ C，并温和混匀 2.5 h 以上；
- 2) 磁力保留磁珠去上清液；并迅速按下述步骤加入封闭液。

## 3 封闭表面未反应的羧基活泼酯

- 1) 加 200  $\mu$ l 封闭液，尽快温和混匀，室温混合反应约 30 min (三种候选封闭剂，也可同用)；
- 2) 磁力分离去上清液得封闭后蛋白磁珠；每次用 200  $\mu$ l 洗涤液，用移液器吹打洗涤三次；
- 3) 磁力分离去上清液，再加入 330  $\mu$ l 保存液，温和混匀；2~8  $^{\circ}$ C 保存备用。

## 三 应用提示

1. 以上为羧基活化偶联蛋白的建议流程，适用于多数蛋白与 MSP-COOH-Z1 偶联；按上述过程活化，磁珠表面羧基活化比例约 75%，活泼酯含量接近 20  $\mu$ mol/g；
2. 所用蛋白本身需确保有预期活性，且蛋白中应无小分子氨基化合物或叠氮钠；
3. 据蛋白等电点 (pI) 选择磁珠亚型(MSP-COOH-Z1 或 MSP-COOH-F1)；pI  $\leq$  6.0 的蛋白用 MSP-COOH-Z1 偶联效力高，pI  $>$  6.0 的蛋白用 MSP-COOH-F1 偶联效力高；
4. 磁珠表面饱和蛋白的投料比，对不同蛋白需分别优化，以提高加合物分离性能；
5. 已知 280 nm 消光系数可用 280 nm 吸收定量蛋白，否则用考马斯亮蓝染料法定量；
6. 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。

## 提示

1. 冷冻、干燥和离心都会引起磁珠团聚无法再分散，失去效用；
2. 在使用本产品前，请务必充分振荡混合，使磁珠悬浮均匀；
3. 移液器吸头和反应管，需避免因粘附磁珠而造成磁珠损失；
4. 产品保存液中含剧毒成分，切记避免吞咽，必须远离儿童；
5. 本产品严禁用于人体，仅适合用于研究及体外诊断。

### 附录 1 羧基磁珠的产品规格和货号

产品名称	产品型号	产品货号	产品规格	产品形式
羧基磁珠 (专利产品)	MSP-COOH-F1	18030106-0010g	0.50 mL*20 g/L (10 mg)	悬液, 塑料管
		18030106-0100g	5.0 mL*20 g/L (100 mg)	悬液, 塑料瓶
		18030106-0500g	25.0 mL*20 g/L (500 mg)	悬液, 塑料瓶
	MSP-COOH-Z1	18030206-0010g	0.50 mL*20 g/L (10 mg)	悬液, 塑料管
		18030206-0100g	5.0 mL*20 g/L (100 mg)	悬液, 塑料瓶
		18030206-0500g	25.0 mL*20 g/L (500 mg)	悬液, 塑料瓶

### 附录 2 表面亲水羧基微米磁珠的制备技术

聚合物化学结构相同故密度相同；相同聚合物化学结构的颗粒，其粒径越小则单位质量颗粒提供的表面积越大，相同质量颗粒表面可偶联的蛋白量就越多，按颗粒质量计算的分离效价就越高；为降低磁分离的成本就需要粒径尽可能小的磁颗粒或磁珠。相反，化学发光免疫等应用过程中要求分离用微米磁珠有尽可能高磁响应速度，这就要求颗粒的质量尽可能大，即粒径大而包裹/负载更多高比饱和磁化率纳米磁芯。 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的比饱和磁化率比  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  更高。要同时满足上述两要求，用  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  为纳米磁芯也对磁珠的最小粒径有特殊要求。另外，为了降低蛋白质等生物活性成分的非特异吸附，常需要对微纳米颗粒进行亲水修饰；表面亲水微米磁珠与水的粘附作用会降低其磁响应速度；磁珠表面吸附水形成的水凝胶层越厚，则水粘滞阻力使其磁响应速度下降越显著。为提高重现性，要求磁珠与蛋白加合物悬浮稳定性尽可能好，这首先要要求磁珠本身的分散性(抗聚集性)好，其次磁珠密度足够低。通过静电排斥提高颗粒的抗聚集性/分散性是最常用策略；降低磁珠的沉降率要求降低磁珠的密度，在制备磁珠的聚合物颗粒时需要添加特殊物质以降低其颗粒的密度。

经过长期探索，本公司建立了表面亲水磁珠制备新技术：先制备高比饱和磁化率纳米磁芯，再通过聚合制备磁响应速度足够快的微米磁珠，最后同步进行表面兼性离子对修饰和添加带连接臂官能团；兼性离子对修饰后其表面亲水性远超过蛋白修饰、糖链修饰、聚

乙二醇修饰，添加带连接臂的官能团提高了所偶联蛋白活性；在聚合时添加分子发泡剂降低聚合物密度和磁珠沉降率。该技术已获中国发明专利授权(ZL201610963764.X, 授权日期2017-10-17)，并通过 PCT (PCT/C2017/082374)已进入欧洲、美国和日本。

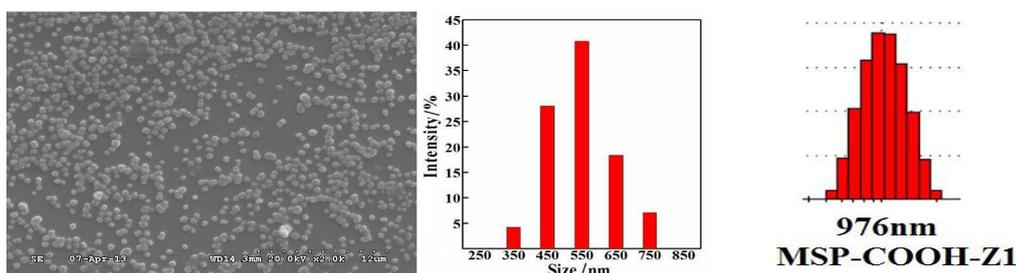


图 S1.左:SEM 测定磁珠修饰前粒径( $0.56\pm 0.04 \mu\text{m}$ ,  $n = 872$ ); 右:光散射测定 pH7.4 粒径

用 SEM 测定本公司微米磁珠表面离子对修饰前的粒径及其分布如图 S1(左);可见其粒径比较均匀, 图像分析表明其粒径波动(CV) $<7\%$ 。但是, 这类微米磁珠表面含有较多离子对, 表面还有其它可电离基团, 其表面电荷之间的相互作用对环境 pH 和离子强度都很敏感, 造成其表面吸附水构成的水凝胶层厚度随着环境 pH 和离子强度的变化而波动(图 S1, 右); 这是本公司分离用微米磁珠产品和市售羧基磁珠产品最容易区分的特征。

### 附录 3: 羧基磁珠的性能表征

#### S 3.1 中性条件下羧基磁珠的悬浮稳定性

羧基磁珠样品悬浮在 20 mM 磷酸钠 pH 7.4 缓冲液中, 调节 570 nm 消光为 1.25。悬浮稳定性用室温静置 20 min 内 570 nm 消光从 1.25 开始下降的比例定量表示。结果可见(图 S2), MSP-COOH-Z1 和 MSP-COOH-F1 的悬浮稳定性不逊于部分竞品。

#### S3.2 中性条件下羧基磁珠的磁响应速度

羧基磁珠悬浮于 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。结果表明(图 S3), MSP-COOH-Z1 和 MSP-COOH-F1 的磁响应速度不逊于常用的同官能团国际竞品。

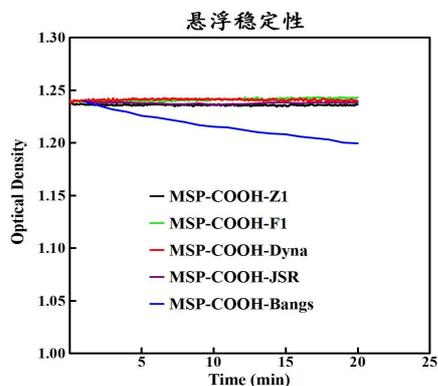


图 S2. 悬浮稳定性

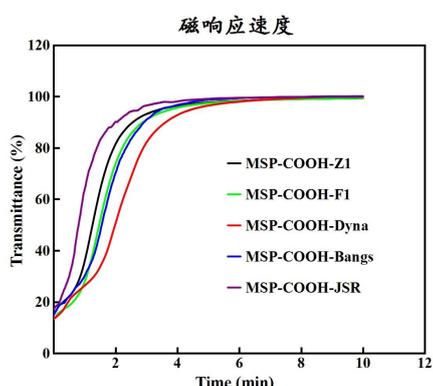


图 S3. 磁响应速度

### S3.3 MSP-COOH 固定化 PolyAb(ECAP)的条件优化

用 1.65 mg MSP-COOH 加 25 g/L EDC 和 25 g/L NHS (25 mM MES, pH 6.0) 各 50  $\mu$ L, 室温活化反应 30 min; 用预冷 25 mM MES (pH 6.0) 洗磁珠两次, 加预冷 25 mM MES (pH 6.0) 溶解的不同量多抗, 先保持在 0  $^{\circ}$ C 约 15 min, 再室温持续混合反应 30 min; 用 20 mM PBS (pH 7.4) 洗 PolyAb(ECAP) 磁珠 3 次; 取所得磁珠 4.0  $\mu$ g, 加 1.0 M Tris-HCl (pH 7.4) 稀释 300 ng ECAP, 室温吸附反应 30 min (吸附率 < 5%); 用 5.0 mM 4-硝基苯基磷酸酯测定吸附酶活性。结果表明(图 S4), MSP-COOH-Z1 和 MSP-COOH-F1 偶联抗体效力不逊于常用国际竞品。

### S3.4 羧基磁珠对蛋白的非特异性吸附

羧基磁珠 15  $\mu$ g, 加 1.0 M Tris-HCl (pH 7.4) 稀释生物素修饰牛小肠碱性磷酸酶 50 ng, 室温持续震荡吸附 30 min (吸附率 < 5%); 用 4-硝基苯基磷酸酯测定吸附酶活性(二乙醇胺 HCl 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 S5), MSP-COOH-Z1 和 MSP-COOH-F1 对蛋白的非特异吸附都不逊于常用国际竞品。

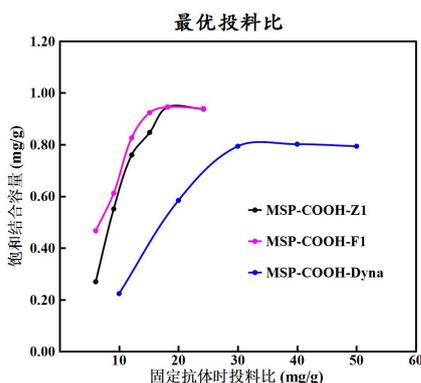


图 S4. 偶联多抗的投料比

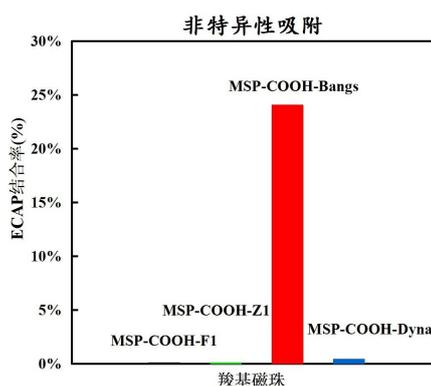


图 S5. 非特异性吸附

## 附录 4 羧基磁珠用于发光免疫检验的第三方测评

测试地点: 上海; 测试人: ZZZ; 测试机构: SKB; 测试期间: 20161116~20170113

FlyW&Y 羧基磁珠(MSP-COOH-Z1)结构和性质与市面上绝大多数磁珠产品有明显区别, 如目前在化学发光平台上使用的磁珠产品整体呈现咖啡色而 FlyW&Y 磁珠呈黑色。

FlyW&Y 磁珠在水溶液中分散良好, 且磁响应迅速。FlyW&Y 磁珠扫描电镜下微观结构含有粒径小于 100 nm 的无机颗粒, 即纳米磁性颗粒, 但磁珠在水溶液中为 1.0  $\mu$ m 左右的微球。具体性质表现为, 磁珠水合能力较强, 在水溶液中表现出类似凝胶状物质存在。在包被过程中, Merck 磁珠的贴壁现象较为严重, 而对比 FlyW&Y 磁珠却并无此问题。

FlyW&Y 磁珠对于蛋白的非特异性吸附较少, 几乎不与杂蛋白反应, 但发现 FlyW&Y 磁珠与目标蛋白反应较为困难。在 CA125 项目中, FlyW&Y 磁珠需在特殊活化剂的作用下,

维持较高的蛋白反应比例，才可获得较高的酶催化反应发光值。与 Thermo 及 Merck 磁珠相比，在相等同的偶联反应条件下，FlyW&Y 磁珠共价偶联结合蛋白后产生的碱性磷酸酶催化反应发光信号偏低，并且 FlyW&Y 磁珠在选择高灵敏度封闭剂时并未使得发光信号提高的预期效果。其活化剂的用量为对比磁珠 5 倍，在偶联蛋白时，蛋白投料量也为对比磁珠 3-4 倍，但所得蛋白磁珠偶联物稀释 4 倍后的线性上限还与对照磁珠相当。

在 CA125 项目测评中，FlyW&Y 磁珠发光信号测值偏低低于成品试剂盒，但 FlyW&Y 磁珠检测范围要宽于成品试剂。在成品试剂磁珠测量高值样本时出现平台和钩状效应，而 FlyW&Y 磁珠试剂却仍能表现出较好的线性相关性。FlyW&Y 磁珠在项目中发光信号测值远低于成品试剂，推测是由于 FlyW&Y 磁珠自身对于 KHB 化学发光体系存在一定的抑制。在 CA125 项目中，FlyW&Y 磁珠对于质控品以及临床样本测定回算浓度偏差较大，其在其他性能指标如检测的准确性，最低检测限，线性，重复性以及批间差的考察均可以达到要求，这是由于 FlyW&Y 磁珠试剂未针对罗氏试剂的测值情况做相应优化调整。

综上所述，FlyW&Y 磁珠在制备方法以及材料选择上有较高创新，该磁珠的物理性质可以满足发光诊断试剂平台上应用的性能要求；FlyW&Y 磁珠在蛋白结合量这一指标上超过 Thermo 以及 Merck 磁珠。但是磁珠的使用方法与常规磁珠存在较大的差异，FlyW&Y 磁珠的交联工艺上需要较高的偶联比，此部分需要提供者耐心研究，以帮助客户了解 FlyW&Y 磁珠最优使用条件。但 FlyW&Y 磁珠抗体偶联物在实测项目中发光值并不高。

(自评：用于碱性磷酸酶标记发光免疫时，表面修饰使本公司羧基磁珠偶联抗体信号低于 Merck 羧基磁珠，但对应链亲和素磁珠信号与 Dynabeads Myone Streptavidin T1 相当)