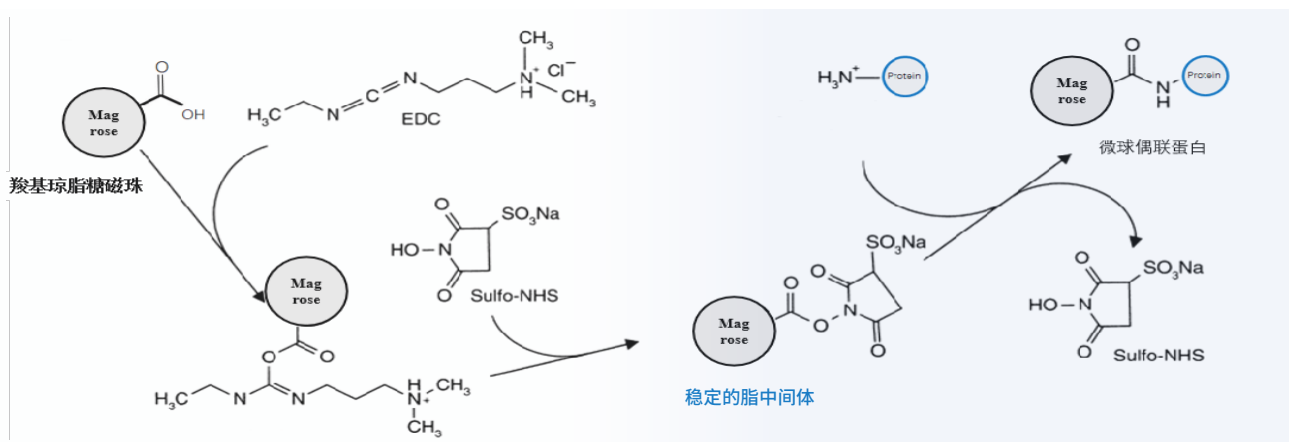


1、适用场景

MagneStar® MA-NHS 磁性琼脂糖微球表面预修饰NHS（N-羟基琥珀酰亚胺）活性酯基团，可在温和条件下直接与蛋白、多肽等生物配体表面的伯氨基（-NH₂）自发反应，形成稳定的酰胺键，实现配体与微球的共价偶联，无需EDC/NHS两步活化。相比EDC/sulfo-NHS两步法，NHS活化磁珠操作更简便、偶联更快速，且形成的酰胺键更稳定、配基不易脱落，尤其适合抗体、蛋白、多肽及小分子配体的固定化，广泛应用于免疫沉淀（IP/Co-IP）、抗体纯化、酶固定化及靶向蛋白富集。

2、基本原理



如图，我们无需加入前面的EDC和NHS反应步骤，拿到手的直接是NHS活化磁性琼脂糖微球（即图示中稳定的脂中间体），表面的NHS活性酯在弱碱性条件下可与蛋白上的伯氨基发生亲核取代反应，NHS作为离去基团脱去，蛋白与微球之间形成稳定的酰胺键，实现共价偶联。

NHS酯与伯氨基的最佳反应环境为弱碱性，因此该反应通常在pH 7.0 – 9.0之间进行，推荐 pH 8.0 – 8.3。反应在室温下即可快速完成，无需外加活化剂。

NHS酯遇水会逐渐水解失活，水解速率随pH与温度的升高而显著加快。因此偶联前应将所有缓冲液预冷至0 – 4 °C 并尽快完成操作；整个偶联流程须在无氨基的缓冲体系中进行。

3、注意事项

NHS活性酯会与氨基反应，因此不可使用含有氨基的缓冲体系，如Tris、甘氨酸、乙醇胺缓冲液等。通常用碳酸盐（0.2 M NaHCO₃）、磷酸盐（PBS）或HEPES之类的缓冲体系进行偶联反应。

注意！ NHS酯遇水极易水解，且对湿度敏感。微球保存于100%异丙醇中，每次取用前应先将试剂瓶平衡至室温再开盖，取用后立即盖紧并密封，放回4 °C保存，避免反复冻融。

偶联所用的抗体或蛋白不能含有BSA之类蛋白类稳定剂，也不能含有Tris之类氨基缓冲盐。如果配体本身的储存液中含有上述成分，应使用离心脱盐、超滤（10 kDa 截留）或者透析等方法除去，或者更换供应商。同时如果配体含有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。

微球不可过久暴露于空气中，防止被干燥；请勿离心、干燥或冷冻微球，这些操作可能导致微球聚集而降低结合活性。

4、基本流程

以下列出NHS活化磁性琼脂糖微球进行一步法蛋白共价偶联的通用型流程，该流程可用于将1 mg 蛋白偶联到100 μL 微球上。具体的微球用量、配体用量、缓冲液pH值和反应时间等参数应根据实际情况进行优化。

① 配制以下缓冲液：

清洗缓冲液（A Buffer）：1 mM HCl，4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷

反应缓冲液（R Buffer）：50 mM HEPES，pH 7.4

封闭缓冲液（B Buffer）：50 mM HEPES，pH 7.4，1% (w/v) BSA

储存缓冲液（S Buffer）：50 mM HEPES，pH 7.4，1% (w/v) BSA，0.05% (w/v) Proclin[®] 300

② 将磁性琼脂糖微球分散液充分混匀，平衡至室温，根据产品浓度取出100 μL 微球（gel）加入到2 mL圆底离心管中。用1 mL的 A Buffer清洗微球并磁吸分离上清，重复2 – 3次，最后用 C Buffer平衡1次，最后吸弃上清备用（微球不可过久暴露于空气中，防止微球被干燥）。

注：应根据微球的浓度计算并吸取对应体积的微球分散液。若微球分散液浓度为20% v/v，则应移取500 μL 分散液。清洗与偶联步骤应使用预冷的缓冲液并尽快完成，以减少NHS酯的水解。

③ 向②清洗后的微球加入1 mL的蛋白稀释液（蛋白预先用 R Buffer稀释成1 mg/mL），配体溶液应现用现配并置于冰浴上。充分颠倒混匀，然后置于混匀仪上于25 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2 h，或者在4 $^{\circ}\text{C}$ 下混合孵育过夜。

④ 反应结束后，磁吸分离并收集上清，用于计算偶联效率。加入1 mL的 R Buffer，用移液枪或者混匀仪将微球重悬，然后磁吸分离并吸弃上清。重复此步清洗，总共3次，最后吸弃上清备用（微球不可过久暴露于空气中，防止微球被干燥）。

例：偶联效率可由偶联前后配体浓度计算： $\eta = (c_0V_0 - c_1V_1) / (c_0V_0) \times 100\%$ 。其中 c_0 为偶联前配体浓度， c_1 为上清液与洗涤液合并后的配体浓度。

注：NHS离去基团在260 nm 附近有吸收，会干扰BCA法与A280测定，建议使用Bradford法或660 nm蛋白定量试剂检测偶联效率。

⑤ 向④中的磁性琼脂糖加入1 mL的 B Buffer，用移液枪或者混匀仪将微球重悬，然后在混匀仪上于25 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭反应过夜。

⑥ 磁吸分离，吸弃上清，然后加入1 mL的 S Buffer，用移液枪或者混匀仪将微球重悬，置于4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

注：磁性琼脂糖微球在使用和保存过程中应注意防止干燥，干燥会导致磁性琼脂糖微球体积收缩和性能变化；在使用过程中如产生团聚可手动摇匀或机械混匀，尽量避免超声。