含有（微）粒子的免疫试剂配方优化——被动吸附与共价偶联过程

Technical Note 001

纳 微
NanoMicro

译自ThermoFisher公司技术文档*TN-072 Particle Reagent Optimization*

简介

本文档概述了将聚合物（微）粒子与蛋白进行偶联所需的实验材料与过程。下述过程可用于以下几类场景：

- 蛋白在粒子表面的被动吸附及其优化
- 蛋白在粒子表面的共价偶联及其优化
- 用于共价偶联的两种方案的选取
- 对整个工艺进行简化，提升效率与重复性

蛋白结合的基本原理

蛋白可通过被动吸附的方式结合到聚苯乙烯或羧基修饰的（磁性或非磁性）粒子表面。此种吸附是由蛋白与粒子表面的疏水及离子*（译注：静电）*两类相互作用介导的。由于粒子*（译注：较高）*的表面自由能，蛋白的被动吸附发生的非常迅速。蛋白也可通过共价连接方式结合到羧基化粒子表面。粒子表面的羧基通过EDC活化的方式，能够与蛋白上的氨基反应生成酰胺键。对于磁性粒子推荐使用共价偶联方法。EDC直接偶联法是一种普遍适用的共价偶联方法。如果将蛋白直接暴露于EDC环境中对蛋白不利的话，则可使用预活化羧基（形成活性酯）的方法，然后加入蛋白，也可成功实现蛋白的共价偶联。

在此我们给出被动吸附与共价偶联两类实验方案。这些方案已经过众多客户的普遍验证。下述方案系基于1.0 mL总反应体积设计的。对于更大规模的反应，所有的体积均可等比例增大。

实验材料与方法

1. 粒子

- 聚苯乙烯粒子

用于免疫检测的聚苯乙烯粒子通常粒径范围在0.05 – 2.0 μm之间。此类粒子通过乳液聚合方式合成，聚合时加入阴离子型表面活性剂，表面具有引发剂带来的硫酸基团。成品聚苯乙烯粒子仅有极低含量的表面活性剂，通常不会干扰蛋白的结合。

- 羧基修饰的粒子（非磁性或磁性）

羧基修饰的非磁性粒子通常粒径范围在0.05 – 3.0 μm之间。此类粒子由苯乙烯和丙烯酸以乳液聚合方式共聚得到。羧基修饰的粒子表面羧基密度在一定范围内可调，该数值由滴定法给出，单位为每单位质量（克）的粒子含有多少毫滴定当量的羧基（mmoles/g或μmole/mg）。羧基修饰的粒子所含表面活性剂残留也很低，通常不会干扰蛋白的结合。如需更严格的清洗，羧基修饰的粒子可通过混合柱床的离子交换树脂或者切向流过滤法进行清洁。此类清洗方法可以去除离子型副产物包括表面活性剂、可溶性低聚物以及缓冲盐等，上述副产物可能会干扰蛋白偶联。而粒子是否需要预清洗步骤应当根据每个工艺的具体情况来确定。

注：占据面积（parking area = PA）是一个使具有不同粒径与滴定数值的羧基修饰粒子的表面基团密度具有可比性的物理量。该物理量指的是羧基基团的面平均密度，单位为Å2/COOH。如果两个粒子具有相同的PA值，则一个特定的蛋

白分子结合到粒子表面时，所接触到的羧基数量也相同，产生共价连接的概率也相同（假设所有羧基均已活化）。

2. 用于粒子的BCA蛋白定量法

参见ThermoFisher公司技术文档*TN-038 Reagent Optimization BCA Assay Quick Elution Technique*。

3. 反应缓冲液：MES缓冲液

准备500 mM，pH 6.1的MES缓冲液作为10倍浓度（10 X）的存储缓冲液。在4 °C下保存，若缓冲液变黄或出现污染迹象则应丢弃。

4. EDC溶液：52 μmol/mL

现用现配，将大约10 mg EDC盐酸盐溶于1.0 mL去离子水中。EDC对于水汽非常敏感，在水溶液中迅速水解。平时应置于干燥器中并在-5 °C下保存，称量时先升温至室温再开瓶。

5. NHS（只用于两步偶联法中）

6. 蛋白储存液

推荐将蛋白保存于1 – 10 mg/mL浓度范围。用于偶联的蛋白应当完全溶解，且浓度不宜过高。

7. 去离子水

其他需要的实验室设备包括：

- 移液器与吸头（10 μL – 5 mL）
- 旋转混合器或其他种类的混合器
- 微量离心管
- 小型离心机
- 切向流过滤装置（若小粒径粒子需要预清洗）
- 探头型超声仪：带有尖头型探头的超声仪需要用在清洗粒子后的重悬步骤以及将团聚成块的粒子打散并重新分散于储存缓冲液中。浸入式的超声探头可以将粒子有效打散并重新分散。对于1.0 mL的小体积，只需几秒钟的超声就足以重新分散粒子。此外，粒子也可通过搅拌或者移液器吸头反复吹打的方式重新分散。

注：涡旋混合器和水浴式超声仪提供的能量不足以使粒子有效分散。

被动吸附法

实验准备：

- 蛋白的最优用量取决于以下几个因素

1）可用的表面积：每mg粒子的表面随粒径下降而等比例上升

2）胶体稳定性：蛋白可能对粒子的稳定性带来正面或负面影响

3）免疫反应性：结合蛋白的最优用量必须通过最终的功能测试来确定

- 当蛋白加入粒子时，为保证包被的均匀性，必须迅速混合二者。当工作体积为1.0 mL时，应当用移液器将蛋白溶液直接加入粒子分散液液面之下，并使用同一吸头反复上下吹打使溶液混合。当工作体积增大时，应将粒子分散液加入烧杯中，并用磁力搅拌（对于非磁性粒子）充分混合，然后在搅拌下将蛋白溶液迅速加入搅拌的中心点。
- 作为首次实验，应考虑进行一个蛋白滴定或者吸附等温实验（*译注：确定优化的蛋白用量*）。
- 对于0.3 μm的粒子（非磁性），合理的起始范围在每mg粒子加入10 – 200 μg蛋白之间。
- 若洗涤/存储缓冲液与结合缓冲液成分不同，非共价吸附的蛋白有可能从粒子表面脱落。
- 大多数去污剂能够洗脱非共价吸附的蛋白，因此不应用于

被动吸附法中。

实验过程：

1. 计算每个组分所需的用量
2. 准备所有的缓冲液与溶液
3. 准备完成后，取一个微量离心管，向其中顺序加入
   a. 50 μL 500 mM MES存储缓冲液（工作浓度为25 mM）
   b. 适当体积的去离子水（最终总体积应为1.0 mL）
   c. 100 μL固含量为10.0%的粒子存储液（工作浓度为1.0%）
   d. 蛋白存储缓冲液（蛋白溶液应最后加入，并用吸头吹打的方式迅速混合）
4. 在室温下，将离心管置于旋转混合器或者其他混合装置上，充分混匀一个小时。温和而持续的混合过程对于粒子结合蛋白至关重要。
5. 去除未结合的蛋白：离心沉淀粒子，丢弃上清液。
6. 用清洗缓冲液（可以是同一MES缓冲液）进行两次清洗：离心沉淀粒子，丢弃上清液。在每次清洗之间使用超声探头将粒子重新分散。
7. 将最终的粒子在存储缓冲液中重新分散以达到预期的储存固含量。例如，若最终固含量定为1.0%，则应加入0.97 mL缓冲液，因为离心后会有少量缓冲液残留。
8. 用BCA蛋白定量法对粒子表面结合的蛋白进行定量。

共价偶联法

实验准备：

- 为确定一步法偶联方法中EDC的最优用量（以EDC与羧基比例计），应进行一次EDC滴定实验。推荐的范围为介于0.5 – 2.5倍羧基当量之间。
- 对于两步法偶联方法，EDC与羧基比例的调整范围在1 – 2.5之间，NHS与羧基比例的调整范围在1 – 20之间。
- 一旦确定了最优的EDC浓度，接下来应当确定最优的蛋白用量。通过固定EDC用量进行蛋白滴定实验的方式来确定此参数。
- 蛋白的最优用量取决于以下几个因素

1）可用的表面积：每mg粒子的表面随粒径下降而等比例上升

2）胶体稳定性：蛋白可能对粒子的稳定性带来正面或负面影响

3）免疫反应性：结合蛋白的最优用量必须通过最终的功能测试来确定

- 对于0.3 μm的粒子（非磁性），合理的起始范围在每mg粒子加入10 – 200 μg蛋白之间。
- 当蛋白加入粒子时，为保证包被的均匀性，必须迅速混合二者。当工作体积为1.0 mL时，应当用移液器将蛋白溶液直接加入粒子分散液液面之下，并使用同一吸头反复上下吹打使溶液混合。当工作体积增大时，应将粒子分散液加入烧杯中，并用磁力搅拌（对于非磁性粒子）充分混合，然后在搅拌下将蛋白溶液迅速加入搅拌的中心点。
- 对于小量优化反应规模，可以很方便的在微量离心管中进行实验。若粒子直径大于0.15 μm，用微量离心机可以在10 – 30分钟之内将粒子沉淀下来。若粒子直径小于0.15 μm，所需离心时间会更长，粒子的重新分散也更加困难。
- 小粒径的粒子可以通过切向流过滤或者离心超滤的方式进行清洗。

- 当粒子直径下降时，胶体稳定性（团聚）的问题风险随之增加。在偶联过程中将粒子固含量由1.0%降至0.5%有助于减少团聚。
- 在偶联过程中，有几种因素可能导致粒子团聚：带正电的EDC分子产生的静电吸附作用、蛋白本身的作用以及形成酰胺键导致的粒子表面负电荷降低。通过用新鲜缓冲液清洗粒子以去除EDC和未结合蛋白，继以超声分散的方法通常能够使粒子恢复其分散性。为维持长期的胶体稳定性，通常需要开发出优化的存储缓冲液。
- 选取合适的存储缓冲液体系及pH值对于优化粒子试剂的性能至关重要。双性离子缓冲体系如MOPSO、封闭蛋白如BSA或鱼皮明胶（FSG）、更高的pH值、去污剂和水杨酸钠均有助于维持粒子的胶体稳定性，同时不会干扰特异性的凝集反应。
- 加入BSA与FSG这类带有较高负电荷的封闭蛋白可帮助粒子维持其胶体稳定性，同时封闭粒子表面以避免非特异性吸附。FSG尤其适合于抗体包被的粒子。

一步法偶联步骤

1. 计算所需的EDC用量

粒子羧基含量 1 mEq/g = 1 μmole/mg，1.0 mL 1.0%固含量粒子分散液含有10 mg粒子

羧基密度（单位 μmol/mg）× 粒子质量（10 mg）× 所需的EDC羧基比例 = EDC所需的量（单位 μmol）

EDC所需的量（单位 μmol）÷ EDC溶液浓度（52 μmol/mL）= 每 mL 反应液所需的EDC溶液体积（单位mL）

2. 取一个微量离心管，向其中顺序加入
   a. 50 μL 500 mM MES 存储缓冲液（工作浓度为25 mM）
   b. 适当体积的去离子水（最终总体积应为1.0 mL）
   c. 100 μL固含量为10.0%的粒子存储液（工作浓度为1.0%）
   d. 蛋白存储缓冲液（蛋白溶液应最后加入，并用吸头吹打的方式迅速混合）
3. 在室温下，将离心管置于旋转混合器或者其他混合装置上，充分混匀15分钟。温和而持续的混合过程对于粒子结合蛋白至关重要。
4. 现用现配所需的EDC溶液，将所需的体积用移液器迅速加入上述粒子与蛋白混合液中。
5. 在室温下，将离心管置于旋转混合器或者其他混合装置上，充分混匀一小时。其间粒子可能出现团聚现象，但并非异常或者对反应不利。
6. 去除未结合的蛋白：离心沉淀非磁性粒子，丢弃上清液。
7. 用清洗缓冲液（可以是同种MES缓冲液或者pH更高的其他缓冲液）进行两次清洗：离心沉淀粒子，丢弃上清液。在每次清洗之间使用超声探头将粒子重新分散。
8. 将最终的粒子在存储缓冲液中重新分散以达到预期的储存固含量。例如，若最终固含量定为1.0%，则应加入0.97 mL缓冲液，因为离心后会有少量缓冲液残留。
9. 用BCA蛋白定量法对粒子表面结合的蛋白进行定量。
10. 为保持长期的胶体稳定性，需要向存储缓冲液中加入稳定剂。由于共价偶联的蛋白不会被洗脱，因此可选择的添加剂种类相比于被动吸附法制备的粒子试剂更为广泛。

两步法偶联步骤

1. 取一个微量离心管，向其中顺序加入
   a. 100 μL 500 mM MES存储缓冲液（工作浓度为50 mM）
   b. 适当体积的去离子水（最终总体积应为1.0 mL）
   c. 100 μL固含量为10.0%的粒子存储液（工作浓度为1.0%）
   d. 230 μL NHS溶液（工作浓度为100 mM）
   e. EDC溶液，根据计算所得的优化用量
2. 在室温下，将离心管置于旋转混合器或者其他混合装置上，充分混匀30分钟。温和而持续的混合过程对于粒子结合蛋白至关重要。
3. 离心沉淀非磁性粒子，丢弃上清液。
4. 将粒子重新分散于1.0 mL 50 mM pH 6.1 的MES缓冲液中，离心沉淀非磁性粒子，丢弃上清液。
5. 顺序加入以下溶液，并重新分散粒子：
   a. 100 μL 500 mM MES存储缓冲液（工作浓度为50 mM）
   b. 适当体积的去离子水（最终总体积应为1.0 mL）
6. 加入蛋白存储缓冲液。
7. 在室温下，将离心管置于旋转混合器或者其他混合装置上，充分混匀一小时。
8. 去除未结合的蛋白：离心沉淀非磁性粒子，丢弃上清液。
9. 用清洗缓冲液（可以是同种MES缓冲液或者pH更高的其他缓冲液）进行两次清洗：离心沉淀粒子，丢弃上清液。在每次清洗之间使用超声探头将粒子重新分散。
10. 将最终的粒子在存储缓冲液中重新分散以达到预期的储存固含量。例如，若最终固含量定为1.0%，则应加入0.97 mL缓冲液，因为离心后会有少量缓冲液残留。
11. 用BCA蛋白定量法对粒子表面结合的蛋白进行定量。
12. 为保持长期的胶体稳定性，需要向存储缓冲液中加入稳定剂。由于共价偶联的蛋白不会被洗脱，因此可选择的添加剂种类相比于被动吸附法制备的粒子试剂更为广泛。