羧基纳米球偶联氨基分子的的方案

武汉珈源量子点技术开发有限公司提供的功能纳米球系列产品由于表面带有丰富的羧基基团，只需要使用简单的交联剂，就可以很容易地与带有氨基的分子（如抗体、蛋白、多肽、寡核苷酸探针或NH2-PEG-R 等）偶联。为了更好的服务于广大用户，本公司提供两种偶联方法供用户参考。

注意：本文涉及的方法仅仅是一种指导性的方案，并非最优方案，使用者请根据具体情况进行调整和优化。

试剂和耗材：

羧基纳米球（珈源公司提供的羧基磁性纳米球、彩色纳米球或量子点荧光纳米球系列产品）

EDC（偶联剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，Sigma 公司购买，建议现配现用）

NHS（偶联剂 N-羟基琥珀酰亚胺，Sigma 公司购买，建议现配现用）

PBS（磷酸盐缓冲液，10 mM pH6.8 和 pH7.2）

磁力架（Life Technology 公司 DynaMag^{TM}-2 型号）

离心管（AXYGEN 公司 MCT-200-C 型号，2mL）

注：16000rmp 高速离心必须用进口管

其它：震荡式摇床，封口膜等

待标记目标分子：

抗体、蛋白、多肽、寡核苷酸探针或 NH2-PEG-R 等分子都可以，本文以抗体、链霉亲和素为例。

注：建议使用不含缓冲盐的纯分子，可以是干粉或高浓度溶液。

目标分子所处缓冲体系中不含伯胺基分子，如血清、腹水、稳定剂及 Tris 缓冲盐等。

实验方案：

方案一：两步法 EDC/NHS 活化偶联蛋白（以抗体为例）

● 取 5 mg 表面羧基化的功能纳米球，用 1 mL，10 mM pH 6.8 的磷酸缓冲液（PBS）洗涤两次，分散到 600 μL 10 mM pH 6.8 的 PBS 中，超声分散均匀；

注：磁球用磁力架分离洗涤，荧光球和彩色球采用高速离心洗涤（16000 rmp， 5 min）

● 称取 10 mg EDC 和 5 mg NHS，分别使用 200 μL 10 mM pH 6.8 的 PBS 溶解，将其迅速加入到第一步处理的功能纳米球中，之后置于摇床上 150 rpm 反应 0.5 h，将功能纳米球表面的羧基活化；

● 将羧基活化后的功能纳米球用 1 mL 10 mM pH 7.2 的 PBS 洗涤两次，之后分散于 1 mL 10 mM pH 7.2 的 PBS 中；

注：洗涤过程要快，避免活化失效，最好不要超过 0.5 h。

● 加入 50 μg 抗体，室温下置于摇床上 150 rpm 反应 4 h；

● 反应完成后，将偶联了抗体的功能纳米球用 10 mM pH 7.2 的 PBS 洗涤 5 次，除去未反应的抗体分子，最后分散于 200 μL 10 mM pH 7.2 的 PBS（其中含有 0.05%NaN_3和 1%BSA）中，置于 4^{o}C 保存。

方案二：一步法 EDC 活化偶联蛋白（以链霉亲和素为例）

● 取 5 mg 表面羧基化的功能纳米球，用 1 mL 10 mM pH 7.2 的 PBS 洗涤两次，分散到 600 μL 10 mM pH 7.2 的 PBS 中，超声分散均匀；

注：磁球用磁力架分离洗涤，荧光球和彩色球采用高速离心洗涤（16000 rmp， 5 min）

● 称取 10 mg EDC，用 400 μL 10 mM pH 7.2 的 PBS 溶解后，加入到第一步处理的功能纳米球中，然后立即加入 0.2 mg 链霉亲和素（SA），置于摇床上 150 rpm 反应 4 h；

● 反应完成后，将偶联了 SA 的功能纳米球用 10 mM pH 7.2 的 PBS 洗涤 5 次，除去未反应的 SA 分子，最后分散于 200 μL 10 mM pH 7.2 的 PBS（其中含有 0.05%NaN_3和 1%BSA）中，置于 4^{o}C 保存。