EDC/Sulfo-NHS两步法共价偶联抗体条件的优化

Technical Note 003

纳 微
NanoMicro

译自Merck Millipore公司技术文档《*Microsphere Coupling – Two-step EDC/Sulfo NHS Covalent Coupling Procedure for Estapor® Carboxyl-modified Dyed Microspheres*》

简介

通过用水溶性的1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺（EDC）活化羧基，可以使蛋白质与羧基化的微球表面共价偶联。此反应形成的活性中间体（*O*-acylisourea）能够与伯胺（亲核试剂）快速反应形成稳定的酰胺键。

由EDC反应形成的活性中间体不稳定，易被水水解。与水的这种竞争反应可以裂解活性中间体以再生羧基。为了防止活性中间体快速水解，可以将N-羟基磺基琥珀酰亚胺（Sulfo-NHS）添加到反应中，以形成更稳定的Sulfo-NHS酯中间体，该中间体与伯胺缓慢反应以形成稳定的酰胺键。

我们在这里介绍了使用EDC和Sulfo-NHS将蛋白质偶联到羧基修饰的微球上的常规两步共价偶联方案。

注意事项

何时应当选用两步法偶联?

当要偶联的分子（例如蛋白质）同时包含羧基和伯胺基团时，最好使用两步法共价偶联方案。由于两步法形成了更稳定的Sulfo-NHS酯中间体，因此可以在添加蛋白质之前除去过量的EDC。这样可以防止蛋白质上羧基的活化以及蛋白质交联的可能性（Grabarek和Gergely，1990）。此外，两步法偶联使得缓冲液交换更加方便，并且可以提高偶联产率（Staros，Wright和Swingle，1986；Staros，1988）。

两步偶联方案可用于高密度（COOH ＞ 100 μeq/g）和低密度（COOH＜100 μeq/g）羧基改性微球。

羧基修饰微球的活化和偶联

在pH 4.5和7.2之间，使用EDC和Sulfo-NHS进行活化最有效。因此，通常优先使用pH为6的MES（2-（N-吗啉代）乙磺酸）缓冲液进行活化反应（Nakajima和Ikada，1995）。活化缓冲液不应包含任何伯胺或羧基，因为它们会与活化反应竞争。磷酸盐和醋酸盐缓冲液也会降低EDC的反应性。MES可以很好地用作偶联缓冲液，如果需要进一步优化条件，也可使用具有不同pH的其他缓冲液。

当将蛋白质偶联到羧基修饰的微球上时，以下技巧可能会有助于避免偶联过程出现问题。

开始偶联反应之前的注意事项

1. EDC应在-20°C的干燥容器中储存，并在使用前使其平衡至室温。EDC对水分极为敏感，如果潮湿或结块，则不应使用。EDC溶液应现用现配。
2. Sulfo-NHS溶液也要现用现配。
3. 使用前，所有试剂应当平衡至室温。
4. 通过形成尽可能松散的颗粒，可以使微球的重悬变得更容易。以下是针对不同尺寸微球推荐的离心力与时长：
   0.2 μm – 28,500 × g，9分钟
   0.3 μm – 19,300 × g，7分钟

0.4 µm – 14,200 × g，7分钟

0.5 µm – 14,200 × g， 5分钟

5. 至关重要的一点是要在洗涤步骤之间将微球完全重悬，尤其是在配体偶联之前。

6. 微球沉淀物应首先通过移液器吸头反复吹打以打碎大块团聚，然后在必要时进行超声分散。

7. 浸入式超声波探头能够最有效地将微球重新悬浮至单分散状态。吸头吹打，涡旋混合和水浴超声通常不足以完全重悬微球。

8. 超声处理时避免样品过热。如果需要，将试管浸入冰水中进行超声处理。

9. 从视觉上看，微球溶液应该看起来有点“乳白色”，表明聚合没有重大问题。

10. 可以在400倍放大倍数下评估微球团聚程度。在400倍放大倍数下很难看到单分散微球，只能看到一片朦胧的微球“海”（图1）。而团聚的微球很容易在400倍的放大倍率下观察到（图2和3）。

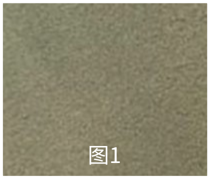
图1

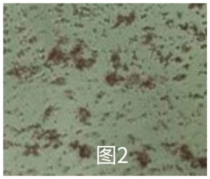
图2

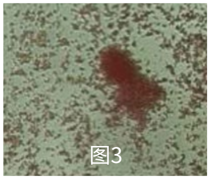
图3

11. 制备缓冲液和洗涤微球时，请使用Milli-Q®纯水，以避免因污染物引起的任何问题。

12. 需要针对特定测试要求优化抗体浓度。为了偶联可能无法获得足够数量以达到最佳摩尔比的昂贵抗体，可以添加非特异性蛋白质（例如牛丙种球蛋白或BSA）来占据任何剩余的反应位点。

两步法EDC/Sulfo-NHS偶联实验

这是通用的两步EDC/Sulfo-NHS共价偶联方案。根据蛋白质的类型和分子量以及微球上的羧基电荷密度，可能需要进行优化。

微球

羧基改性微球产品（例如 Estapor® K1-020，K1-030，K1-040，K1-050等）

缓冲液

活化/偶联缓冲液– 50 mM MES，pH 6.0

封闭缓冲液– 50 mM Tris，pH 8.0，0.5%（w/v）酪蛋白

微球活化与封闭

EDC（如Thermo Scientific #22980）

Sulfo NHS（如Thermo Scientific #24510）

乙醇胺（如Merck #1008452500）

设备

Eppendorf-5430离心机-带FA-45-24HS转子

Hielscher Ultrasonics-UP50H紧凑型实验室均质机

健康和安全

对样品进行超声处理时，必须戴上耳罩。应在通风橱中使用所有危险化学品（例如乙醇胺），并采取适当的安全预防措施。

偶联方案

微球洗涤和活化

1. 将100 µL微球（10% w/v固含量）分装到低蛋白结合的Eppendorf管中。

2. 加入1 mL活化/偶联缓冲液并充分混合。

<u>注意：活化/偶联缓冲液的组分应不含游离羧基、伯胺基或巯基。这些官能团会干扰偶联反应。</u>

3. 按照合适的条件离心微球。

0.2 µm – 28,500 × g，持续9分钟

0.3 µm – 19,300 × g持续7分钟

0.4 µm – 14,200 × g ，持续7分钟

0.5 µm – 14,200 × g ，持续5分钟

4. 倒出上清液。

5. 重复步骤2 – 4两次。重要的是，微球应在洗涤步骤之间完全重悬，尤其是在配体偶联之前。用移液器吹打通常效果足够好，但有时也需要使用超声探头进行分散。（可选：在显微镜下检查微球以确保它们分散良好。）

6. 最后一次洗涤后，将微球重悬于1 mL活化/偶联缓冲液中。确保微球分散良好，这一点很重要。

7. 在使用前立即准备活化试剂。

8. 要制备200 mM EDC溶液，请在干净的微量离心管中将室温下的19.2 mg EDC加入500 µL Milli-Q®水中。

9. 要制备200 mM Sulfo-NHS溶液，请在干净的微量离心管中将21.7 mg的Sulfo-NHS加入500 µL的活化/偶联缓冲液中。

10. 向1 mL洗涤过的微球（来自上述步骤6）中快速加入24 µL 200 mM EDC溶液和240 µL 200 mM Sulfo-NHS溶液。

11. 在室温下涡旋混合并在转盘上孵育30分钟。

12. 离心沉淀微球。

13. 倒出上清液。

14. 添加1 mL活化/偶联缓冲液以洗涤微球并充分混合。

15. 以适当的离心条件再次离心以沉淀微球。

16. 重复步骤13 – 15两次。

17. 将微球重悬于700 µL激活/偶联缓冲液中（请参见下面的抗体偶联部分）。在添加抗体/配体之前，微球必须分散良好，这一点很重要。如有必要，请使用超声分散。

抗体偶联

18. 用活化/偶联缓冲液制备浓度为2 mg/mL的抗体溶液。

19. 根据每克微球60 mg抗体的包被浓度，在700 µL微球中加入300 µL抗体（2 mg/mL）。彻底混合。现在，总液体体积为1 mL。请参见下面的表1。

包被浓度	偶联缓冲液体积	2 mg/mL抗体溶液体积
20 mg/g	0.9 mL	0.1 mL
40 mg/g	0.8 mL	0.2 mL
60 mg/g	0.7 mL	0.3 mL
80 mg/g	0.6 mL	0.4 mL

表1.抗体包被指南

注意：最佳包被浓度需要根据具体情况进行研究。

20. 在室温下于旋转混合器上将上述悬液混合2.5小时。

21. 对于1 mL 1%的微球，添加30 µL乙醇胺（在通风橱中）。涡旋并在旋转混合器上混合30分钟以封闭微球。

22. 以正确的离心速度旋转试管以沉淀微球。

23. 倒出上清液。（可选：保留上清液用于使用BCA分析进行蛋白质含量分析。）

24. 将微球重悬于1 mL封闭缓冲液中。在室温下，在转盘上超声处理并混合至少2小时。注意：微球也可以在室温下搅拌过夜。

25. 以适当的离心条件再次离心以沉淀微球。

26. 倒出上清液。

27. 添加1 mL封闭缓冲液，如有必要，通过吸头吹打和超声处理重悬微球。

28. 以适当的离心条件再次离心以沉淀微球。

29. 重复步骤26 – 28。

30. 最后的洗涤步骤后，除去上清液，然后加入1 mL封闭缓冲液。现在，微球的含量为1% w/v。

31. 通过吸头吹打和超声处理重悬微球。（可选：在显微镜下检查微球以确保它们分散良好。）

32. 将悬浮液储存在4°C下。建议在5天内使用。偶联产物的储存稳定性需要单独评估。

常见问题与解决方案

问题一

使用前微球聚集

解决方案1

使用前涡旋并超声分散微球。

问题二

结合过程中或结合后的微球聚集

解决方案2

确定发生聚合的点。聚合发生在：

1. EDC加入时

  —缓慢添加EDC。

  —加入EDC后，将微球充分混合。

  —将溶液中微球的浓度降低至0.5%。

2. 蛋白加入时

  —蛋白量可能不足；应增加蛋白浓度。

  —尝试使用其他偶联缓冲液。

  —团聚可能是可逆的。对样品进行超声处理以打散团聚体。

3. 离心时

  —注意充分重悬沉淀。

  —降低离心速度或离心时间，以形成尽可能松散的颗粒。

  —更剧烈的吹打沉淀以重悬微球。

  —增加超声处理时间和/或超声强度。

  —减少微球的用量。

4. 洗涤时

  —添加少量表面活性剂（例如0.025% SDS）。

问题三

抗体或配基与微球的结合量低

解决方案3

— EDC可能已经失活，使用新鲜的EDC。

—Sulfo-NHS中间体可能正在水解。在使用前立即准备EDC和Sulfo-NHS。

—蛋白量可能不足，需要增加包被浓度。

— 羧基活化后立即加入蛋白。

—避免加入带有竞争性基团的蛋白或其他组分。

—更改偶联缓冲液种类和/或pH。

问题四

包被重复性不好

解决方案4

—在每个步骤中将微球悬浮液充分混合，并使用新鲜试剂。

问题五

偶联抗体后的微球非特异性吸附高

解决方案5

—使用替代封闭剂（BSA，甘氨酸，酪蛋白，鱼皮明胶）。

—增加封闭反应时间。

—在淬灭步骤中减少乙醇胺的量。

—减少包被蛋白的量。

—尝试使用具有较高羧基电荷密度的微球。

—微球团聚导致非特异性结合。 有关建议，请参见解决方案2。

参考文献

Grabarek, Z. and Gergely, J., 1990. Zero-Length Crosslinking Procedure with the Use of Active Esters. Analytical Biochemistry, 185, pp. 131.

Lomant, A. J. and Fairbanks, G., 1976. Chemical Probes of Extended Biological Structures: Synthesis and Properties of the Cleavable Protein Cross-linking Reagent [35S] Dithiobis (succinimidyl propionate). J. Mol. Biol., 104, pp. 243.

Nakajima, N. and Ikada, Y., 1995. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. Bioconjugate Chemistry, 6(1), pp. 123.

Staros, J.V., 1988. Membrane-Impermeant Cross-Linking Reagents: Probes of the Structure and Dynamics of Membrane Proteins. Accounts of Chemical Research, 21(12), pp. 435.

Staros, J.V., Wright, R.W. and Swingle, D.M., 1986. Enhancement by N-Hydroxysulfosuccinimide of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Coupling Reactions. Analytical Biochemistry, 156, pp. 220.

Hermanson, Greg T. 2013 Bioconjugate Techniques, Academic Press, London.