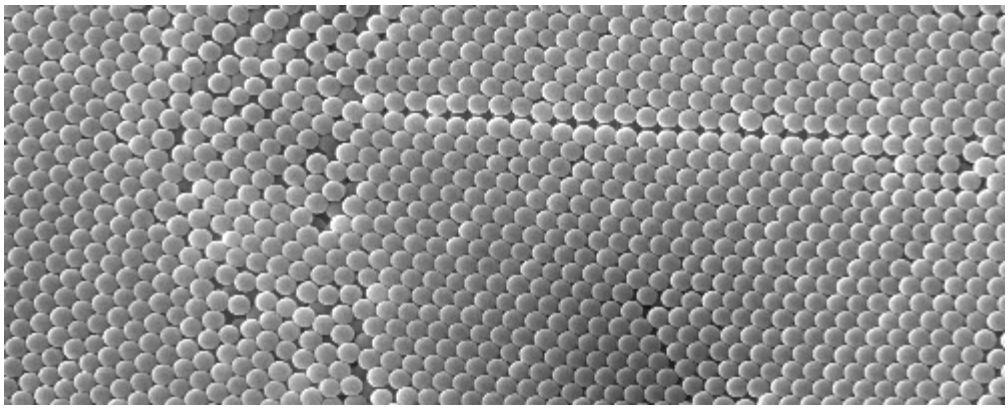
MonoPS 微球

聚苯乙烯微球与目标物质（多克隆或单克隆抗体，蛋白质，IgG，半抗原等），通过疏水作用吸附（聚苯乙烯微球）或者共价键合（羧基化聚苯乙烯微球），然后洗掉未吸附的蛋白质，是一种获得功能化微球的有效方法。
为了增强乳液稳定性，聚苯乙烯微球常采用乳化聚合；另一方面，表面活性剂吸附于微球表面，干扰蛋白质吸附，使用前需将其全部洗脱。我们化学家成功研发出单分散、稳定的、无表面活性剂的试剂级微球，其优化的清洁表面更易于操作，获得高质量的功能微球。



390nm 聚苯乙烯微球

我们各类尺寸的聚苯乙烯微球（0.1μm－5μm），能满足绝大多数基于微球技术的分析：

1. 免疫比浊分析
2. 浊度分析
3. 增强免疫比浊分析
4. 胶乳凝集测试
5. 固相免疫分析
6. 微球捕获 ELISA
7. 分析仪器校正

试剂

MES 缓冲液
500mM 和 50mM；PH6.1；4°C 储存（如果发黄或者污染，应倒掉）。

EDAC 盐酸 1－乙基－3－二甲基氨基丙基二酰亚胺
52umol/ml：分析天平称取 10mg EDAC，加入 1ml 去离子水。（EDAC 对潮气非常敏感，在水中快速水解，EDAC 储存于干燥器中，-5 °C 保存。）

NHS N－羟基琥珀酰亚胺
50mg/ml 水溶液

蛋白质溶液
蛋白质充分稀释溶解，浓度为 1－10mg/ml

聚苯乙烯微球通过疏水作用固定蛋白质和 IgG，操作简单，吸附牢固，是获得功能化微球的常用方法。

方法步骤

1. 将配好的溶液按以下顺序加入离心管中
50μL　500mM 储存缓冲液（25mM）
加水稀释至 1ml
蛋白质溶液
200μL　5％微球（或 100ul 10％微球）（10mg）

2. 室温搅拌 2 小时

3. 离心沉降后，轻轻倒出上层液体；用 50mM MES 缓冲液洗涤 3 次；离心沉降后，倒出上层液体（*收集未吸附的蛋白质用于蛋白质定量）

4. 加入 0.97ml 储存缓冲液（含 0.01-0.1%稳定剂），微球浓度为 1％

技术说明

1．微球总表面积与其粒径成反比，抗体的具体用量需要根据使用微球的大小做相应改变；
单位质量的微球表面积（m^2/g）： A/M = 6/PD
其中 D= 微球粒径（μm）
P = 微球密度 (聚苯乙烯 1.05g/ml)
例如：0.8μm 的聚苯乙烯微球，A/M = 6/1.05×0.8 = 7.14 m^2/g
1.6μm 的聚苯乙烯微球，A/M = 6/1.05×1.6 = 3.57 m^2/g
0.8μL ，10mg 聚苯乙烯微球需加入 125－250μL 多克隆抗体
1.6μL ，10mg 聚苯乙烯微球需加入 62.5－125μL 多克隆抗体

2．虽然疏水性吸附与缓冲液 pH 值无关，但反应缓冲液的 pH 值对被吸附蛋白质的构象有较大影响，进而影响其吸附效率。在等电点 pH 值条件下，更多的蛋白质疏水性吸附点暴露出来，利于其与微球作用；

3．高效搅拌下，将微球分散液快速加入蛋白质反应缓冲液，可以获得最高的吸附效率和吸附均匀度；

4．绝大部分的蛋白质很快被吸附，延长蛋白质与微球混合时间有助于蛋白质正确定位。

聚苯乙烯微球表面的羧基与生物大分子（多克隆或单克隆抗体，蛋白质，半抗原等）的氨基，在 EDAC 或 EDAC/NHS 作用下，通过共价键连接，获得官能化微球。

特点简介

1．表面键合浓度高
2．表面活性剂（SDS，Triton X－100， Tween 20 等）洗涤，键合蛋白质不脱落，质量更稳定
3．热稳定性好，适合应用于 PCR
4．昂贵样品、小分子和抗体片段共价键合效果好
5．多点吸附容易变形或者变性的大蛋白质分子，共价键合效果好

一步法键合

1. 计算 EDAC 用量，建议 EDAC 用量是微球羧基的 0.5－2.5 倍（Meq/g 等于 μmole/mg；1ml 1％微球包含 10mg 微球）
(酸含量，umol/mg)X(10mg 微球)X（比率）＝EDAC 用量 umol
EDAC 用量 μmol/ 52μmol/ml＝EDAC 体积 ml

2. 将配好的溶液按以下顺序加入离心管中，室温搅拌 15 分钟
50μL 500mM 储存缓冲液（25mM）
加水稀释至 1ml
蛋白质溶液
100μL 10％微球（10mg）

3. 根据计算量量取 EDAC 溶液，快速倒入上述溶液中，混匀

4. 室温搅拌 1 小时

5. 离心沉降后，轻轻倒出上层液体；用 50mM MES 缓冲液洗涤 3 次；离心沉降后，倒出上层液体

6. 加入 0.97ml MES 缓冲液，微球浓度为 1％

7. BCA 法测定键合蛋白质含量

二步法键合

1. 将配好的溶液按以下顺序滴加入离心管
100μL 500mM MES 缓冲液（50mM）
加水稀释至 1ml
200μL 5％微球（或 100ul 10％微球）（10mg）
230ul NHS 溶液
EDAC 水溶液（计算量）

2. 室温搅拌 30 分钟

3. 离心沉降后，轻轻倒出上层液体；用 1ml 50mM MES 缓冲液洗涤 2 次；离心沉降后，倒出上层液体

4. 将配好的溶液按以下顺序加入离心管中，混匀
100ul 500mM MES 缓冲液（50mM）
加水稀释至 1ml
蛋白质溶液

5. 室温搅拌 1 小时

6. 离心沉降后，轻轻倒出上层液体；用 1ml 50mM MES 缓冲液洗涤 3 次；离心沉降后，倒出上层液体

7. 加入 0.97mlMES 缓冲液，微球浓度为 1%

8. BCA 法测定键合蛋白质含量

蛋白质含量测定

收集未被吸附的蛋白质，测定其含量，间接计算出被吸附的蛋白质量。常用的蛋白质检测方法是 BCA 分析。 使用分光光度计测试蛋白质在 280nm 波长的吸光度可以得出更加准确的数据。

280nm 处吸光度 A280

仪器：1. 分光光度计（配备 UV 读数）
2. 匹配的石英试管
3. 巴斯德吸液管

试剂：1. 吸附缓冲液（空白测试）
2. 含未吸附蛋白质的洗涤液

测试方法：

（单波长分光光度计）

不放置试管，测试 A280，归零，

将吸附缓冲液加入试管，测试，读取 A280，再归零（本步骤测定吸附缓冲液是否有显著吸光度），

倒掉试管中的缓冲液，添加回收蛋白质缓冲液，测试，记录吸光度。

（双波长分光光度计）

放置空试管，测试 A280，归零，

将吸附缓冲液加入试管；参比测试点放置空试管，测试，读取 A280（本步骤测定吸附缓冲液是否有显著吸光度），

倒掉试管中的缓冲液，添加回收蛋白质缓冲液；参比测试点放置装有吸附缓冲液的试管，测试，记录吸光度。

建议：

使用 1cm 试管，通常假定 1 吸光度相应于 1mg/ml 蛋白质。便于对比，蛋白质 1mg/ml 浓度测试的 A280 值如下：

蛋白质	A280（1mg/ml）
牛血清白蛋白	0.7
卵清蛋白	0.79
球蛋白	1.38
胰岛素	1.60
糜蛋白酶	2.02
淀粉酶	2.42

如果吸光度超出量程，使用缓冲液稀释样品重新测试，或者使用更短的试管测试；玻璃或者塑料试管吸收紫外光，不能用于此测试。

提示：

吸附微球的质量与使用的试剂有很大关系，应使用高质量的试剂；此吸附步骤仅用于相应操作指导，对于不同的蛋白质，为了获得更好的吸附效果，需要做相应优化。