

抗体/蛋白标记

标记后净化与浓缩的标准化高效操作方案

蛋白制备一路走来,可谓千辛万苦,每个阶段采用不同的方案会带来不同的得率、纯度,不断地优化方案以期获得更高性价比的策略,大家都是如履薄冰、精益求精。高品质抗体的制备尤其具有挑战性,在传统的蛋白操作中遇到的各种问题会被进一步放大,亟待改进。默克生命科学为此探索并建立了以超滤管为核心的简单快捷标准操作,为抗体/蛋白标记后处理提供了最佳方案。

用超滤管进行抗体标记反应后的净化处理

使用Amicon® Ultra超滤管经过几轮渗滤即可有效地从抗体偶联反应中去除未掺入的标记物,制备得到纯净的抗体,同时对产物进行浓缩。

以下是标准化的超滤管离心操作,推荐用于 $\geq 1\text{mg}$ 的抗体样品【蛋白操作与此类同】:

- 将2 mL含有1 mg荧光标记抗体的溶液加载到两个Amicon® Ultra-4 mL 10 kDa超滤管中,并以 $4,000 \times g$ 离心10分钟。
- 用水将截留在内管的样品(每管约 50 μL)重新稀释至2 mL,然后再次离心。并重复此步骤2次。
- 每次离心后保存截留物和滤液的样品,以便使用紫外-可见光谱进行SDS-PAGE分析和定量。



结果

超滤作为凝胶过滤的替方案在蛋白标记反应后净化操作中效果良好。

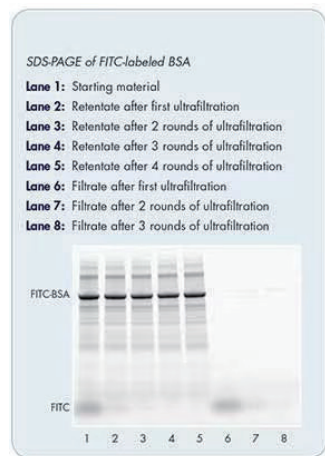


图1. 4次渗滤操作每个循环前后FITC标记的BSA进行SDS-PAGE凝胶电泳。未掺入的FITC在起始材料和第一滤液中可见。显示大部分游离FITC在一个超滤后已经被去除,在随后的过滤循环后几乎检测不到。

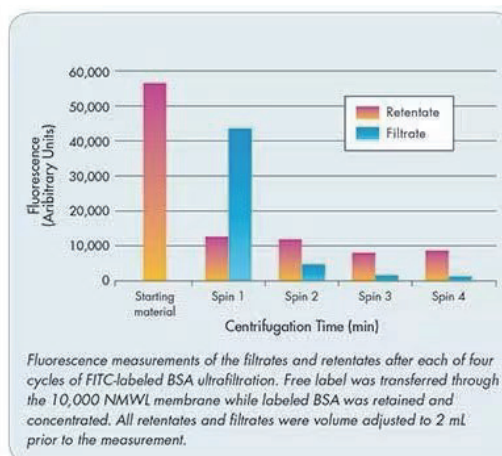
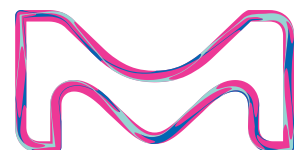


图2. 第一次超滤后游离FITC信号降低~80%,后续过滤循环后进去除率达98%。



1小时完成小量抗体标记反应后净化处理方案

研究者希望市售的各种标记抗体/蛋白能满足他们多样化的实际需要,但有时候也不得不用蛋白标记试剂盒DIY制备符合自己特殊要求的抗体/蛋白。传统方法包括从抗体中去除BSA等载质蛋白、进行标记反应、去除未结合的多余标记物、透析、浓缩,整个流程需要长达3天的时间,且在多次转移样品过程中会造成蛋白质大量损失。

采用默克生命科学创新的Amicon® Pro纯化超滤管,全部操作可以在1小时内完成!得益于其一体化设计,不需要转移样品,抗体的得率有了显著提高。采用Amicon® Pro进行小量抗体标记不仅又快又好,较之凝胶过滤和透析方案,在产量和操作方便性等方面都更令人满意。



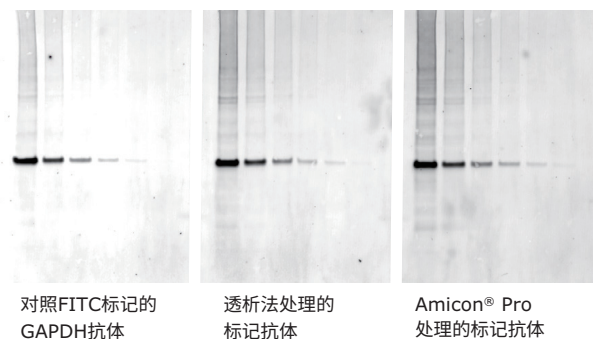
以下是标准化的Amicon® Pro操作,推荐用于<1mg的抗体样品【蛋白操作与此类同】:

1. 在上样池中加入0.5mL TBS-T预湿Amicon® Pro。1,000g离心1min。
2. 加入抗体样品
 - 对于比较稀释的样品(< 1 mg/mL)
 - 上样池下端接上Amicon® Ultra 0.5mL超滤管(建议使用50kDa)。
 - 加上至多1mL抗体样品,4,000g离心15min。
 - 对于浓度较高的样品(≥1mg/mL)
 - 在Amicon® Ultra 0.5mL超滤管(建议使用50kDa)中加入至多100μL样品。
 - 将装有样品的Amicon® Ultra 0.5mL超滤管接在Amicon® Pro上样池的下端。
3. Amicon® Pro上样池内加入预先准备好的1.5mL含有染料反应混合液。
4. 4,000g离心15min。
5. 优化选做:将样品在室温下多孵育30min。
6. 上样池中加入1.5mL PBS± NaN3。
7. 4,000g离心15min换液同时浓缩。
8. 倒转Amicon® Ultra 0.5mL超滤管1,000g离心回收标记好的抗体。

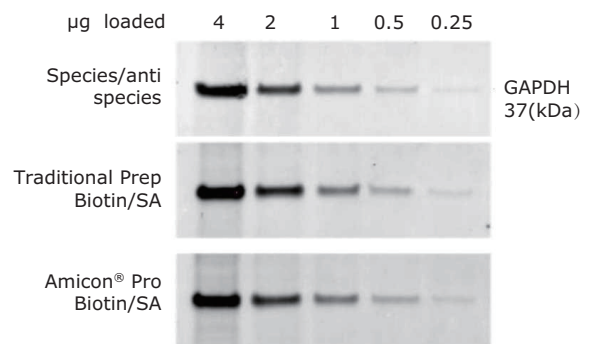
Amicon® Pro与传统抗体标记方法的比较

抗体标记* 参数及相关步骤	标记前后 采用透析法换液	Amicon® Pro
起始抗体需要量	>=1 mg	>=20 μg
缓冲液置换	过夜	15分钟
Biotin标记	2-3小时	30分钟
除去多余Biotin并换液	过夜	15分钟
操作总用时	3天	1小时
操作步骤	11步	5步
样品转移次数	3次	0次
抗体得率	39%	72%

*抗体标记一般包括4个步骤:去除载质,标记反应,去除多余未结合成分及换液,浓缩。不同标记反应所需时间不同。这里显示的是用Innolink™ Biotin 354S(目录号203119)进行生物素标记的操作用时。



GAPDH



抗GAPDH抗体使用Amicon® Pro系统进行生物素化,用于在蛋白质印迹中成功检测GAPDH。取EGF刺激的A431细胞裂解液(0.25-4 μg)等分试样通过SDS-PAGE分离,转印到Immobilon® -P膜上,并使用各种间接检测对在SNAP i.d. 2.0系统中探测β微管蛋白。所有情况下使用相同数量的一抗(GAPDH特异性)。

产品订购信息

产品描述	截留分子量 MWCO				
	3,000	10,000	30,000	50,000	100,000
4ml Amicon® Ultra超滤管 (96/PK)	UFC800396	UFC801096	UFC803096	UFC805096	UFC810096
15ml Amicon® Ultra超滤管 (96/PK)	UFC900396	UFC901096	UFC903096	UFC905096	UFC910096
0.5ml Amicon® Ultra超滤管 (500/PK)	UFC5003BK	UFC5010BK	UFC5030BK	UFC5050BK	UFC5100BK
Amicon® Pro 纯化超滤管 (24/pk) 【搭配以上AU0.5一起使用】			ACS500024		

提供Amicon® Ultra中文说明书及Amicon® Pro操作视频。咨询请联系默克生命科学技术热线 400-620-3333。

一步直达 纯化·浓缩·换液 从此变得轻松无比

默克生命科学Amicon® 超滤系列产品
为您提供最优化操作方案



上海
上海市浦东新区东育路227弄3号
前滩世贸中心(二期)C栋15-20层
电话: (021)20338288
传真: (021)50803042
邮编: 200126

北京
北京市朝阳区将台路甲2号
诺金中心25层
电话: (010)59072688
传真: (010)59072699
邮编: 100016

广州
广州市天河区冼村路5号
凯华国际中心1201-1204
电话: (020)32255333
传真: (020)32255380
邮编: 510623

成都
成都市锦江区人民南路二段1号
仁恒置地广场1706室
电话: (028)80740222
传真: (028)80740227
邮编: 610016



默克生命科学
致力于解决生命科学中的棘手问题



默克生命科学微客服
一站式产品货期、定单物流、
发票、账款查询平台

默克生命科学技术服务热线: 400 620 3333或400 889 1988转2号线
中国技术服务中心: tscn@merckgroup.com
更多详情, 敬请登录: www.merckmillipore.com www.sigmaaldrich.cn
资料编号: 09/2023