

C5 芯片氨基偶联操作规程

1 实验目的

通过氨基偶联在 C5 芯片共价偶联配体，供后续分析使用。

2 耗材与试剂

2.1 实验耗材

C5 芯片 1 块

2.2 实验试剂

氨基偶联试剂盒 1 份、预偶联试剂盒 1 份、相应配体蛋白

3 实验操作

Running buffer 用 1X PBS-T 或 1X HBS-T 等常规生理条件 buffer 均可。

【注意】：氨基偶联阶段，buffer 不可以用 Tris buffer，且配体蛋白内不得含 Tris、伯氨基基团等会干扰氨基偶联程序的基团。

3.1 C5 芯片初始化

C5 芯片用 50mM NaOH 进行 condition，30 μ L/min 流速，AB 通道，进样 60s，共进行 3 次。洗去芯片表面保护剂后再进行后续实验。

3.2 配体预富集（pH scouting）

分别用 pH 4.0、4.5、5.0、5.5（预偶联试剂盒）稀释配体蛋白至特定浓度（为保证蛋白有效带电，建议稀释比 > 50 倍）。“够用原则，尽量温和”，选择最终用于偶联的合适条件。

3.3 配体氨基偶联

① 活化芯片表面羧基

EDC (75mg/mL) 与 NHS (11.5mg/mL) 等体积混合, 10 μ L/min, AB 通道, 进样 420s.

注意: 活化试剂极易水解失效, 请现配现用或冷冻分装后即时化冻使用, 且混合后 15min 内上机使用。

② 氨基偶联配体

用合适 pH 的醋酸钠溶液稀释配体蛋白至合适的浓度, 10 μ L/min, **B 通道**, 进样 600s

(实际进样时间可根据需求酌情调整)。

③ 封闭芯片表面位点

用乙醇胺 (EA) 封闭芯片表面的多余活化羧基位点, 10 μ L/min, AB 通道, 进样 420s.

3.4 氨基偶联注意事项

- ① 全新 C5 芯片需要做初始化, 基线会有 200-1000RU 不等的下跌, 由保护层被洗脱导致, 是正常现象;
- ② 请注意, 预富集完全依靠静电作用靠近芯片表面, 其富集量对共价偶联量有参考意义, 但未必完全一样, 需要具体案例具体分析;
- ③ 建议氨基偶联后, 进样 1~2 针高浓度分析物做简单互作 (例如, 30 μ L/min, 结合 120s, 解离 180s)。对表面配体的活性、合理的互作条件等做出判断后, 再进行多浓度的 full KD 测试。
- ④ 芯片表面经过氨基偶联配体蛋白后, 再生条件、芯片寿命等均由配体蛋白自身性质决定。