

版本 3e 最新修订于：2023 年 4 月 12 日

ab218260

寡核苷酸偶联试剂盒

Abcam 子公司 Expedeon 的一款产品

适用 Expedeon 产品货号：425-000、425-0300

用于抗体与寡核苷酸的共价偶联。

本产品仅供研究使用，不得用于诊断。

最新版本请参考官网英文说明书。

目录

1. 概述	2
2. 试剂盒提供的材料和保存方法	3
3. 技术注意事项	3
4. 实验步骤	6
5. 寡核苷酸偶联抗体的分析	11

1. 概述

寡核苷酸偶联试剂盒 (ab218260) 可在 2 小时内简单、高效地生成寡核苷酸偶联抗体, 而且可以生成抗体与寡核苷酸比例不同的偶联抗体。该试剂盒包含阳性对照品, 便于用户确认化学偶联反应是否正确。

该试剂盒可以用于抗体与 10-120 个碱基长度的单链寡核苷酸或长达 80 个碱基长度的双链寡核苷酸的偶联。寡核苷酸应加以合成, 确保其末端含有一个氨基。

1 次份试剂盒内含 100 μg 抗体偶联 1 次所需的试剂和 1 份对照品。

3 次份试剂盒内含 100 μg 抗体偶联 3 次所需的试剂和 1 份对照品。

和预期一样, 在任何化学偶联反应中, 寡核苷酸和抗体的浓度及缓冲液配方需符合特定的参数, 详见本手册。

2. 试剂盒提供的材料和保存方法

收到试剂盒后，立即将活化试剂和缓冲液置于 4°C 保存，并将纯化试剂和分离柱置于室温下保存。

Item	Quantity		Storage Condition
	1 × 100 µg	3 × 100 µg	
Oligo Activation Reagent	2 Vials	4 Vials	4°C
Antibody Activation Reagent	2 Vials*	4 Vials**	4°C
Oligo Control (freeze dried)	1 Vial	1 Vial	4°C
Antibody Control (freeze dried)	1 Vial	1 Vial	4°C
Separating Columns	4 Units	8 Units	RT
Wash Buffer	80 mL	160 mL	4°C
Conjugate Clean Up Reagent	2 mL	6 mL	RT
Antibody Suspension Buffer	0.5 mL	1 mL	4°C

* (1 次反应 + 1 份对照品); ** (3 次反应 + 1 份对照品)

3. 技术注意事项

3.1 寡核苷酸预偶联注意事项

该试剂盒可用于偶联单链和双链寡核苷酸。单链寡核苷酸的长度必须在 10-120 个碱基范围内，并且必须通过合成在末端嵌入一个氨基。

(所有市售寡核苷酸供应商都能提供这种修饰。) 5' 位末端氨化的寡核苷酸偶联效率略高。双链寡核苷酸的长度可达 80 个碱基，但只有一端应是氨化的。

必须通过 HPLC 纯化寡核苷酸，使其在 100 µL 适当缓冲液（详见下文）中的浓度达到 60-100 µM。如果寡核苷酸的浓度高于 100 µM，用洗涤缓冲液稀释至 100 µM。

反应体积应为 100 µL。

3.2 抗体预偶联注意事项

该试剂盒可在每次反应中偶联 100 μg 抗体。为了得到最理想的结果，必须纯化抗体，使其在 100 μL 适当缓冲液（详见下文）中的浓度达到 1 mg/mL 。如果抗体浓度偏高，应用洗涤缓冲液稀释至 1 mg/mL 。

不建议使用低于该量的抗体进行偶联。否则，应在偶联之前使用抗体浓缩纯化试剂盒 ([ab102778](#)) 浓缩抗体。

反应体积应为 100 μL 。

3.3 缓冲液注意事项

缓冲液成分	寡核苷酸缓冲液	抗体缓冲液
pH	6 - 8	7 - 9
不含氨基的缓冲液（磷酸盐缓冲液最佳）	是	是
非缓冲盐类（如氯化钠）	是	是
螯合剂（例如 EDTA）	是	是
糖	是	是
甘油	< 50%	< 50%
硫柳汞	否	否
叠氮化钠*	< 0.1%	< 0.1%
BSA*	< 0.1%	< 0.1%
明胶*	< 0.1%	< 0.1%
Tris	否	< 20 mM
甘氨酸	否	否
伯胺	否	否
硫醇 (如巯基乙醇或 DTT)	否	否

Δ 注：*上述各成分的浓度不会影响偶联反应。但是，与建议不高于某一浓度的其他化合物组合在一起可能会影响偶联反应。

4. 实验步骤

4.1 寡核苷酸活化

在寡核苷酸活化试剂瓶中加入 100 μL 寡核苷酸。轻柔混匀，并在室温下孵育 30 分钟。孵育期间进行步骤 4.2。

4.2 抗体活化

在抗体活化试剂瓶中加入 100 μL 抗体(浓度为 1 mg/mL)。轻柔混匀，并在室温下孵育 30 分钟。孵育期间进行步骤 4.3。

4.3 活化试剂脱盐

Δ 注：每种样本分别使用一根分离柱脱盐。分离柱只能使用一次。用完后请丢弃。

4.3.1 垂直固定每根分离柱。首先打开上端盖子。随后打开下端盖子，使储存液体通过分离柱。弃去从分离柱流出的液体。

4.3.2 从分离柱上端加入 3 mL 洗涤缓冲液，使液体在重力作用下流出，以便平衡每根分离柱。弃去流出的液体。重复上述步骤 4 次。

4.3.3 按照 4.1 和 4.2 的活化步骤，孵育样本 30 分钟后，从分离柱上端加入 100 μL 活化后的寡核苷酸或抗体，待液体完全被分离柱吸收。收集流出的液体并静置，直至您确认已成功偶联。

- 4.3.4 从分离柱上端加入 550 μL 洗涤缓冲液。将活化后的试剂推送至分离柱底部。待该液体被完全吸收后再进行下一步。收集流出的液体并静置，直至您确认已成功偶联。
- 4.3.5 在分离柱下方放置一支干净的微量离心管。从分离柱上端加入 300 μL 洗涤缓冲液。
- 4.3.6 从分离柱底部收集洗脱液。该洗脱液 (300 μL) 包含活化后的寡核苷酸或抗体，可以随时用于偶联。

4.4 活化试剂的保存

寡核苷酸和寡核苷酸对照品

活化后的寡核苷酸室温下最多保存 8 小时。如需长期保存，最多 12 个月，建议存放在 -20°C 下。

抗体和抗体对照品

活化后的抗体应置于冰上保存并在 2 个小时内使用。活化后的抗体稳定性差，不宜长期保存。

4.5 纯化寡核苷酸偶联抗体的制备

该试剂盒可用于产生一系列抗体与寡核苷酸比例不同的寡核苷酸偶联抗体。只需参照下表，在抗体中加入不同用量的寡核苷酸。最佳比例取决于使用该偶联物的具体实验，可能需要通过实验确定。

4.5.1 将 300 μL 的活化抗体加入到适量活化后的寡核苷酸和洗涤缓冲液中，如下表所示。

活化后的抗体体积 (μL)	活化后的寡核苷酸 体积 (μL)	洗涤缓冲液体 积 (μL)	抗体与寡核苷酸 的起始摩尔比
300	300	0	1:15
300	200	100	1:10
300	100	200	1:5
300	60	240	1:3

Δ 注：抗体与寡核苷酸的比例是一个平均数，因为偶联反应后会产生大量的标记抗体。每个抗体偶联的寡核苷酸数不会完全相同。

4.5.2 混匀并在室温下孵育 1 小时。偶联抗体也可以在室温下孵育过夜，不会产生不利影响。

4.5.3 现在，您的偶联抗体已经可供使用了。您还可以根据需要纯化偶联抗体，以去除任何未偶联的寡核苷酸（详见 4.6）。

4.5.4 未使用的活化后的寡核苷酸可以置于 -20°C 保存。

4.6 偶联抗体纯化

Δ 注：要想清晰地观察到沉淀，最少要用 50 μg 抗体。

- 4.6.1 将装有纯化试剂的试管放入温水（不高于 40°C）中加热 10 分钟并混匀。如果样本未完全溶解，将样本放在台式微量离心机中，以 13,000 xg 的最大推荐转速涡旋 1 分钟，取上清液备用。
- 4.6.2 在抗体/寡核苷酸混合液中加入等体积的纯化试剂，混匀并在室温下或置于冰上孵育 20 分钟。例如：在 600 μL 抗体/寡核苷酸混合液中加入 600 μL 纯化试剂。
- 4.6.3 在台式微量离心机中以 15,000 xg 的转速离心 5 分钟。所需离心时间取决于缓冲液成分和离心速度。离心速度不应超过 15,000 xg 。根据沉淀产生位置，在离心机上放置 Eppendorf 试管。
- 4.6.4 从离心机中取出样本，注意不要破坏试管底部的少量沉淀。如果没有观察到沉淀，额外加入纯化试剂（1/10 体积），混匀并置于冰上孵育 10 分钟，然后离心。如果使用非抗体蛋白时未观察到沉淀，加入体积相当于 4.6.2 所述体积一半的纯化试剂，混匀并置于冰上孵育 10 分钟，然后离心。例如：如果 4.6.2 加入了 600 μL 纯化试剂，则再加 300 μL 纯化试剂。
- 4.6.5 小心去除上清液后静置，直到确定出现有效沉淀。

- 4.6.6 在沉淀中加入 100 μ L 抗体悬浮缓冲液，混匀。
- 4.6.7 要想尽可能多地去除游离寡核苷酸，应对同一偶联抗体进行二次纯化。
- 4.6.8 现在，寡核苷酸偶联抗体已经可供使用了。

4.7 寡核苷酸和抗体对照品的使用

每个偶联试剂盒内含一种寡核苷酸对照品（长达 30 个碱基并携带一个 5'末端氨基的寡核苷酸）和一种抗体对照品（兔 IgG）。这些试剂可作为阳性对照，用于确定化学偶联反应是否符合预期。

寡核苷酸/抗体对照品的活化步骤：

- 4.7.1 分别在寡核苷酸对照品和抗体对照品冻干瓶中加入 100 μ L 洗涤缓冲液。
- 4.7.2 在寡核苷酸活化试剂瓶中加入 100 μ L 寡核苷酸对照品。混匀并在室温下孵育 30 分钟。
- 4.7.3 在抗体活化试剂瓶中加入 100 μ L 抗体对照品。混匀并在室温下孵育 30 分钟。
- 4.7.4 同时进行脱盐操作（步骤 4.3）。

4.8 偶联抗体的保存：

寡核苷酸偶联抗体的长期稳定性取决于多个因素，包括抗体和寡核苷酸本身、保存温度和保存条件。

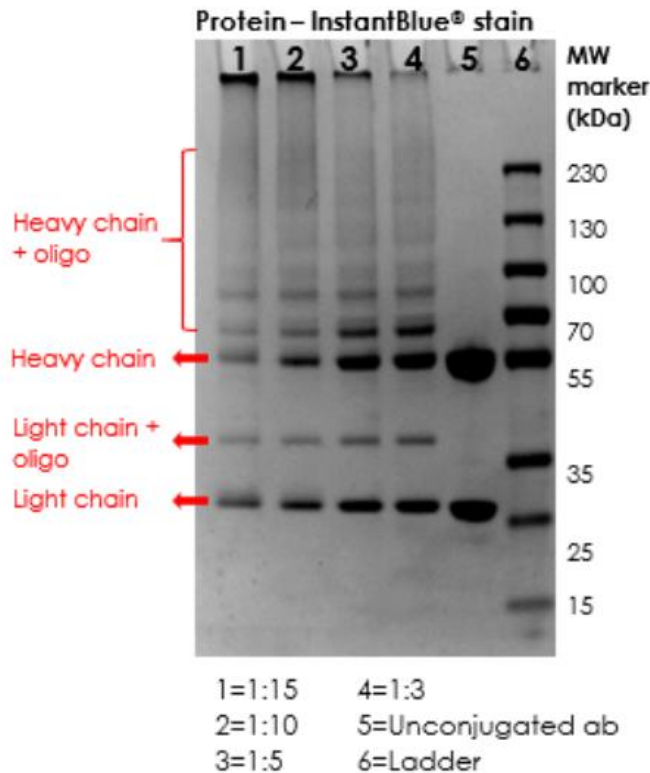
为充分增强稳定性，我们建议尽可能浓缩并在低温下保存偶联抗体。我们建议您向抗体及寡核苷酸制造商确认，他们的产品是否能在 -20°C 下保存在 50% 的甘油中——这种条件能保存大多数偶联抗体，只要它们能与非偶联抗体和寡核苷酸共存。如果适合您的试剂及随后的实验，添加防腐剂也会有所帮助。

5. 寡核苷酸偶联抗体的分析

寡核苷酸偶联抗体的分析方法有很多种。确定偶联的最好方法是使用偶联抗体的实验出现阳性结果。此外，还可以使用凝胶电泳分析偶联抗体。

- 5.1 在还原性 SDS-PAGE 凝胶上运行少量 (5-10 μg) 偶联抗体。将偶联抗体样本与 2X 凝胶上样缓冲液 (非试剂盒内供) 混合, 并在 100°C 下加热 5 分钟。
- 5.2 样本冷却后, 上样至还原性 SDS-PAGE 凝胶上。推荐使用 4%-12% 的梯度凝胶, 以便取得最佳结果。在还原条件下跑胶并用考马斯蓝染色剂或合适的同等试剂对蛋白染色。脱色后, 分析凝胶中是否存在寡核苷酸偶联抗体。下图为标准 IgG 凝胶图 (每个孔内加入 5 μg 偶联抗体)。

寡核苷酸偶联后还原 SDS-PAGE



Δ 注: IgG 由两条重链和两条轻链组成。并非所有的链都会连接到一个寡核苷酸上。即使偶联非常成功,也会存在大量未标记的抗体重链和轻链。对于低比例偶联抗体而言,更是如此。高比例偶联抗体还常常发生交联,从而妨碍偶联抗体在凝胶上的迁移。

Δ 注: 连接到寡核苷酸上的抗体链的染色效率没有未标记抗体链高。因此应对凝胶图进行定性分析,而非定量分析。

Δ 注: 重链位移大小取决于其偶联的寡核苷酸大小。寡核苷酸越大,产生的条带越大,反之亦然。上述示例使用的寡核苷酸类型为 30 mer。

Δ 注: 其他抗体亚型,例如 IgM,会在凝胶上生成不同的带型。

备注

技术支持

Copyright © 2023 Abcam. 版权所有。Abcam 徽标是注册商标。打印时确保所有信息/详情均正确。

如需进行技术或商业咨询，请访问：

www.abcam.com/contactus

www.abcam.cn/contactus（中国）

www.abcam.co.jp/contactus（日本）