**山东蓝都生物科技有限公司 www.landubio.com**

**时间分辨微球（羧基）偶联方法**

**粒径： 100nm-300nm**

**激发/发射：365/610nm**

# Ⅰ. 微球的清洗

一般取 1mg 微球(10mg/ml) 标记 0.1mg 抗体，不同项目可进行两边浓度摸索优化。

具体操作流程如下：

1.100ul 微球 + 900 ul 标记缓冲液（50mM MES,pH 6.0，或者0.05MPBS,pH 6.0）；

2.17000rpm,离心 20min，第一遍；

3.去掉上清，用 1000ul 标记缓冲液重悬微球；

4.17000rpm,离心 20min，第二遍；

5.去掉上清，用 1000ul 标记缓冲液重悬微球（离心后微球重悬可使用水浴超声仪，建议功率 500-700W，超声时长 2-5min，下同），备用。

# Ⅱ. 微球的活化

各称取 20mg NHS 和 EDC，用标记缓冲液溶解，现用现配，即 20mg/ml NHS 和 EDC； 取 20ul NHS，加入到清洗后的微球中，快速混匀；

然后再取 5ul EDC 加入到微球中，快速混匀； 室温孵育，20-30min。

**Ⅲ. 清洗去除残留 EDC**将活化后的微球：

1.17000rpm,离心 20min，第一遍；

2.去掉上清，用 1000ul 标记缓冲液重悬微球；

3.17000rpm,离心 20min，第二遍；

4.去掉上清，用 1000ul 标记缓冲液重悬微球，备用。

# IV. 微球与抗体的偶联

取 0.1mg 抗体溶解于（50mM MES,pH 8.5，或者0.05MPBS,pH 8.5）于 2ml 离心管中，加入活化后的微球，快速混匀后，室温孵育，3 小时。

**Ⅴ. 封闭**

配制 20mg/ml 的 BSA，即称取 20mg BSA,用终浓度 100mM 乙醇胺溶液充分溶解，备用。

微球标记抗体后，加入 100ul 上述封闭液（含 BSA），室温孵育 1 小时。 **Ⅵ. 去除未结合的抗体**

此步骤目的是通过高速离心的方法去除游离的未结合微球的抗体；

具体流程如下：

1.17000rpm,离心 20min，第一遍；

2.去掉上清，用 1000ul 稀释液（50mM PBS，pH 7.4 或 50mM Tris，pH 8.0）重悬微球；

3.17000rpm,离心 20min，第二遍；

4.去掉上清，用 1000ul 稀释液重悬微球，即为抗体-微球标记复合物，4℃放置备用， 如长期保存需加入终浓度为 0.2% BSA 和 0.02% NaN3 溶液。

# 注意事项

1. 保存条件：本产品需要于 2-8℃保存，切勿冷冻；
2. 本产品在使用前确认处于均匀的悬浮状态，有轻微结块可以用超声去除；
3. 本产品活化后建议立即进行偶联实验，活化状态不宜长时间保存；
4. 本产品仅供科研使用。