

FlexAble Oligo-Ready抗体标记试剂盒

工作原理

第一部分：Oligo-FlexLinkers的制备



功能化（如，DBCO）的单链DNA寡核苷酸（ssDNA oligo）与带有活性基团（如，Azide）的FlexLinker，可发生Azide-DBCO的点击化学偶联反应，生成Oligo-FlexLinkers。（该方案还包含一个清除步骤，用于去除多余的oligo）。

- 1个试剂盒提供的FlexLinker足以用于将多达3种不同的oligo偶联到Linker上（可扩展范围：3×33 μg至1×100 μg）。
- 此方案已包含了clean-up的步骤，用于去除反应体系中多余oligo。
- Oligo-FlexLinker的稳定性良好，可在-20℃下保存长达6个月。

第二部分：抗体标记



使用生成的Oligo-FlexLinkers对一抗进行标记，整个过程只需15分钟，操作简单，动手时间短。

- 1个试剂盒可制备足够的 Oligo-FlexLinker去标记100 μg一抗（或标记200种不同的一抗）。
- 每次反应最低可标记0.5μg一抗。

注意事项

FlexAble Oligo-Ready试剂盒采用FlexAble抗体标记技术，通过两步可快速轻松制备寡核苷酸偶联抗体（Oligo-Antibody）。该技术使用一种名为 FlexLinker 的高亲和力、Fc 特异性标记试剂，该试剂带有1或2个叠氮基团，可通过点击化学与DBCO-oligos发生反应，生成Oligo-FlexLinker。偶联后，Oligo-FlexLinker偶联物能够实现抗体的位点特异性且高亲和力的标记，从而确保一致且可靠的性能。

- 每个试剂盒提供的FlexLinker足以标记总计100 µg的抗体。反应体积可按比例调整。您可根据实验需求，进行多次小规模反应或一次大规模反应。本实验方案介绍了如何制备足量的Oligo-FlexLinker，以标记最多33 µg的一抗，该过程仅使用了试剂盒提供的待偶联的FlexLinker总量的三分之一。
- 我们不建议在制备每个Oligo-FlexLinker时使用过少的试剂，因为这可能会因样品在制备过程中损失而导致产率显著下降。
- 该方案包含一个清除步骤，用于去除多余的DNA（Oligo）。
- 可将中间产物Oligo-FlexLinker在-20℃下储存（最长6个月），或直接用于标记所需量的一抗。
- 每次反应可标记至少0.5 µg的一抗，使您能够使用一套试剂盒标记多达200种不同的一抗，或根据需要进行扩展（最多可标记100 µg的一种抗体）。
- 请注意，该试剂盒未包含实验方案所需的所有试剂。

以下试剂须从您的实验室或其他供应商处获取：

试剂	所需量	用途
DBCO-Oligo	1x DBCO-ready: 5 nmol/ 33 µg 2x DBCO-ready: 10 nmol/ 33 µg 适用于 1/3 试剂盒用量（可根据需求按比例放大）	与 FlexLinker 反应，生成 Oligo-FlexLinker
Ni-NTA 琼脂糖珠	300 µl（或 100 µl/33 µg）	通过与 FlexLinker 上的 His 标签结合，清除多余 oligo
PBS（无 DNA 酶）	每次 oligo-conjugation 需 5 ml	用于清洗
咪唑（1M 储备液，无 DNA 酶）	每次 oligo-conjugation 需 1 ml	用于洗脱
脱盐柱	每次 oligo-conjugation 需 1 个	在洗脱后用于去除咪唑

1.1 制备Oligo-FlexLinkers

本部分介绍FlexLinker与DBCO功能化的oligo（DBCO-functionalized oligo）的偶联过程。

若使用Amine oligos，请参考第7页的可选部分。

注意：本部分介绍Oligo-FlexLinker的制备，可用于标记总共33 µg的一抗。若需制备用于标记100 µg抗体的Oligo-FlexLinker量，反应体积可按比例放大。下方中提供了体积缩放部分的示例。Oligo-FlexLinker制备好后，每次标记反应最少需0.5 µg的一抗（见第二部分）。

	FlexLinker (2 µg/µl)		Oligo (100 µM)
计划标记：	for 1 & 2 Oligos	+	1 Oligo 2 Oligos
33 µg抗体*	16 µl		50 µl (5 nmol) 100 µl (10 nmol)
50 µg抗体	25 µl		75 µl (7.5 nmol) 150 µl (15 nmol)
100 µg抗体**	48 µl		150 µl (15 nmol) 300 µl (30 nmol)

* 16 µl FlexLinker + 50 µl Oligo制备的Oligo-FlexLinker偶联物，可用于标记总计33 µg的一抗（或在一次反应中最少需0.5 µg抗体）。

** 48 µl FlexLinker + 150 µl Oligo制备的Oligo-FlexLinker偶联物，可用于标记总计100 µg的一抗（或在一次反应中最少需0.5 µg抗体）。

所需试剂

试剂盒包含

- FlexAble 1×或2×Azide (2 mg/mL，在50 µL总反应体积中，单次偶联使用16 µL)

需自备（不包含）

- DBCO-Oligo; 100 µM; 5 nmol (1×Azide) 或 10 nmol (2×Azide) (溶于1×PBS, pH 7.4)

操作步骤

1. 将16 µL FlexLinker (1×或2×Azide) 与 DBCO-Oligo (分别加入50 µL或100 µL) 混合。Oligo与FlexLinker的最终摩尔比约为 10:1。
2. 室温孵育过夜。
3. 按照第1.2部分所述进行纯化——去除游离Oligo。

1.2 去除游离Oligo

本部分介绍如何去除Oligo-FlexLinker中过量的Oligo。

该清除纯化过程包括以下两个步骤：

- Ni-NTA纯化，以去除游离未偶联的DNA oligo。
- 缓冲液置换，以去除前一步洗脱步骤中的咪唑。

注意：若要扩大此纯化步骤，仅需增加琼脂糖珠和洗脱液的体积。请勿增加洗涤步骤中的PBS体积，因为离心柱有体积限制，但可以增加洗涤次数。

所需试剂

试剂盒包含

- Spin columns（离心柱）

需自备（不包含）

- 按照第1.1部分所述制备的Oligo-FlexLinker偶联物（66 - 116 μL ）；
- Protino Ni-NTA Agarose（Macherey-Nagel, 745400.25, 50 μL ）或类似产品
- Zeba™ Spin Desalting 2 mL Columns（Thermo, 89890, 1支）或类似产品
- 结合与洗涤缓冲液：PBS
- Ni-NTA 洗脱缓冲液：将1 mL PBS与1 mL 1 M咪唑混合（最终浓度= 500 mM 咪唑）

操作步骤

Ni-NTA resin准备

1. 将100 μL Ni-NTA Agarose（悬液）加入置于2 mL EP管中的ChromoTek离心柱（打开底部塞子）中。
2. 以1000 $\times g$ 离心1分钟，弃去流出液。
3. 向凝胶珠（beads）中加入500 μL PBS。
4. 以1000 $\times g$ 离心1分钟，弃去流出液。
5. 重复步骤3和4。

Ni-NTA纯化——去除游离Oligo

1. 盖上ChromoTek离心柱的底部塞子，将Oligo-FlexLinker偶联物（66 - 116 μ L）加入凝胶珠中。室温下缓慢颠倒混匀30分钟。
2. 打开离心柱的底部塞子，并将其放入2 mL EP管中。
3. 以1000 $\times$ g离心1分钟，弃去流出液（含有游离寡核苷酸）。
4. 向凝胶珠中加入500 μ L PBS。
5. 以1000 $\times$ g离心1分钟，弃去流出液。
6. 重复步骤4和5。
7. 盖上离心柱底部塞子，向沉降后的凝胶珠中加入100 μ L Ni-NTA洗脱缓冲液。室温下缓慢颠倒混匀5分钟。
8. 将离心柱转移至一个新的2 mL EP管中，拔下底部塞子，以1000 $\times$ g离心1分钟。
9. 重复步骤 7和 8以回收所有样品（两次洗脱步骤使用同一个收集管）。

缓冲液置换

按照试剂商说明书，例如使用Zeba™ Spin脱盐柱将缓冲液置换为PBS。

注意：纯化后的Oligo-FlexLinker偶联物可于-20℃保存长达6个月。

2. Oligo-FlexLinker标记一抗

所需试剂

试剂盒包含

- FlexBuffer

需自备（不包含）

- 纯化后的Oligo-FlexLinker偶联物（在第1部分中制备）
- 一抗（与FlexAble Oligo-Ready试剂盒匹配的IgG种属和亚型）
- FlexQuencher（针对IgG种属和亚型特异）

操作步骤

1. 计算蛋白浓度：BCA增强型检测法（推荐）、SDS-PAGE（将已知浓度的标准品与5 - 10 μ L Oligo-FlexLinker偶联物在相邻泳道同时上样）或Qubit检测法。
2. 将0.25 μ g Oligo-FlexLinker（理想情况下体积应为2 - 3 μ L）与0.5 μ g 一抗混合。如果总体积小于8 μ L，请使用FlexBuffer将体积调整至8 μ L，并在室温下孵育5分钟。
3. 加入2 μ L FlexQuencher，混匀，并在室温下孵育5分钟。

注意：本部分中的体积是指单次FlexAble反应，用于标记0.5 μ g的一抗。您可根据需要标记的抗体总量，按比例调整反应体积和Oligo-FlexLinker偶联物的用量。调整时，请根据一抗的量按比例线性换算。每次反应所需的Oligo-FlexLinker 体积取决于制备的效率和产率。

使用Oligo-FlexLinker进行标记仅需15分钟，手动操作时间极短，且只需极微量的抗体，这意味着您可以轻松现配所需用量的抗体。然而，若需保存FlexAble标记的抗体，应针对每种特定的一抗确定其最佳保存条件，且条件可能因抗体而异。通常情况下，标记后的抗体可在+4°C下保存数天。

可选步骤：DBCO-PEG4标记Oligo

本部分介绍如何将DBCO基团偶联至氨基（Amine）修饰的寡核苷酸（Amine-Oligo）上。若您直接使用是DBCO-Oligo，请跳过此步骤。

所需试剂

需自备（不包含）

- 氨基（Amine）修饰的DNA oligo（HPLC 纯化），10 nmol
- 10×硼酸盐缓冲盐水（BBS），pH 7.6：0.5 M 硼酸盐，1.5 M NaCl，pH 7.6。将该缓冲液浓度稀释至1倍后，pH值变为8.5（见下页表格）。
- 二甲基亚（DMSO）
- 溶于DMSO的100 mM DBCO-PEG4-NHS（BroadPharm, BP-22288 或同等产品）
- 1.0 M Tris-HCl，pH 8.0
- DNA纯化柱（例如：Amersham MicroSpin G-25 Columns, Cytiva, 27-5325-01，或同等产品）
- 无核酸酶（Nuclease-free）水

操作步骤

* 根据所需的FlexAble标记量，按比例放大或缩小反应体系。

所需时间：30分钟。请在做Oligo-FlexLinkers的制备（说明书第一部分）前，完成DBCO-Oligo的偶联。

偶联

1. 将Amine修饰的Oligo溶于无核酸酶水中，使其浓度达到250 μ M。
2. 取40 μ L的Oligo溶液（10 nmol）转移至DNase/RNase-free的离心管中。
3. 加入5 μ L 10× BBS（占最终体积的10%），混匀10次。
4. 加入2.5 μ L的100 mM DBCO-PEG4-NHS溶于DMSO中，混匀10次。
5. 室温孵育15分钟。

注意：加入DBCO-PEG4-NHS后，混合液会略微变浑浊，几分钟后会重新变澄清。

6. 再取2.5 μL 的DBCO-PEG4-NHS（即2.5 μL 的等份试剂）加入同一个管子里，继续反应15分钟。

注意：第二次加入后溶液会变得稍微浑浊或混浊，但这不会影响偶联效率或后续对修饰Oligo的纯化。

7. 加入2.0 μL 1.0 M Tris (pH 8.0)（最终浓度约40 mM），室温孵育5分钟以淬灭残留的NHS基团。

8. 纯化偶联后Oligo时，请按照Amersham MicroSpin G-25层析柱（或同等产品）的试剂商说明书进行操作。

注意：Amersham MicroSpin G-25层析柱专为长度大于10个碱基的寡核苷酸设计。

10× 硼酸盐缓冲盐水 (BBS) 的配制

1. 向500 mL烧杯中加入100 mL Milli-Q水（超纯水）。
2. 加入75 mL 5 M NaCl。
3. 称取7.73 g硼酸，加入溶液中搅拌至其溶解。
4. 用2 M NaOH将pH值调节至7.6。
5. 用Milli-Q水定容至250 mL，并重新调节pH值至7.6（使用2 M HCl和2 M NaOH进行微调）。
6. 配制1× BBS 溶液时，取4 mL 10× BBS溶液，用Milli-Q水稀释至40 mL。
7. 将pH值调节至8.5。