

多肽完全抗原的制备

多肽的设计需遵循第二章所阐述的多肽抗原设计原则，如果设计上没有把握可以委托多肽合成公司协助设计（多肽合成服务公司一般都有资深多肽设计专家）；委托合成时，根据项目特点确定需求量和纯度；产品交付时，服务公司会提交质检报告，质检报告包括HPLC数据和质谱报告。

蛋白修饰性抗体我们一般通过多肽合成的方式制备抗原，因为蛋白修饰的只有通过化学合成才能做到其位点确认被修饰，常见的修饰有磷酸化、乙酰化、甲基化等修饰；这些修饰大部分的多肽合成公司都可以合成。

多肽不可以直接作为抗原免疫产生抗体，需要偶联到蛋白质载体上形成完全抗原，常用的载体主要是KLH（血蓝蛋白）和BSA（牛血清白蛋白）。

多肽偶联最常用方案：-SH偶联（通过Sulfo-SMCC试剂介导，合成时需要多肽的N-端或者C-端加上一个Cys引出一个游离的-SH）和-COOH/-NH₂偶联（通过NHS/EDC或者EDC介导交联）；-SH偶联可以实现精确定向连接。

多肽与蛋白偶联的方法和技术很多，不是专门研究有机化学的科研人员往往不知如何入手，为此福因德生物优化了部分偶联试剂和偶联方案，遴选一部分产品供科研客户选购。

SOP10 -SH介导多肽与载体偶联

1. Sulfo-SMCC活化cKLH载体蛋白(以偶联20mg多肽为例，根据实验实际偶联量，所有试剂体积作同比缩放)

(1)称取20mg cKLH (Frdbio, Cat No.: BCJ0002)，溶于2ml超纯水，配成【10 mg/ml cKLH溶液】。

(2)称取10 mg Sulfo-SMCC(Frdbio)于2ml超纯水配成【5mg/ml Sulfo-SMCC溶液】。

(3)将以上两种溶液等体积混匀，室温(25℃)反应60 min或者37℃反应30 min，磁力搅拌器慢速均匀搅动反应，避免产生气泡。

(4)反应完后将以上反应溶液装入10kD透析袋，在PBS(pH7.2)溶液中透析除去过多Sulfo-SMCC，每隔3h换液，至少换3~4次，确保透析完全，即为【活化的cKLH载体】（有条件的也可以用Sephdex-G25分子筛色谱分离或超滤管）。活化的cKLH要尽快使用，不可久放。

2. 多肽与载体的偶联

偶联前需检测多肽中-SH活性。

Ellman试剂法检测多肽-SH状态：

方法：在96孔酶标板中，10μl多肽+100μl Ellman试剂，用分光光度计在96孔酶标板中412nm进行测量，OD>0.15时，多肽SH正常，如果OD<0.15，说明多肽被氧化或者自我交联，不可使用。偶联完成之后，透析前用上述同样方法检测DO<0.03时，说明多肽已经80%以上全部偶联，可继续添加多肽；如果OD>0.03，说明多肽过量未全部偶联。如果没有Nano分光光度计，直接观察颜色，颜色变黄，说明游离-SH过量。

(5)称取20mg多肽溶解于5ml交联缓冲液(0.1M PB, 0.15M NaCl)中，配成【4mg/ml的多肽溶液】（对于难溶肽，可用≤30%的DMSO溶解），一般我们只偶联5~10mg多肽，等比例缩小体积即可。

(6)将第(4)步透析好的cKLH与第(5)步配好的【4mg/ml多肽溶液】混合，室温(25℃)4h（此处可检测多肽是否偶联充分，检测方法见上文Ellman试剂法检测多肽-SH状态）。

(7)最后用10kD的透析袋于PBS(pH7.2)中透析除去游离未偶联的多肽，至少换液4次，每次2h，磁力搅拌器上搅拌透析，调整到合适浓度分装成小管，-20℃保存。

3. Ellman试剂检测多肽-SH状态评估载体与多肽偶联效率方法见上文“Ellman试剂法检测多肽-SH状态”。

SOP11 EDC或EDC/NHS介导多肽与载体偶联

- 1.将载体蛋白cKLH(Frdbio, Cat No.: BCJ0002S) 溶解在偶联缓冲液(0.1M MES, pH4.7), 终浓度10mg/ml。
- 2.将待偶联多肽溶解在偶联缓冲液, 终浓度4mg/ml。
- 3.将步骤1和步骤2的溶液混合, 多肽与载体蛋白摩尔比为10:1。
- 4.将EDC试剂(Frdbio)溶解在偶联缓冲液中配制成1M EDC溶液。
- 5.步骤3的混合液在磁力搅拌下, 缓慢滴加步骤4的EDC溶液(EDC滴加的摩尔量与多肽相同), 置25℃磁力搅拌反应2h。

注: 如果此过程中, 产生沉淀应该减少EDC的用量直到得到可溶性溶液为止。

- 6.透析或凝胶过滤去除未偶联的多肽和EDC试剂, 并置换成PBS溶液(0.01M PBS,pH7.4)。

注: NHS与EDC可以显著提高偶联效率, 如果采用此方案, 只需要在步骤5中加入NHS至终浓度为5mM即可。

SOP12 Frdbio GA(Glutaraldehyde,戊二醛)介导多肽与载体偶联

- 1.将含氨基的载体蛋白溶解在偶联缓冲液(0.1M碳酸盐, 0.15M NaCl, pH8.5), 终浓度2mg/ml。
- 2.将待偶联多肽溶解在步骤1的溶液中, 终浓度2mg/ml左右, 多肽与载体蛋白摩尔比例20:1~40:1最佳。
- 3.在上述溶液中加入新鲜GA至终浓度为1%, 4℃磁力搅拌器上反应2~4h。

注意: 戊二醛最好在通风橱操作, 避免接触皮肤和眼睛。

- 4.反应完毕, 在上述溶液溶液中加入硼氢化钠至终浓度为10mg/ml, 4℃磁力搅拌器上反应1h。

- 5.透析或凝胶过滤去除未偶联的多肽和GA试剂, 并置换成PBS溶液(0.01M PBS,pH7.4)。

货号	产品名称	规格	产品描述
BCJ0010	Frdbio® -NH ₂ linking kit	5T/10T/50T	蛋白/多肽或者化合物都通过氨基偶联, 非定向偶联
BCJ0020	Frdbio® -SH Linking kit	5T/10T/50T	蛋白/多肽或者化合物通过-SH与-NH ₂ 偶联, 效率高。
BCJ0030	Frdbio® -COOH & -NH ₂ Linking kit	5T/10T/50T	介导蛋白/多肽或者化合物通过-COOH & -NH ₂ 偶联。
BCJ0030S	Frdbio® -COOH & -NH ₂ SuperLinking kit	5T/10T/50T	介导蛋白/多肽或者化合物通过-COOH & -NH ₂ 偶联, 效率更高。
BCJ0110	Frdbio® GA(Glutaraldehyde)linking Reagent	10mg/50mg/100mg	同双功能交联剂(-NH ₂)
BCJ0120	Frdbio® Sulfo-SMCC Linking Reagent	10mg/50mg/100mg	异双功能交联剂(-SH & -NH ₂)
BCJ0130	Frdbio® EDC.HCl Linking Reagent	10mg/50mg/100mg	异双功能交联剂(-COOH & -NH ₂)
BCJ0140	Frdbio® NHS SuperLinking Reagent	10mg/50mg/100mg	异双功能交联剂辅助试剂(-COOH & -NH ₂)
BCJ0001	Frdbio® BSA carrier	10mg/50mg/100mg	多肽偶联专用载体。
BCJ0001s	Frdbio® cBSA carrier	10mg/50mg/100mg	经过修饰, 离子化多肽偶联专用载体, 氨基更多。
BCJ0002	Frdbio® KLH carrier	10mg/50mg/100mg	多肽偶联专用载体, 分子量大, 更利于多肽抗体制备。
BCJ0002S	Frdbio® cKLH carrier	10mg/50mg/100mg	经过修饰, 离子化多肽偶联专用载体, 氨基更多。
BCJ0003	Frdbio® OVA carrier	10mg/50mg/100mg	多肽偶联专用载体。
BCJ0004	Frdbio® Polyk carrier	10mg/50mg/100mg	多聚有机化合物多肽偶联专用载体。

服务编号	服务名称	服务描述
PSS0011	多肽合成	固相多肽合成, 纯度最高99.5%, 最长可合成70个氨基酸。
PSS0012	多肽修饰	可修饰FITC, Biotin, 乙酰化, 甲基化, 磷酸化等。
PSS0021	多肽偶联蛋白载体	将多肽偶联到载体上制备完全抗原或者检测原, 常用载体BSA, KLH, OVA等。
PSS0021S	多肽多聚支架偶联	多肽偶联到载体制备完全抗原, 平均每个载体偶联20~100个多肽。

更多信息, 请垂询您的区域服务专员 ☎ 027-87877773; ✉ tech@friendbio.com