荧光平台-荧光微球标记推荐工艺

清洗：

取荧光微球 0.2ml 加入 2ml 的离心管，加入 1ml 偶联缓冲液，16000r/min*15min 4℃离心，去上清。加入 1ml PB 缓冲液，吹打混匀（如不易混匀时，水浴超声 5min），16000r/min*15min 4℃离心，去上清。

活化：

1．加入的 PB 缓冲液，将离心后的荧光颗粒复溶吹打混匀（如不易混匀时，水浴超声 5min），确保荧光颗粒全部混匀。

2．称取 NHS 与 EDC 分别 20mg,各取 1ml PB 缓冲液溶解 NHS 与 EDC，分别配制成 20mg/mL NHS 溶液、20mg/mL EDC 溶液（现配现用）。

3．取现配制的 20mg/mL NHS 溶液（=12.5μL/mg），加入到离心管中，震荡使之完全混匀，再边振荡边加入 20mg/mL EDC 溶液（=12.5μL/mg），水浴超声 5min，全部混匀。

4．将加完物料的离心管，放入 37℃的恒温振荡器中，于 200r/min 摇晃反应 25min。如过程中底部有沉淀，用超声细胞破碎仪超声混匀。

清洗：

清洗活化后的微球，将微球转移至干净的离心管中，高速冷冻离心机 16000r/min*15min 4℃离心，去上清，加入 0.4ml PB 缓冲液重复清洗一次后去上清。

偶联：

微球与抗体比列为 10:1，微球一共 2mg，抗体量为 0.2mg，抗体量与 PB 缓冲液的总量为 0.2ml,将加完物料的离心管，放入 37℃的恒温振荡器中，于 200r/min 摇晃反应 3h。如果过程中底部或瓶壁有沉淀或粘附物，超声细胞破碎仪超声。

封闭：

加入等体积的 **10%BSA**，吹打混匀，超声 5min 后，放入 37℃的恒温振荡器中，于 200r/min 摇晃反应 25min，加入等体积的甘氨酸封闭液，吹打混匀，超声 5min 后，放入 37℃的恒温振荡器中，于 200r/min 摇晃反应 25min。

保存：

将封闭好的微球，于 4℃的高速冷冻离心机 16000r/min*15min 4℃离心，去上清，加入 0.4ml 甘氨酸封闭液，吹打混匀，高速冷冻离心机 16000r/min*15min 4℃离心，去上清，加入荧光微球保存液（100μL/mg），吹打混匀，超声 5min，确保全部混匀，避光存放于 2-8℃，待用。

相关缓冲液配方：

PB 缓冲液：10mM PB, 0.01%ProClin300, PH=6.0（也可以使用 Mes 缓冲液）

甘氨酸封闭液：25mM Gly, 0.05%吐温 20, 0.01%ProClin300, PH=7.8

荧光微球保存液：

50mM Tris, 150mM NaCl, 0.05%吐温 20, 1%BSA, 5%海藻糖, 0.1% ProClin 300, PH=8.5

注意事项：

1. 标记过程中易出现沉淀或者黏附物，需要超声混匀，如发现现象严重，需要考虑调整活化或者封闭的过程，具体以实际操作为准。
2. 如抗体效价不高，可适当调整微球与抗体的比例，一般不超过 10:3，偶联过程中的试剂建议恢复室温后使用
3. 如检测过程中发现本底过高，可能封闭效价不好，或者超声分散不均匀（微球封闭可考虑使用本司的高分子材料封闭剂，使用浓度 0.5%）
4. 荧光微球标记完成后不宜 2-8℃储存时间过长，根据项目不一样，可能会出现不同程度的降解。保存缓冲液宜中性或偏碱条件。
5. 小量标记和大量标记会存在误差，需要摸索条件进行试产，试产后确定工艺方可大量投产。标记过程中不可控因素较多，实验过程中需多观察现象并进行记录。

此文章内容为本司实际生产过程中的方法及可能出现的问题，分享给客户及同行朋友，如有不足欢迎指导！