

## Биотинилирование антител, белков & Выделение клеток с использованием магнитных частиц, покрытых стрептавидином

В основе предлагаемого метода выделения специфических клеток при помощи антител, меченых биотином, лежит принцип иммуномагнитного разделения. Биотин – это витамин, широко известный в биотехнологии своей способностью к высокоаффинному связыванию с авидином и стрептавидином. Образующийся в ходе взаимодействия гаптен-протеиновый комплекс очень устойчив к физико-химическим воздействиям, что делает привлекательным использование системы биотин-авидин или биотин-стрептавидин для различных иммунных методов.

Предлагаемая нашей фирмой система наборов позволит вам до максимума упростить процедуру получения уникальных клеточных линий, продуцирующих определенные антигены на поверхности клеток.

Основное приложение для предлагаемых наборов:

- изучение экспрессии белков в клеточных линиях,
- выявление уникальных клеток в любой биологической жидкости.

Мы предлагаем следующие наборы:

| Название набора                          | Особенности набора   |
|--|--|
| <b>Биотинилирование антител (белков)</b> | В состав набора входят реактивы для конъюгации антител и белков с биотиновым зондом.<br>В набор может входить зонд с расщепляемой или с нерасщепляемой ножкой, к которой пришит биотин.<br>Предполагается использование специфических антител или белка заказчика. |
| <b>Магнитное выделение клеток</b>        | В состав набора входят реактивы для выделения клеток после связывания их с антителами меченые биотином.<br>В набор может входить реактив <b>SplitBond</b> , специфически расщепляющий ножку, соединяющий биотин с антителом.                                       |

## Набор

### Биотинилирование антител, белков

Биотинилирование белков, а также антигенов и антител, широко используется в ELISA/EIA для выявления молекул или целых клеток. В нашем наборе мы используем реагент для биотинилирования растворимый в воде со спейсером длиной 24 ангстрема. Использование длинного спейсера значительно снижает стерические препятствия при взаимодействии меченых биотином белков как с другими белками, так и со стрептавидином, что приводит в конечном этапе к повышению чувствительности метода. Способность реагента для биотинилирования растворяться непосредственно в воде позволяет избежать использования таких органических растворителей как ДМСО или ДМФ и делает процедуру мечения более эффективной. В состав стандартного набора (кат.номер **K0321**) входит реагент для биотинилирования с нерасщепляемой ножкой, которая соединяет биотин с белком. В состав набора кат.номер **K0322** входит реагент для биотинилирования **BioSplit** с расщепляемой в специальных условиях ножкой.

Состав наборов рассчитан до десяти процедур мечения

| Название набора                          | Состав набора                                | Хранение |
|--|--|----------|
| <b>Биотинилирование антител (белков)</b> | Реагент для биотинилирования                 | 10 мг    |
|  | x10-кратный буфер для конъюгации             | 50 мл    |
|  | Буфер для растворения реагента               | 2 мл     |
| <b>Биотинилирование антител (белков)</b> | Реагент для биотинилирования <b>BioSplit</b> | 10 мг    |
|  | x10-кратный буфер для конъюгации             | 50 мл    |
|  | Буфер для растворения реагента               | 2 мл     |

#### Протокол проведения процедуры биотинилирования

(В приводимых ниже протоколах мы предлагаем процедуру, которую считаем оптимальной. Процент биотинилирования составляет 95% и выше. В соответствии со своими задачами вы можете модифицировать данную процедуру).

- ✓ **Очень важно !!! Все протоколы рассчитаны на использовании в реакции биотинилирования 1 мг реагента для биотинилирования. Поэтому перед началом работы взвесьте в отдельную пробирку 1 мг реагента для биотинилирования. Если взвешено другое количество реагента, пересчитайте пропорционально все количества других добавляемых реагентов.**

#### Протокол 1: биотинилирование антител

Этот протокол представляет собой простую воспроизводимую процедуру для биотинилирования поликлональных и моноклональных очищенных антител.

##### 1. Растворите антитела, предназначенные для конъюгации, в 1 мл x1-кратного буфера для конъюгации до концентрации 5 мг/мл.

Антитела могут быть приготовлены из лиофилизованных антител, растворением их в буфере для конъюгации до нужной концентрации, или разведением антител уже находящихся в растворе. Если антитела растворены в воде или в буфере PBS можно довести концентрацию антител до необходимой при помощи воды и x10-кратного буфера для конъюгации. Если антитела содержатся в буфере, состав которого вам неизвестен, диализуйте или поменяйте буфер при помощи концентрирующих мембран на x1-кратный буфер для конъюгации.

- ✓ **Очень важно убедиться, чтобы раствор антител не содержал *азид натрия*, *Трис*, посторонние белки и другие мешающие компоненты. Если ваши антитела содержат подобные компоненты обязательно диализуйте или гельфильтруйте ваши антитела и переводите их в x1-кратный буфер для конъюгации. Присутствие посторонних компонентов значительно снижает эффективность биотинилирования.**

##### 2. Добавьте в пробирку с заранее взвешенным реагентом для биотинилирования (1 мг) 100 мкл буфера для растворения реагента. В результате получается раствор реагента с конечной концентрацией 10 мг/мл.

100 мкл раствора реагента для биотинилирования хватает для биотинилирования до 10 мг антител. Обычно рекомендуемое соотношение биотин:белок составляет от 1:8 до 1:10 (т.е., 1 мг реагента для биотинилирования на 8-10 мг антител).

- ✓ Раствор реагента для биотинилирования необходимо готовить **непосредственно перед использованием**. Хранить раствор реагента нельзя.

**3. Добавьте 60 мкл раствора для биотинилирования (10 мг/мл) к 1 мл раствора антител (5 мг/мл). Инкубируйте смесь в течении 2 часов при комнатной температуре (~ +22 °С) или в течении ночи при +4 °С.** В процессе инкубации периодически переворачивайте пробирку для равномерного распределения компонентов смеси. После инкубации антитела можно диализовать против двух смен PBS с 0.01%-ым азидом натрия при +4 °С, но, как показывает практика, в диализе нет необходимости.

**4. Биотинилированные антитела можно развести до 1 мг/мл с 0.1% азидом натрия и 20% глицерином и хранить при -20 °С или +4 °С.**

Биотинилированные антитела могут храниться несколько месяцев. В качестве конъюгата для ELISA биотинилированные антитела можно использовать в разведениях  $10^3$ - $10^5$ .

### Примечания

- уровень биотинилирования составляет 1-6 молекулы биотина на одну молекулу IgG.
- условия биотинилирования, соотношение биотинилирующий реагент : антитела, температура, время инкубации, процедура диализа, можно изменять в зависимости от количества, объема или концентрации антител, требуемой степени биотинилирования или от стабильности антител (моноклональные антитела в ходе конъюгации могут частично инактивироваться). Обычно, оптимизация условий биотинилирования состоит в изменении соотношения биотинилирующий реагент : антитела с последующей эмпирической проверкой работы полученного конъюгата в опыте.

### Протокол 2: биотинилирование белков

Этот протокол представляет собой простую воспроизводимую процедуру для биотинилирования белков в основном по Lys остаткам, биотинилирование по концевым NH<sub>2</sub> группам также возможно, но требует более высокого соотношения биотинилирующий реагент : белок.

**1. Растворите белок, предназначенный для конъюгации, в 1 мл х1-кратного буфера для конъюгации до концентрации 5 мг/мл.**

Раствор белка может быть приготовлен из лиофилизированных антител, растворением их в буфере для конъюгации до нужной концентрации, или разведением белка уже находящегося в растворе. Если белок содержится в буфере, состав которого вам неизвестен, диализуйте или поменяйте буфер при помощи концентрирующих мембран на х1-кратный буфер для конъюгации.

- ✓ Очень важно убедиться, чтобы раствор белка не содержал *азид натрия*, *Трис*, и другие мешающие компоненты. Если ваш белок содержит подобные компоненты **обязательно диализуйте или гельфильтруйте** ваш белок и переводите их в х1-кратный буфер для конъюгации. Присутствие посторонних компонентов значительно снижает эффективность биотинилирования.

Для получения более высокой эффективности биотинилирования можно приготовить раствор белка с концентрацией 0.5-1.0 мг/мл.

**2. Добавьте в пробирку с заранее взвешенным реагентом для биотинилирования (1 мг) 100 мкл буфера для растворения реагента.** В результате получается раствор реагента с конечной концентрацией 10 мг/мл.

- ✓ Раствор реагента для биотинилирования необходимо готовить **непосредственно перед использованием**. Хранить раствор реагента нельзя.

**3. Добавляйте 100 мкл раствора для биотинилирования (10 мг/мл) к 1 мл раствора белка (5 мг/мл) по 25 мкл через 30 мин и инкубируйте при комнатной температуре (~ +22 °С).** В процессе инкубации периодически переворачивайте пробирку для равномерного распределения компонентов смеси. Такое поэтапное добавление биотинилирующего реагента позволяет добиться более полного биотинилирования, особенно если необходимо биотинилировать концевые NH<sub>2</sub> группы. После инкубации биотинилированный белок можно диализовать против двух смен PBS с 0.01%-ым азидом натрия при +4 °С, но, как показывает практика, в диализе нет необходимости. Однако, при необходимости получения биотинилированного белка гарантированно свободного от неприсоединенного биотинилирующего реагента (вероятность такого события достаточно низка) используйте гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию или хроматографию на обращенной фазе.

### Протокол 3: биотинилирование клеточных белков *in situ*

Этот протокол разработан для биотинилирования клеток крови.

**1. Промойте клетки 4 раза холодным PBS (+4 °С). Разведите клетки до концентрации  $10^6$ - $10^8$  клеток/мл.**

**2. Добавьте в пробирку с заранее взвешенным реагентом для биотинилирования (1 мг)**

4

**100 мкл буфера для растворения реагента.** В результате получается раствор реагента с конечной концентрацией 10 мг/мл.

✓ Раствор реагента для биотинилирования необходимо готовить **непосредственно перед использованием**. Хранить раствор реагента нельзя.

**3. Добавьте 10-50 мкл раствора для биотинилирования (10 мг/мл) к суспензии клеток и инкубируйте 1 час при +4 °С или при комнатной температуре (~ +22 °С ).** От добавляемого количества биотинилирующего реагента зависит степень необходимого биотинилирования.

**4. Промойте клетки 2 раза холодным PBS (+4 °С).**

Биотинилированные клетки можно выращивать *in vitro* или использовать для экспериментов *in vivo* (выявления жизненного цикла клетки, перемещение в организме, выявление места, где клетка подвергается уничтожению в тканях и т.п.). Анализ биотинилированных клеток может включать в себя метод проточной цитометрии (определение числа меченых клеток, определение уровня биотинилирования) и Вестерн-блот (качественный анализ меченых белков) при помощи меченого стрептавидина. После анализа и экстракции при помощи детергентов, биотинилированные компоненты мембран могут быть очищены с использованием мономерного авидина.

## Наборы

### Выделение клеток с использованием магнитных частиц, покрытых стрептавидином

Выделение клеток с использованием магнитных частиц, покрытых стрептавидином (МЧС), основано на принципе иммуномагнитного разделения. Вначале биотинилированные антитела (биоАТ) взаимодействуют с антигенами на поверхности клетки, затем помеченные биотином клетки собираются под действием магнитного поля посредством МЧС.

Использование предлагаемой схемы позволяет выделять **любые** типы клеток из исходного образца используя биоАТ и МЧС.

Преимущества данного подхода следующие:

- собираемость клеток-мишеней составляет >95%
- чистота выделяемых клеток и их жизнеспособность составляет около 99%
- клетки можно выделять как из клеточной суспензии, так и непосредственно из крови, костного мозга, фракции лейкоцитов и мононуклеарных клеток
- возможно непосредственное выделение клеток-мишеней с последующим отделением от магнитных частиц
- простота, быстрота и воспроизводимость метода

Состав набора рассчитан на выделение до  $10^9$  специфических клеток

| Название набора                   | Состав набора                       | Хранение |
|-----------------------------------|-------------------------------------|----------|
| <b>Магнитное выделение клеток</b> | Магнитные частицы со стрептавидином | 600 мкл  |
|                                   | Буфер «ComplexWash»                 | 10 мл    |
|                                   | Буфер «ComplexReady»                | 10 мл    |
| <b>Магнитное выделение клеток</b> | Магнитные частицы со стрептавидином | 600 мкл  |
|                                   | Буфер «ComplexWash»                 | 10 мл    |
|                                   | Буфер «ComplexReady»                | 10 мл    |
|                                   | Буфер «SplitBond»                   | 2 мл     |
|                                   | Реагент «SplitBond»                 | 100 мкл  |

Для непосредственного выделения клеток применяют два метода: **прямой** (перед использованием на клетках биоАТ и МЧС предварительно смешивают для получения комплекса *МЧС:биоАТ*) и **непрямой** (биоАТ добавляются непосредственно в популяцию клеток и затем добавляют МЧС).

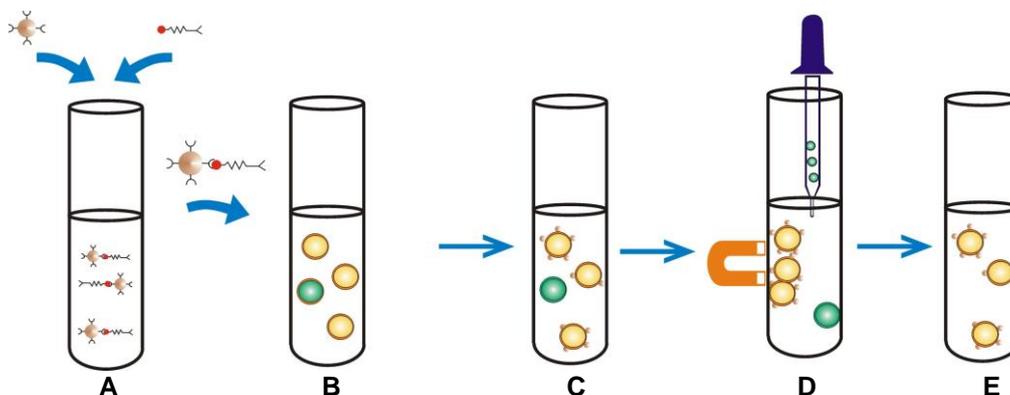
У каждого метода есть свои преимущества и недостатки.

## Протокол выделения клеток (positive isolation)

### Прямой метод

Этот метод обычно используют, когда количество биоАТ ограничено, а клетки имеют на своей поверхности высокую плотность антигена.

Также этот метод используют для выделения клеток из таких образцов как кровь, где процедуру предварительной отмывки или предварительного сбора клеток в градиенте плотности хотелось бы избежать.



### Схема выделения клеток (positive isolation), *прямой метод*

**A** – формирование комплекса магнитных частиц с биотинилированными антителами (МЧС:биоАТ)

**B** – добавление комплекса МЧС:биоАТ к образцу

**C** – связывание комплекса МЧС:биоАТ на поверхности клеток, образование «омагниченных» клеток

**D** – отделение «омагниченных» клеток от остальных клеток в образце

**E** – ресуспендирование выделенных клеток в буфере для дальнейшей работы

### Подготовка комплекса магнитные частицы+биотинилированные антитела

#### 1. Добавьте к МЧС биотинилированные антитела.

Количество добавляемых биоАТ зависит от задач и может составлять 10-70 мкг на 1 мл суспензии МЧС. Оптимальное количество – 20 мкг на 1 мл МЧС.

✓ (Полученного в результате по приводимому ниже протоколу 1 мл МЧС:биоАТ достаточно для выделения  $10^8$ - $10^9$  специфических клеток.)

#### 2. Инкубируйте смесь в течение 30 минут при +4 °С.

#### 3. Соберите образовавшийся комплекс МЧС:биоАТ в магнитном штативе, удалите супернатант. Ресуспендируйте комплекс МЧС:биоАТ в промывочном буфере «ComplexWash».

Количество добавляемого промывочного буфера «ComplexWash» по объему должно равняться количеству взятых в п. 1 МЧС.

#### 4. Повторите процедуру промывки, описанную в п. 3 еще 3-5 раз.

#### 5. Ресуспендируйте комплекс МЧС:биоАТ в буфере «ComplexReady».

Количество добавляемого буфера «ComplexReady» по объему должно равняться количеству взятых в п. 1 МЧС.

#### 6. Комплекс МЧС:биоАТ готов для использования.

### Выделение специфических клеток из образца

Специфические клетки можно выделять из цельной крови, лимфоцитарной фракции или из суспензии мононуклеарных клеток. 1 мл комплекса МЧС:биоАТ, приготовленного в соответствии с приводимым выше протоколом, достаточно для выделения  $10^8$ - $10^9$  специфических клеток. Количество добавляемого комплекса может быть изменено в зависимости от конкретной задачи, стоящей перед исследователем.

### Подготовка образца

**Цельная кровь:** в 1мл крови содержится приблизительно  $5 \times 10^6$  лимфоцитарных клеток и  $5 \times 10^9$  эритроцитов. Образец крови обязательно должен содержать антикоагулянт (обычно используют раствор ЭДТА или цитратный буфер).

**Лимфоцитарная фракция:** разведите образец в PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой (на 1 мл образца добавьте 2 мл PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой).

**Мононуклеарные клетки:** ресуспендируйте клетки в PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой до концентрации  $10^7$  клеток/мл.

### А. Выделение специфических клеток из цельной крови (1-5 мл)

1. **Добавьте к цельной крови комплекс МЧС:биоАТ (20 мкл рабочей суспензии в буфере «ComplexReady»).**  
 20 мкл комплекса МЧС:биоАТ позволяет выделить до  $10^7$  специфических клеток. Точное количество клеток, которое будет получено в процессе выделения, зависит от наличия данных клеток в образце и специфичности применяемых антител.
2. **Перемешайте смесь, переворачивая пробирку несколько раз и инкубируйте в течение 30 минут при +4 °С при периодическом перемешивании.**
3. **Соберите выделяемые клетки, поместив пробирку в магнитный штатив на 5 мин, аккуратно удалите супернатант.**  
 Выделяемые клетки удерживаются на стенке пробирки при помощи магнитных частиц, но удаление супернатанта лучше проводить осторожно, чтобы случайно не смыть выделяемые клетки.
4. **Перенесите пробирку в обычный штатив, ресуспендируйте клетки в PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой и поместите пробирку в магнитный штатив на 5 мин, аккуратно удалите супернатант.**
5. **Повторите процедуру отмывки, описанную в п. 4 еще 3-5 раз.**
- 6\* **Ресуспендируйте клетки в 100 мкл буфера или среды, оптимальной для ваших клеток.**  
 Это может быть RPMI 1640 с 1% фетальной телячьей сывороткой или другая среда или буфер.  
**( ВНИМАНИЕ ! : Если предполагается в дальнейшем отделение комплекса МЧС:биоАТ от выделенных клеток, смотрите п. 7 )**
7. **Для дальнейшего отделения комплекса МЧС:биоАТ от выделенных клеток ресуспендируйте клетки в 100 мкл буфера «SplitBond».**  
 Использование реагента «SplitBond» возможно только в том случае, если биоАТ были помечены биотинилирующим реагентом BioSplit.

### В. Выделение специфических клеток из лимфоцитарной фракции или мононуклеарных клеток (1-5 мл)

1. **Добавьте к охлажденному до +4 °С образцу комплекс МЧС:биоАТ (20 мкл рабочей суспензии в буфере «ComplexReady»).**  
 20 мкл комплекса МЧС:биоАТ позволяет выделить до  $10^7$  специфических клеток. Точное количество клеток, которое будет получено в процессе выделения, зависит от наличия данных клеток в образце и специфичности применяемых антител.
2. **Перемешайте смесь, переворачивая пробирку несколько раз и инкубируйте в течение 20 минут при +4 °С при периодическом перемешивании.**
3. **Соберите выделяемые клетки, поместив пробирку в магнитный штатив на 5 мин, аккуратно удалите супернатант.**  
 Выделяемые клетки удерживаются на стенке пробирки при помощи магнитных частиц, но удаление супернатанта лучше проводить осторожно, чтобы случайно не смыть выделяемые клетки.
4. **Перенесите пробирку в обычный штатив, ресуспендируйте клетки в PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой и поместите пробирку в магнитный штатив на 5 мин, аккуратно удалите супернатант.**
5. **Повторите процедуру отмывки, описанную в п. 4 еще 3-5 раз.**
- 6\* **Ресуспендируйте клетки в 100 мкл буфера или среды, оптимальной для ваших клеток.**  
 Это может быть RPMI 1640 с 1% фетальной телячьей сывороткой или другая среда или буфер.  
**( ВНИМАНИЕ ! : Если предполагается в дальнейшем отделение комплекса МЧС:биоАТ**

от выделенных клеток, смотрите п. 7 )

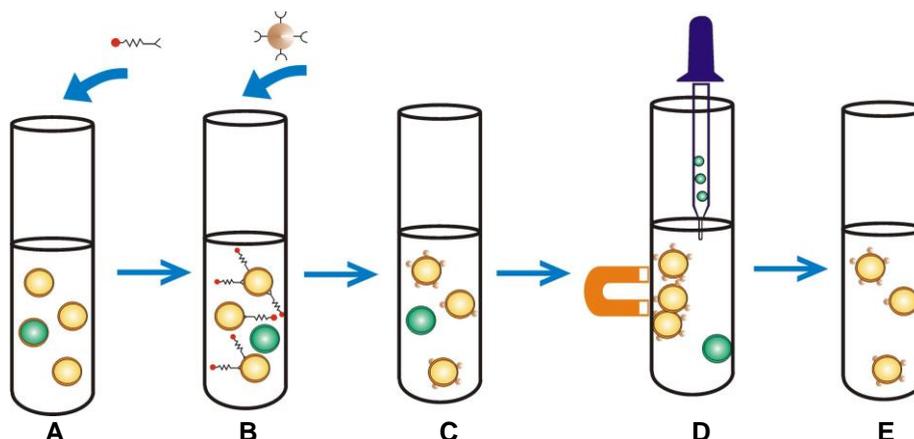
**7. Для дальнейшего отделения комплекса МЧС:биоАТ от выделенных клеток ресуспендируйте клетки в 100 мкл буфера «SplitBond».**

Использование реагента «SplitBond» возможно только в том случае, если биоАТ были помечены биотинилирующим реагентом BioSplit.

### Непрямой метод

Этот метод обычно используют, когда количество биоАТ не является лимитирующим, а клетки имеют на своей поверхности низкую плотность антигена.

Также этот метод используют для предварительно подготовленных клеток, которые предварительно переводятся в буфер PBS. Для выделения клеток из таких образцов как кровь, клетки предварительно собираются в градиенте плотности, отмываются и ресуспендируются в буфере PBS.



### Схема выделения клеток (positive isolation), *непрямой метод*

**A** – добавление биотинилированных антител к образцу, инкубирование

**B** – добавление МЧС к образцу, инкубирование

**C** – образование комплекса МЧС:биоАТ на поверхности клеток, образование «омагниченных» клеток

**D** – отделение «омагниченных» клеток от остальных клеток в образце

**E** – ресуспендирование выделенных клеток в буфере для дальнейшей работы

### Подготовка образца

**Цельная кровь:** соберите клетки из крови центрифугированием в градиенте плотности, дважды промойте клетки PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой и ресуспендируйте клетки в PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой до концентрации  $10^7$  клеток/мл.

**Лимфоцитарная фракция:** разведите образец в PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой (на 1 мл образца добавьте 2 мл PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой).

**Мононуклеарные клетки:** ресуспендируйте клетки в PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой до концентрации  $10^7$  клеток/мл.

### Подготовка МЧС

Перед использованием отберите необходимое количество суспензии магнитных частиц в отдельную пробирку, поместите пробирку в магнитный штатив, соберите МЧС в течение 1-2 мин, отберите супернатант и ресуспендируйте частицы в таком же объеме буфера PBS. Повторите процедуру отмывки еще 2 раза, ресуспендируйте МЧС в PBS. МЧС готовы к использованию.

### Выделение специфических клеток из образца

1. Добавьте к клеточной суспензии, охлажденной до  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , биоАТ (1-10 мкг биоАТ в буфере для хранения).  
10 мкг биоАТ позволяют выделить до  $10^7$  специфических клеток. Точное количество клеток, которое будет получено в процессе выделения, зависит от наличия данных клеток в образце и специфичности применяемых антител.
2. Перемешайте смесь, переворачивая пробирку несколько раз и инкубируйте в течение 20 минут при  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  при периодическом перемешивании.

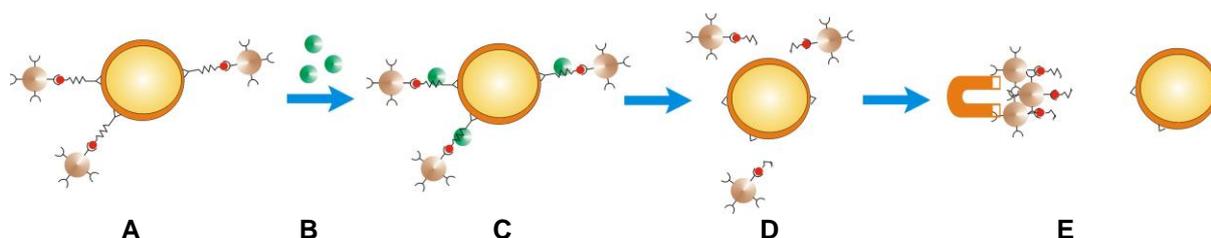
3. Соберите преобработанные биоАТ клетки центрифугированием при 800 g в течение 10 мин. Удалите супернатант.
4. Ресуспендируйте и промойте клетки дважды в PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой для удаления несвязавшихся биоАТ.
5. Ресуспендируйте клетки дважды в PBS с 1% фетальной телячьей сывороткой до концентрации  $10^7$  клеток/мл.
6. Добавьте к клеточной суспензии с биоАТ 20 мкл отмытых МЧС.
7. Перемешайте смесь, переворачивая пробирку несколько раз и инкубируйте в течение 20 минут при +4 °С при периодическом перемешивании.
8. Соберите выделяемые клетки, поместив пробирку в магнитный штатив на 5 мин, аккуратно удалите супернатант.  
Выделяемые клетки удерживаются на стенке пробирки при помощи магнитных частиц, но удаление супернатанта лучше проводить осторожно, чтобы случайно не смыть выделяемые клетки.
9. Перенесите пробирку в обычный штатив, ресуспендируйте клетки в PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой и поместите пробирку в магнитный штатив на 5 мин, аккуратно удалите супернатант.
10. Повторите процедуру отмывки, описанную в п. 4 еще 3-5 раз.
11. Ресуспендируйте клетки в 100 мкл буфера или среды, оптимальном для ваших клеток (**ВНИМАНИЕ!** : Если предполагается в дальнейшем отделение комплекса МЧС:биоАТ от выделенных клеток, смотрите п. 12 ).  
Это может быть PBS, RPMI 1640 с 1-2% фетальной телячьей сывороткой или другая среда или буфер.
12. Для дальнейшего отделения комплекса МЧС:биоАТ от выделенных клеток ресуспендируйте клетки в 100 мкл буфера «SplitBond».  
Использование реагента «SplitBond» возможно только в том случае, если биоАТ были помечены биотинилирующим реагентом BioSplit.

## Протокол отделения комплекса МЧС:биоАТ

### ВНИМАНИЕ !

Использовать эту процедуру следует только в том случае, если ваши антитела были помечены биотинилирующим реагентом BioSplit.

В ходе процедуры происходит расщепление ножки, связывающей антитело с биотином, в результате чего отщепляется и МЧС.



### Схема отделения комплекса МЧС:биоАТ

**A** – исходная клетка с комплексом МЧС:биоАТ на поверхности

**B** – добавление реагента **SplitBond**

**C** – разрушение связи комплекса МЧС:биоАТ

**D** – отделение разрушенного комплекса МЧС:биоАТ от клеток

**E** – сбор при помощи магнита разрушенного комплекса МЧС:биоАТ, свободные клетки остаются в среде

1. Добавьте 10 мкл реагента «SplitBond» к 100 мкл ранее подготовленной суспензии клеток в буфере «SplitBond».
2. Инкубируйте смесь в течение 60 минут при комнатной температуре при периодическом перемешивании.
3. Поместите пробирку в магнитный штатив для сбора разрушенного комплекса МЧС:биоАТ на 3-5 мин.

10

4. Перенесите супернатант, содержащий свободные клетки, в новую пробирку.
5. Для более полного выделения освободившихся клеток разрушенный комплекс МС:биоАТ промойте 2 раза в 300 мкл RPMI 1640 с 1% фетальной телячьей сывороткой. Соберите супернатант в одной пробирке.
6. Чтобы удалить остатки реагента «SplitBond» ресуспендируйте все собранные свободные клетки в 10 мл RPMI 1640 с 1% фетальной телячьей сывороткой и центрифугируйте при 500 g в течение 10 мин.
7. Ресуспендируйте клетки в RPMI 1640 с 1% фетальной телячьей сывороткой или другую среду, оптимальную для ваших клеток.

Полученные клетки имеют степень очистки >99% и число живых клеток >95%.

#### Составы рекомендуемых буферов, не входящих в наборы

##### **PBS, 1 литр:**

|  |        |
|--|--------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O  | 0.16 г |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0.98 г |
| NaCl   | 8.10 г |

дистиллированная вода до 1 литра, pH 7.4

##### **PBS с 2% фетальной телячьей сывороткой**

Добавьте 2% фетальной телячьей сыворотки к PBS.