

# SileksHemDep - реагент для удаления гемоглобина из растворов гемолизированных отмытых эритроцитов (реагент применять только для гемолизированных отмытых эритроцитов, не для гемолизированной плазмы)

Кат. номер: HBD005

**Назначение:** удаление гемоглобина из растворов гемолизированных отмытых эритроцитов

**Условия хранения:** комнатная температура

**Условия транспортировки:** температура окружающей среды

## Реагент SileksHemDep

Реагент SileksHemDep поставляется в количестве достаточном для проведения более 150 процедур удаления гемоглобина из пробы объемом в соответствии с рекомендуемым протоколом.

- Реагент **SileksHemDep** 5 мл

Мы постоянно работаем над улучшением качества нашей продукции и регулярно вносим изменения в протоколы, чтобы наша продукция работала лучше. Пожалуйста, следите за актуальной версией описания к продукту. Спрашивайте нас о новых изменениях, чтобы всегда получать наилучшие результаты.

## Сведения о препарате

Реагент SileksHemDep представляет собой водную суспензию полимера в готовом для использования виде. Перед применением пробирку с препаратом рекомендуется перемешать для равномерного распределения полимера в объеме.

Реагент добавляется в количествах в соответствии с протоколом или соответственно масштабированию.

## Принцип действия препарата

Реагент SileksHemDep вызывает ассоциацию гемоглобина, находящегося в растворе гемолизированных отмытых эритроцитов (ОЭ), что позволяет избирательно осадить гемоглобин в процессе центрифугирования.

## Описание реагента

### Общие замечания

Реагент SileksHemDep применяется для удаления гемоглобина из растворов гемолизированных ОЭ. Перед применением реагент необходимо хорошо перемешать для его гомогенности.

**Важно!** Данный реагент не может быть использован для удаления гемоглобина из гемолизированной плазмы. Для целей удаления гемоглобина из гемолизированной плазмы мы разрабатываем специальную процедуру, базирующуюся на других принципах.

## Подготовка пробы

### **Внимание!**

Реагент SileksHemDep рекомендуется применять по отношению к эритроцитам, предварительно отмытых от плазмы и от ДНК-содержащих клеток крови. ОЭ представляют собой суспензию эритроцитарной массы, из которой удалена большая часть плазмы, лейкоцитов и тромбоцитов. В процессе отмытки удаляются белки плазмы, лейкоциты, тромбоциты, микроагрегаты клеток и стромы, разрушенные при хранении клеточных компонентов.

Существуют разные способы отмытки эритроцитов. К таким способам относятся различные варианты центрифугирования, включая градиентное центрифугирование.

Гемолиз ОЭ мы рекомендуем проводить с использованием стандартного буфера RIPA или его модификаций.

## Протокол удаления гемоглобина с использованием реагента SileksHemDep

Перед началом работы по протоколу **обязательно (!)** прочитайте раздел Комментарии и Рекомендации к протоколу.

1. Внесите **X мкл** образца отмытых эритроцитов в 1.5 мл пробирку.  
(см раздел Комментарии и Рекомендации к протоколу, п.1)
2. Внесите в пробирку **(300 – X) мкл** буфера **RIPA**. Перемешайте смесь пипетированием до достижения гомогенного гемолиза. Инкубируйте 5 мин при комнатной температуре для полного гемолиза.  
(см раздел Комментарии и Рекомендации к протоколу, п.2)
3. Внесите в пробирку **15 мкл** предварительно перемешанного препарата **SileksHemDep**. Перемешайте смесь пипетированием до достижения гомогенного состояния.
4. Инкубируйте пробирку в бытовом холодильнике при +4 °C - +10 °C в течение 10 минут.  
(см раздел Комментарии и Рекомендации к протоколу, п.3)
5. Центрифугируйте пробирку при 8'000 обор./мин в течение 5 минут.  
(см раздел Комментарии и Рекомендации к протоколу, п.4)
6. Отберите супернатант в чистую пробирку. Будьте осторожны, чтобы не захватить осадок осевшего гемоглобина.  
(см раздел Комментарии и Рекомендации к протоколу, п.5)
7. Добавьте к супернатанту еще **10 мкл** предварительно перемешанного препарата **SileksHemDep**. Перемешайте смесь пипетированием до достижения гомогенного состояния.  
(см раздел Комментарии и Рекомендации к протоколу, п.6)
8. Инкубируйте пробирку в бытовом холодильнике при +4 °C - +10 °C в течение 10 минут.  
(см раздел Комментарии и Рекомендации к протоколу, п.3)
9. Центрифугируйте пробирку при 8'000 обор./мин в течение 5 минут.  
(см раздел Комментарии и Рекомендации к протоколу, п.4)
10. Отберите супернатант в чистую пробирку. Будьте осторожны, чтобы не захватить осадок осевшего гемоглобина.  
(см раздел Комментарии и Рекомендации к протоколу, п.7)

## Комментарии и Рекомендации к протоколу

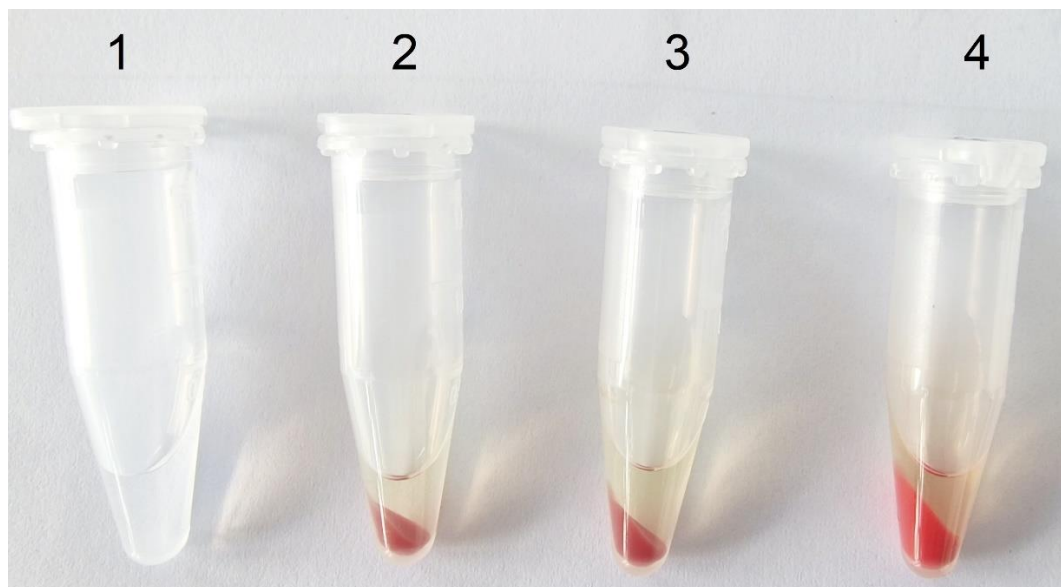
### Общие замечания

Реагент SileksHemDep удаляет больше 95% гемоглобина из гемолизированных эритроцитов. Полнота удаления гемоглобина зависит от качества и условий забора исходной крови, способа и длительности хранения крови, способа подготовки пробы ОЭ.

В редких случаях для более качественного удаления гемоглобина могут потребоваться изменения в подходе к подготовке крови и способа получения ОЭ.

### Комментарии к пунктам протокола

1. Протокол рассчитан на количества ОЭ от 30 до 100 мкл. Конечный объем рабочей смеси составляет 300 мкл. Соответственно буфер RIPA добавляется от 270 до 200 мкл до конечного объема. При желании масштабирования все вносимые по протоколу компоненты в пп.1-3 (буфер RIPA) и п.7 (реагент SileksHemDep), должны быть соответственно пропорционально изменены.
2. Мы проверяли удаление гемоглобина из 30 и 100 мкл ОЭ (30 мкл ОЭ + 270 мкл буфера RIPA, а также 100 мкл ОЭ + 200 мкл буфера RIPA). В обоих случаях результат удаления гемоглобина был одинаково эффективен, но в эксперименте со 100 мкл эритроцитов концентрация очищенного от гемоглобина белка была приблизительно в 5 раз выше.  
Время инкубации для полного гемолиза определяется экспериментатором. Мы рекомендуем 5 минут, но это время может быть увеличено.
3. Инкубация при охлаждении позволяет улучшить эффективность ассоциации молекул гемоглобина с полимером. Мы рекомендуем инкубировать 10 минут в бытовом холодильнике (не в морозильнике, не замораживание!). Вполне возможно изменение времени инкубации в соответствии с потребностями экспериментатора.
4. Время и скорость центрифугирования может меняться в зависимости от модели центрифуги.  
Мы рекомендуем центрифугировать при скоростях от 3.000 об./мин до 8.000 об./мин.  
Рекомендуемое время центрифугирования при 3.000 об./мин – 20 минут, при 8.000 об./мин – 5 минут.
5. Для помощи в визуальной оценке мы предлагаем фото образцов после осаждения гемоглобина.



### Фото 1. Результат осаждения гемоглобина препаратом HbDepletion

Осаждение проводили в соответствии с приводимым выше протоколом.

Образец 1 – 200 мкл буфера RIPA + 10 мкл реактива SileksHemDep

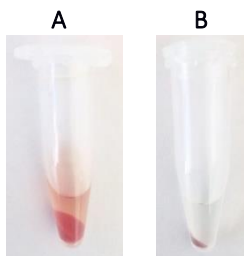
Образец 2 – 20 мкл отмывтых эритроцитов + 180 мкл буфера RIPA + 10 мкл реактива SileksHemDep

Образец 3 – 30 мкл отмывтых эритроцитов + 270 мкл буфера RIPA + 15 мкл реактива SileksHemDep

Образец 4 – 100 мкл отмывтых эритроцитов + 200 мкл буфера RIPA + 15 мкл реактива SileksHemDep

Как видно на фото, в образце 1 не образуется осадок при использовании реактива SileksHemDep. В образцах со 2 по 4 включительно видно осаждение гемоглобина в виде ярко-алого осадка. Супернатант обычно является прозрачным, но имеет желтоватый оттенок в зависимости от концентрации оставшегося в супернатанте гемоглобина.

6. Для удаления оставшегося гемоглобина применяется дополнительная процедура добавления реактива SileksHemDep и последующего центрифугирования. В результате получается прозрачный супернатант и небольшой осадок гемоглобина.



**Фото 2. Результат повторного осаждения гемоглобина**

Осаждение проводили в соответствии с приводимым выше протоколом.

**А.** осаждение гемоглобина после 1-ой отработки реакментом SileksHemDep

**В.** осаждение гемоглобина после 2-ой отработки реакментом SileksHemDep

7. Оценку полноты удаления гемоглобина мы рекомендуем определять методом белкового электрофореза. Визуальная оценка результата является только предварительной.

Контактные данные

мобильный телефон: + 7 495 737 4224

эл. почта: info@sileks.com