

SileksMag-Protein A магнитные частицы с белком А

Кат. номер: K0181

Назначение: иммунопреципитация (IP), ко-иммунопреципитация (Co-IP), очистка антител

Условия хранения: +4°C

Условия транспортировки: особых условий не требуется

Содержание:

| | |
|---|---|
| 1. Описание | 1 |
| 2. Важная информация | 2 |
| 3. Рекомендуемые буфера | 2 |
| 4. Протокол выделения антител из плазмы, сыворотки, клеточных культур, других жидкостей содержащих антитела | 3 |
| 5. Протокол иммунопреципитации | 4 |
| 6. Выделение клеток | 6 |
| 7. Приложения | 7 |
| 8. Связанные продукты | 9 |
| 9. Контактные данные | 9 |

1. Описание

Внимание!

Частицы SileksMag-Protein A версии 250109 с белком А изготовлены на частицах с оптимизированной поверхностью. От частиц предыдущей версии данные частицы отличаются более высокой емкостью взаимодействием с антителами.

Сродство различных подклассов IgG для белка А, особенно от мыши и человека, отличается больше, чем для белка G. Таким образом, белок А может быть использован для получения изотипически чистых IgG некоторых видов.

SileksMag-Protein A магнитные частицы с белком А предназначены для проведения процедур иммунопреципитации и ко-иммунопреципитации, а также для быстрого и воспроизводимого выделения антител из плазмы, сыворотки, клеточных культур и других жидкостей, содержащих антитела. Использование частиц возможно также в системах автоматического выделения.

SileksMag-Protein A магнитные частицы содержат рекомбинантный белок А, ковалентно пришитый к гидрофильному инертному носителю, покрывающему магнитные частицы. Белок А за счет Fc-связывающих доменов может связывать антитела разных видов.

Основные преимущества предлагаемых частиц:

- **высокая емкость**
- **низкое неспецифическое связывание**
- **возможность многократного использования**
- **отличная ресуспендируемость**

Таблица 1. Описание и свойства магнитных частиц SileksMag-Protein A

| | |
|------------------|---|
| Основа | Оксид железа, инкапсулированный в инертную оболочку |
| Тип магнетизации | Суперпарамагнетик (нет остаточного намагничивания) |
| Форма частиц | Сфера |
| Размер | 300-400 нм |
| Концентрация | 5 мг/мл |
| Емкость частиц | прибл. 1000 мкг человеческих IgG на 1 мл частиц прибл. 200 мкг человеческих IgG на 1 мг частиц |
| Буфер хранения | PBS, 0.02% Tween-20, 0.1% NaN ₃ |
| Условия хранения | +4 °C, не замораживать |

2. Важная информация

- Не подвергайте частицы процедурам центрифугирования, замораживания и высушивания. Центрифугирование приводит к агрегации частиц и, как следствие, снижению их активности. Высушивание и замораживание также приводит к агрегации частиц и дополнительно оказывает негативное воздействие на иммобилизованный белок и его специфическую активность.
- Перед началом работы соберите максимально полную информацию о свойствах и рекомендациях к планируемому для использования антителам. Возможно, может потребоваться приготовление специальных буферов для связывания и элюции, а также изменение условий и температурных режимов инкубации.
- Рекомендуемое время для связывания с антителами – 3 часа при комнатной температуре с постоянным перемешиванием. Увеличение времени инкубации до 24 часов при комнатной температуре с постоянным перемешиванием позволяет связать больше антител.
- Антитела с низкой аффинностью всегда требуют продолжительное время для связывания.
- При использовании буфера для элюции с pH меньше 2.1 частицы не рекомендуется использовать повторно.
- Оптимальное время для элюции – 10-15 минут.

3. Рекомендуемые буфера

Буфера для связывания

В большинстве случаев для связывания мы рекомендуем использовать PBS.

При проведении процедуры связывания мы рекомендуем добавлять в буфер детергент Tween-20 до конечной концентрации 0.02%.

Мы предлагаем также оптимальный буфер для связывания иммуноглобулинов при помощи белка А, позволяющий в большинстве случаев решить задачу по связыванию специфических белковых молекул:

- *Буфер для Связывания Protein A IgG, pH 8.0* (не содержит Tween-20)
Этот буфер подходит для оптимального образования комплекса иммуноглобулина с белком А в большинстве случаев. Важно помнить, что эффективность связывания определяется видоспецифичностью иммуноглобулина. В случае неэффективного выделения может потребоваться использование другого буфера (с другим значением pH, солевым составом и т.п.).

Буфера для элюции

Для элюции могут использоваться различные буфера с различными значениями pH, а также высоко солевые буфера.

Мы предлагаем два буфера, позволяющих в большинстве случаев решить задачу по элюции специфических белковых молекул:

- *Буфер для Элюции Standard, pH 2.1*
Этот буфер эффективно диссоциирует большинство комплексов белок-белок и антиген-антитело без особого воздействия на структуру белка. Однако, некоторые антитела и белки под действием низкого значения pH могут повреждаться. Поэтому при элюции с использованием этого буфера элюированную фракцию необходимо как можно быстрее нейтрализовать добавлением буфера 1M Трис-HCl с pH 8.5.
- *Буфер для Элюции Sparing (щадящий), pH 6.8*
Этот буфер также диссоциирует комплексы белок-белок и антиген-антитело с эффективностью выше 90%, при этом без повреждающего воздействия низкого значения pH на структуру белка. В зависимости от особенностей специфического взаимодействия этот буфер может быть не столь эффективен, как *Буфер для Элюции Standard, pH 2.1*. Для дальнейшего использования полученные образцы необходимо диализовать, провести обессоливание или разбавить любым подходящим буфером (напр., PBS) в 50-100 раз.

4. Протокол выделения антител из плазмы, сыворотки, клеточных культур, других жидкостей, содержащих антитела

Оборудование и реактивы, необходимые для работы

- 1.5 мл и 2 мл пробирки
- Магнитные частицы с иммобилизованным белком А
- Плазма, сыворотка, клеточный супернатант или другой препарат, содержащий IgG
- Буфер для связывания : *Protein A IgG pH 8.0*, PBS или другой подходящий буфер
- Буфер для элюции : *Standard pH 2.1, Sparing* или другой подходящий буфер
- Буфер для нейтрализации : 1 М Трис pH 8.5
- Магнитный штатив для пробирок 1.5 мл и 2 мл
- Ротатор или иное приспособление для постоянного перемешивания
- Приспособления для диализа или колонка для обессоливания с соответствующими буферами

Процедура выделения

Процедура выделения рассчитана на связывание приблизительно 50 мкг антител на 50 мкл (0.25 мг) магнитных частиц. При необходимости использования другого количества антител, используйте прямое масштабирование приводимой методики. Для приблизительной оценки количества антител, содержащихся в образце, смотрите таблицу 3 в Приложении.

Внимание! Перед использованием магнитные частицы необходимо тщательно ресуспендировать. Размер частиц способствует достаточно быстрому оседанию частиц, поэтому проводите отбор частиц для работы сразу после их ресуспендирования.

1. Внесите **50 мкл** суспензии магнитных частиц *SileksMag-Protein A* в 2 мл пробирку.
2. Внесите в пробирку с частицами **200 мкл Буфера для Связывания**. Тщательно ресуспендируйте частицы в буфере.
3. Поместите пробирку в **магнитный штатив**, дождитесь, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалите супернатант.
4. Перенесите пробирку в **обычный штатив**, внесите в пробирку с частицами **200 мкл Буфера для Связывания**. Тщательно ресуспендируйте частицы в буфере. Поместите пробирку в **магнитный штатив**, дождитесь, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалите супернатант.
5. Перенесите пробирку в **обычный штатив**, добавьте **1 мл Буфера для Связывания**. Тщательно ресуспендируйте частицы в буфере.
6. Внесите в пробирку **50 мкл плазмы, сыворотки, клеточного супернатанта, либо другого препарата, содержащего IgG**. Мы рекомендуем при проведении процедуры выделения антител для предотвращения агрегации белка добавлять **Tween-20** до конечной концентрации **0.01%**.
7. Закройте пробирку, несколько раз переверните пробирку для равномерного распределения компонентов смеси по всему объему и поместите пробирку в ротатор, либо другое устройство для постоянного перемешивания. Инкубируйте пробирку **при комнатной температуре** в течение **3 часов**. В процессе инкубации частицы не должны оседать и перемешивание не должно быть активным.
8. Поместите пробирку в **магнитный штатив**, дождитесь, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалите супернатант.
9. Перенесите пробирку в **обычный штатив**, внесите в пробирку с частицами **500 мкл Буфера для Связывания** или PBS. Тщательно ресуспендируйте частицы в буфере. Поместите пробирку в магнитный штатив, дождитесь, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалите супернатант. **Повторите процедуру промывки еще 2 раза**.
10. Перенесите пробирку в **обычный штатив**, внесите в пробирку с частицами **100 мкл Буфера для Связывания** или PBS. Тщательно ресуспендируйте частицы в буфере. **Перенесите суспензию частиц в новую пробирку**. Поместите пробирку в **магнитный штатив**, дождитесь, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалите супернатант. Перенос частиц в новую пробирку рекомендуется для уменьшения неспецифической элюции белков, связанных на стенках предыдущей пробирки.

Если целью работы являются связанные антитела, переходите к п. 11 данного протокола.

Если частицы со связанными антителами планируется использовать в дальнейшем для иммунопреципитации, ресуспендируйте полученный комплекс в 100 мкл буфера для хранения (PBS, pH 7.0 с 0.01–0.1% Tween-20 для предотвращения агрегации частиц). Для предотвращения элюции связанных антител в процессе дальнейшей работы, можно использовать ковалентную сшивку полученного комплекса антител с белком А. За дополнительной информацией обращайтесь info@sileks.com.

11. Перенесите пробирку в **обычный штатив**, добавьте **100 мкл Буфера для Элюции**. Тщательно ресуспендируйте частицы в буфере.
12. Инкубируйте пробирку в течение **10-15 минут**, периодически перемешивайте содержимое пипетированием.
13. Поместите пробирку в **магнитный штатив**, дождитесь, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и **соберите супернатант**, содержащий элюированный материал **в новую пробирку**. Если использовался *Буфер для Элюции Standard, pH 2.1*, добавьте к элюированной фракции **20 мкл 1 М Трис pH 8.5**.
14. Для более полного сбора антител процедуру элюции можно повторить еще раз. Это дает возможность получить дополнительно 10-20% антител. Собранные фракции можно объединить и использовать для дальнейшей работы. Полученный материал можно использовать в том виде, как он был получен, либо, если был использован высоко солевой буфер, подвергнуть процедуре диализа или обессоливания.

В процессе элюции первая фракция, как правило, содержит 80-90% материала. Часто, при желании иметь материал наилучшего качества, можно ограничиться только одной первой элюцией.

5. Протокол иммунопреципитации

Оборудование и реактивы, необходимые для работы

- 1.5 мл пробирки
 - Магнитные частицы с иммобилизованным белком А и антителами
 - Плазма, сыворотка, клеточный супернатант или другой препарат, содержащий антиген
 - Буфер для связывания : PBS или другой подходящий буфер
 - Буфер для элюции : *Standard pH 2.1, Sparing* или другой подходящий буфер
 - Буфер для нейтрализации : 1 М Трис pH 8.5
 - Магнитный штатив для пробирок 1.5 мл
 - Ротатор или иное приспособление для постоянного перемешивания
1. Внесите 50–1000 мкл образца, содержащего антиген, в суспензию магнитных частиц с антителами, полученными ранее (*Протокол выделения антител из плазмы, сыворотки, клеточных культур, других жидкостей, содержащих антитела*, п.10). Тщательно ресуспендируйте частицы.
 2. Закройте пробирку, несколько раз переверните пробирку для равномерного распределения компонентов смеси по всему объему и поместите пробирку в ротатор, либо другое устройство для постоянного перемешивания. Инкубируйте пробирку при комнатной температуре в 3 часов при комнатной температуре. В процессе инкубации частицы не должны оседать и перемешивание не должно быть активным.

В зависимости от особенности взаимодействия антител с антигеном может потребоваться более длительная инкубация – до 24 часов, а также другая температура инкубации. Инкубация при +37 °С может в некоторых случаях лучше влиять на взаимодействие белков. Выбор оптимальной температуры и оптимального времени инкубации нужно определять экспериментально.

3. Поместите пробирку в магнитный штатив, дождитесь, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалите супернатант.
4. Перенесите пробирку в обычный штатив, внесите в пробирку с частицами 1 мл буфера PBS с 0.02% Tween-20. Тщательно ресуспендируйте частицы в буфере. Поместите пробирку в магнитный штатив, дождитесь, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалите супернатант. Повторите процедуру промывки еще 2 раза.
5. Перенесите пробирку в обычный штатив, внесите в пробирку с частицами 100 мкл буфера PBS с 0.02% Tween-20. Тщательно ресуспендируйте частицы в буфере. Перенесите суспензию частиц в новую пробирку. Поместите пробирку в магнитный штатив, дождитесь, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалите супернатант. Перенос частиц в новую пробирку рекомендуется для уменьшения неспецифической элюции белков, связанных на стенках предыдущей пробирки.

Далее возможны два типа элюции: неденатурирующая и денатурирующая.

Неденатурирующая элюция

1. Перенесите пробирку с частицами, собранные в пробирке без буфера, в обычный штатив, добавьте 100 мкл *Буфера для Элюции*. Тщательно ресуспендируйте частицы в буфере.
2. Инкубируйте пробирку в течение 10-15 минут, периодически перемешивайте содержимое пипетированием.
3. Поместите пробирку в магнитный штатив, дождитесь, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и соберите супернатант, содержащий элюированный материал в отдельную пробирку. Если использовался *Буфер для Элюции Standard, pH 2.1*, добавьте к элюированной фракции 20 мкл 1 М Трис pH 8.5.
4. Для более полного сбора антител процедуру элюции можно повторить еще раз. Это дает возможность получить дополнительно 10-20% антител. Собранные фракции можно объединить и использовать для дальнейшей работы. Полученный материал можно использовать в том виде, как он был получен, либо, если был использован высоко солевой буфер, подвергнуть процедуре диализа или обессоливания.

В процессе элюции первая фракция, как правило, содержит 80-90% материала. Часто, при желании иметь материал наилучшего качества, можно ограничиться только одной первой элюцией.

Денатурирующая элюция

1. Перенесите пробирку в обычный штатив, добавьте 100 мкл *Буфера для Элюции* (обычно для денатурирующей элюции используют буфера содержащие SDS или другие денатурирующие агенты). Тщательно ресуспендируйте частицы в буфере.
 2. Инкубируйте пробирку в течение 10 минут при температуре 70–100 °С, периодически перемешивайте содержимое пипетированием.
 3. Поместите пробирку в магнитный штатив, дождитесь, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и соберите супернатант, содержащий элюированный материал в отдельную пробирку.
- При использовании денатурирующего буфера повторения процедуры элюции не требуется.

б. Выделение клеток

Частицы с белком А данного размера могут быть эффективно использованы для выделения клеток.

При использовании частиц для выделения клеток нужно принимать во внимание следующие факторы:

- антигены, связывание с которыми планируется для выделения клетки, должны быть доступны на поверхности клетки и быть прочно ассоциированы с клеткой
- взаимодействие поверхностных антигенов с антителами, иммобилизованных на частицах, требует продолжительной совместной инкубации. Мы рекомендуем инкубировать клетки с частицами от 3 часов до 24 часов при комнатной температуре или при +37 °С.
- двухэтапное взаимодействие может быть более эффективным и суммарно менее продолжительным по времени. В двухэтапном взаимодействии вначале проводится инкубация свободных неиммобилизованных антител с поверхностными антигенами клетки в течение 1-3 часов, а затем добавляются частицы с белком А. Инкубация частиц с белком А и клеток с антителами может проводиться в течение 30 минут-1 час. Количество частиц нужно брать в соответствие с их связывающей способности по отношению к количеству используемых в эксперименте антител.

Пример двухэтапной процедуры выделения клеток на примере выделения эритроцитов можно посмотреть здесь: [Сравнение эффективности протоколов выделения компонентов крови \(на примере выделения эритроцитов\)](#)

- при использовании магнитных частиц для выделения клеток следует помнить, что клетки обладают способностью поглощать связавшиеся на их поверхности частицы путем эндоцитоза. Это актуально в первую очередь для быстро делящихся клеток.

7. Приложения

Таблица 2. Специфичность взаимодействия белка А и белка G с IgG разных видов

Сила взаимодействия: высокая +++ , средняя ++ , слабая + , взаимодействие отсутствует –

| Вид (species) | Класс антител (antibody class) | Белок А (Protein A) | Белок G (Protein G) |
|----------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| Человек | Общий IgG | +++ | +++ |
| Человек | IgG ₁ | +++ | +++ |
| Человек | IgG ₂ | +++ | +++ |
| Человек | IgG ₃ | + | +++ |
| Человек | IgG ₄ | +++ | +++ |
| Человек | IgM | + | – |
| Человек | IgD | – | – |
| Человек | IgE | ++ | – |
| Человек | IgA | + | – |
| Человек | IgA ₁ | + | – |
| Человек | IgA ₂ | + | – |
| Человек | Fab | + | + |
| Человек | ScFv | + | – |
| Мышь | Общий IgG | +++ | +++ |
| Мышь | IgG ₁ | + | ++ |
| Мышь | IgG _{2a} | +++ | +++ |
| Мышь | IgG _{2b} | +++ | +++ |
| Мышь | IgG ₃ | +++ | +++ |
| Мышь | IgM | – | – |
| Крыса | Общий IgG | + | ++ |
| Крыса | IgG ₁ | + | ++ |
| Крыса | IgG _{2a} | – | +++ |
| Крыса | IgG _{2b} | – | + |
| Крыса | IgG _{2c} | +++ | +++ |
| Лошадь | Общий IgG | + | +++ |
| Лошадь | IgG _(ab) | + | – |
| Лошадь | IgG _(c) | + | – |
| Лошадь | IgG _(T) | – | +++ |
| Корова | Общий IgG | + | +++ |
| Корова | IgG ₁ | + | +++ |
| Корова | IgG ₂ | +++ | +++ |
| Коза | Общий IgG | + | +++ |
| Коза | IgG ₁ | + | +++ |
| Коза | IgG ₂ | +++ | +++ |
| Овца | Общий IgG | + | +++ |
| Овца | IgG ₁ | + | +++ |
| Овца | IgG ₂ | +++ | +++ |
| Кошка | Общий IgG | +++ | + |
| Курица | Общий IgG | – | – |
| Собака | Общий IgG | +++ | + |
| Осел | Общий IgG | ++ | +++ |
| Морская свинка | Общий IgG | +++ | + |
| Хомяк | Общий IgG | ++ | ++ |
| Свинья | Общий IgG | +++ | + |
| Кролик | Общий IgG | +++ | +++ |
| Макака резус | Общий IgG | +++ | +++ |

Таблица 3. Данные по концентрации типичных иммуноглобулинов в нормальной сыворотке, асцитной жидкости, клеточном супернатанте

Данные принадлежат компании Sigma-Aldrich

| SIGMA-ALDRICH® | | | | |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| Normal Serum, Ascites, and Cell Supernatant | | | | |
| Typical Immunoglobulin Concentration Ranges | | | | |
| Normal Sera | | | | |
| Species | IgG (mg/ml) | IgM (mg/ml) | IgA (mg/ml) | % κ/λ |
| Human | Total: 7.5 - 22 | 0.2 - 2.8 | 0.5 - 3.4 | 67/33 |
| | IgG1: 5 - 9.5 | | | |
| | IgG2: 2.2 - 4.8 | | | |
| | IgG3: 0.4 - 1.0 | | | |
| | IgG4: 0.1 - 0.6 | | | |
| Mouse | Total: 2 - 5 | 0.8 - 6.5 | 1.0 - 3.2 | 99/1 |
| | IgG1: 1.2 - 5 | | | |
| | IgG2a: 1.3 - 2.9 | | | |
| | IgG2b: 2.2 - 6.6 | | | |
| | IgG3: no data | | | |
| Rat | Total: 5 - 7 | 0.6 - 1.0 | 0.1 - 0.2 | 99/1 |
| | IgG1: ~5.85 | | | |
| | IgG2a: 6.7 - 8.0 | | | |
| | IgG2b: ca. 0.9 | | | |
| | IgG2c: ~2.6 | | | |
| Rabbit | 12 - 14.5 | 0.3 - 0.6 | 0.4 - 0.8 | 90/10 |
| Goat | Total: 18 - 24 | 0.8 - 2.0 | 0.1 - 0.9 | 1/99 |
| | IgG1: ~10.9 | | | |
| | IgG2: ~9.1 | | | |
| Sheep | 18 - 24 | 0.8 - 1.8 | 0.1 - 1.0 | 1/99 |
| Pig | Total: 17 - 24 | 1.0 - 3.4 | 1.3 - 2.6 | 50/50 |
| | IgG1: no data | | | |
| | IgG2: 8 - 17 | | | |
| Bovine | Total: 9 - 24 | 1.9 - 3.9 | 0.5 - 1.2 | 1/99 |
| | IgG1: 7 - 13 | | | |
| | IgG2: 6 - 15 | | | |
| Horse | IgG: 11.5 - 21 | 1.0 - 3.0 | 1.0 - 4.0 | 1/99 |
| | IgGt: 1 - 12 | | | |
| Monoclonal Sources | | | | |
| Ascites | 0.5 - 5.0 | | | N/A |
| Cell Culture Supernatant | 0.01 - 0.05 | | | N/A |

8. Связанные продукты

- SileksMag-Protein A, магнитные частицы с белком А, кат. номер K0181
- LabMix Mini 201, лабораторный миксер, кат. номер EQMM201
Миксер позволяет ускорить процедуру выделения, заменяя пипетирование
- Магнитные штативы для работы с магнитными частицами:
 - MagRack6, кат. номер EQMR006-2
 - MagRack16, кат. номер EQMR016
 - MagRack40, кат. номер EQMR040
 - MagRack50ML, кат. номер EQMR50ML

9. Контактные данные

телефон: +7 495 737 4224

эл. почта: info@sileks.com