

## SileksMagIMCombo-NH<sub>2</sub>

магнитные частицы для альтернативной иммобилизации антител, белков, ферментов выделения бактериальных клеток

Кат. номер: K0501

**Назначение:** альтернативная иммобилизации антител, белков, ферментов, выделение бакт. клеток

**Условия хранения:** +4°C

**Условия транспортировки:** особых условий не требуется

Содержание:

1. Описание	1
2. Свойства и преимущества	2
3. Важная информация	2
4. Рекомендуемые буфера	3
5. Процедура иммобилизации белка	4
Прямая иммобилизация	5
Ковалентная иммобилизация	6
6. Выделение бактериальных клеток	8
6. Связанные продукты	9
7. Контактные данные	9

### 1. Описание

Магнитные частицы SileksMagIMCombo-NH<sub>2</sub> для альтернативных способов иммобилизации поставляются в виде водной суспензии в готовом для использования виде. Использование частиц возможно также в системах автоматического выделения.

Магнитные частицы с предлагаемым покрытием дают возможность осуществить альтернативную иммобилизацию антител или белка, по выбору исследователя.

Основной способ иммобилизации – высокоаффинное связывание белковой молекулы на поверхности частиц без предварительной подготовки поверхности.

В качестве альтернативной иммобилизации можно использовать ковалентную пришивку через функциональные амино группы.

Частицы представляют собой парамагнитное ядро, инкапсулированное в покрытым гидрофильным полимером оболочку. Частицы имеют на поверхности высокую плотность функциональных групп, позволяющих осуществлять высокоэффективную иммобилизацию по выбору исследователя.

Уникальная особенность данных частиц в максимально оптимальном способе иммобилизовать белок на своей поверхности. В случае иммобилизации антител частицы могут быть использованы для выделения специфических бактериальных клеток с последующим их наращиванием.

Основные преимущества предлагаемых частиц:

- ***прочная иммобилизация без предварительной подготовки поверхности***
- ***возможность альтернативной иммобилизации***
- ***отличная ресуспендируемость***

Таблица 1. Описание и свойства магнитных частиц SileksMagIMCombo-NH<sub>2</sub>

Основа	Оксид железа
Тип магнетизации	Суперпарамагнетик (нет остаточного намагничивания)
Форма частиц	Сфера
Размер	300-400 нм
Концентрация	5 мг/мл
Емкость частиц:	около 40 мкг БСА (65 кДа) или 30 мкг IgG (150 кДа) на 1 мг частиц около 200 мкг БСА (65 кДа) на 1 мл частиц
Буфер хранения	Дистиллированная вода
Условия хранения	+4 °С, не замораживать

## 2. Свойства и преимущества

Свойства	Преимущества
➤ Высокая эффективность пришивки белков	Требуется меньше частиц для эффективной пришивки белка
➤ Инкапсулирование	Поверхность частиц химически инертная
➤ Частицы гомогенного размера	Выделение на частицах одинакового размера дает высокую воспроизводимость в разных условиях
➤ Устойчивость коллоидного состояния	Частицы легко переводятся в коллоидное состояние, не "слеживаются" при длительном хранении
➤ Быстрая собираемость в магнитном поле	Процедура выделения ускоряется
➤ Отсутствие остаточной намагниченности после удаления из магнитного поля	Частицы не слипаются, легко переводятся в коллоидное состояние
➤ Стабильность в биологических буферных системах от pH 5 до pH 9	Можно использовать максимально подходящие для конкретного объекта буфера для отмывок и хранения
➤ Стабильность в детергентах	Можно использовать большинство стандартно применяемых детергентов (Tween 20, Triton X100, SDS и т.п.)

## 3. 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.
- Перед началом работы проведите расчет необходимого количества частиц и белка, исходя из емкости применяемых частиц.
- Оптимальное время для иммобилизации определяется эмпирически. Мы рекомендуем инкубацию в течение ночи при +10 °С для получения стандартной эффективности иммобилизации.
- Процедуру иммобилизации можно проводить в диапазоне температур от комнатной (+22 °С) до +4 °С. Температура проведения процедуры иммобилизации определяется свойствами иммобилизуемого белка и его стабильности при конкретной температуре.
- Мы рекомендуем использовать частицы для иммобилизации в конечной концентрации 0.5-1 мг/мл.

## 4. Рекомендуемые буфера

### Буфера для иммобилизации

Для иммобилизации белков мы рекомендуем использовать фосфатные, карбонатные или бикарбонатные буфера с рН около 7.

Основное требование к буферу, отсутствие в буфере компонентов, содержащих амино группу.

Для иммобилизации белков мы предлагаем использовать следующий универсальный буфер, позволяющий в большинстве случаев решить задачу по иммобилизации белковых молекул:

- *Рекомендуемый Буфер для Иммобилизации белков*  
1-кратный PBS, рН 7.0

### Оборудование и реактивы, необходимые для работы

- 1.5 мл пробирки
- Магнитные частицы SileksMagIMCombo-NH<sub>2</sub>
- Белок для иммобилизации
- Буфер для иммобилизации
- Магнитный штатив для пробирок 1.5 мл
- Ротатор или иное приспособление для постоянного перемешивания
- Глутаровый альдегид (опционно)

## 5. Процедура иммобилизации белка

### Преимущества высокоаффинной иммобилизации по сравнению с ковалентным связыванием

- Полимерная поверхность частиц имеет специально подобранный набор функциональных групп, которые обеспечивают прочное взаимодействие с иммобилизуемой молекулой белка без предварительной подготовки поверхности. По силе связывания иммобилизация на данном типе поверхности сопоставима с ковалентной пришивкой. При альтернативной иммобилизации нужно помнить, что, нековалентная иммобилизация на поверхности будет отличаться от ковалентной пришивки в первую очередь из-за разной ориентации молекулы, обусловленной ее функциональными группами. В большинстве случаев нековалентная иммобилизация может быть более оптимальной, чем ковалентная пришивка.
- Ковалентно пришитые белки могут быть стабильнее, но при этом в большей степени теряют своей нативной активности.
- В случае маленьких белков, только ковалентная пришивка может удержать их на поверхности
- Когда белок привязан ковалентно, можно создавать достаточно жесткие условия для уменьшения неспецифического взаимодействия связанного белка с другими белками.

### Количество иммобилизуемого белка

Предлагаемые частицы SileksMagIMCombo-NH<sub>2</sub> (5 мг/мл) могут связать около 40 мкг бычьего сывороточного альбумина (БСА, 65 кДа) или 30 мкг IgG (150 кДа) на 1 мг частиц. При связывании белков, отличных от указанных, следует учитывать размер и аминокислотное строение белка. Наличие и доступность различных функциональных групп на поверхности белка определяет его способность к иммобилизации. При прочих равных условиях более мелкие белки могут быть связаны в большем количестве, более крупные в меньшем. По мере того, как иммобилизуемый белок связывается на поверхности, скорость и эффективность связывания уменьшаются. Решить эту проблему можно либо увеличением времени иммобилизации, либо создавая избыток белка больше того количества, которое может быть иммобилизовано частицами. Конечно, в случае дорогостоящих иммобилизуемых материалов последний вариант нежелателен.

100 мкг БСА соответствует приблизительно 100 мкг антител.

100 мкг БСА содержит приблизительно  $10^{15}$  молекул.

Для пересчета соответствующего количества белка можно воспользоваться следующей ссылкой:

*Weight to Molar Quantity* (for proteins): [www.bioline.com/us/media/calculator/01\\_04.html](http://www.bioline.com/us/media/calculator/01_04.html)

### Влияние температуры и времени на процесс иммобилизации

Температура может иметь влияние на процесс ковалентной иммобилизации. В том случае, если иммобилизуемый белок термолабилен, можно проводить реакцию иммобилизации при +10°C. Для стандартизации процесса мы рекомендуем проводить иммобилизацию в течение ночи при +10°C и постоянном плавном перемешивании на ротаторе.

### Перемешивание частиц в процессе иммобилизации

Перемешивание частиц не должно быть агрессивным. Самый лучший способ перемешивания, это регулярное переворачивание пробирки (для этой процедуры удобно использовать ротаторы, производимые компанией *Biosan*, Латвия, *Elmi*, Латвия и другие).

### Процедура иммобилизации

Процедура иммобилизации рассчитана на пришивку приблизительно 20 мкг белка (в пересчете на БСА) на 100 мкл магнитных частиц SileksMagIMCombo-NH<sub>2</sub> с концентрацией 5 мг/мл.

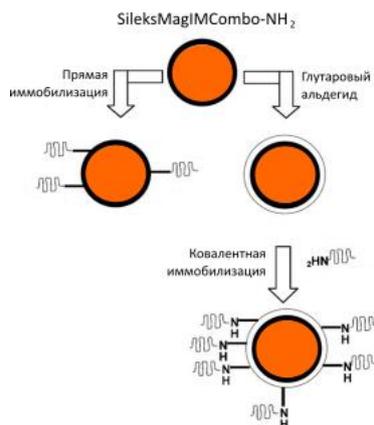


Рис.1 Альтернативные варианты иммобилизации

### Прямая иммобилизация (без предварительной подготовки поверхности)

1. Внесите в пробирку 100 мкл частиц (0.5 мг), соберите частицы в магнитном штативе, удалите супернатант.
2. Ресуспендируйте частицы в 500 мкл буфера PBS или другом подходящем буфере для иммобилизации.
3. Внесите 20 мкг белка в 100 мл того же буфера для иммобилизации. Мы рекомендуем при проведении процедуры иммобилизации для предотвращения агрегации белка добавлять Tween20 до конечной концентрации 0.01%.
4. Инкубируйте пробирку в течение как минимум 3 часов (мы рекомендуем инкубацию в течение ночи при +10°C). В процессе инкубации регулярно переворачивайте пробирку (используйте для этого ротатор), обеспечивая равномерное распределение частиц в суспензии.
5. По окончании инкубации поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант. Добавьте 1 мл буфера PBS или другого подходящего буфера, тщательно перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
6. Поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант и повторите процедуру промывки, описанную в п. 5 еще 3 раза.
7. После окончания промывки, ресуспендируйте частицы в подходящем объеме буфера PBS или другого подходящего буфера. Для предотвращения бактериальной контаминации добавляйте азид натрия до конечной концентрации 0.02% и для предотвращения агрегации белка Tween20 до конечной концентрации 0.01%.

**Ковалентная иммобилизация** (с использованием глутарового альдегида)

1. Внесите в пробирку 100 мкл частиц (0.5 мг), соберите частицы в магнитном штативе, удалите супернатант.
2. Ресуспендируйте частицы в 250 мкл буфера PBS или другом подходящем буфере для иммобилизации.
3. Внесите 250 мкл 50%-ного глутарового альдегида (можно использовать глутаровый альдегид с другой концентрацией, мы рекомендуем конечную концентрацию альдегида от 10% до 25%).
4. Инкубируйте пробирку в течение как минимум 3 часов (мы рекомендуем инкубацию в течение ночи при комнатной температуре). В процессе инкубации регулярно переворачивайте пробирку (используйте для этого ротатор), обеспечивая равномерное распределение частиц в суспензии.
5. По окончании инкубации поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант. Добавьте 1 мл буфера PBS или другого подходящего буфера, тщательно перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
6. Поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант и повторите процедуру промывки, описанную в п. 5 еще 3 раза.
7. Ресуспендируйте частицы в 500 мкл буфера PBS или другом подходящем буфере для иммобилизации.
8. Внесите 20 мкг белка в 100 мкл того же буфера для иммобилизации. Мы рекомендуем при проведении процедуры иммобилизации для предотвращения агрегации белка добавлять Tween20 до конечной концентрации 0.01%.
9. Инкубируйте пробирку в течение как минимум 3 часов (мы рекомендуем инкубацию в течение ночи при +10°C). В процессе инкубации регулярно переворачивайте пробирку (используйте для этого ротатор), обеспечивая равномерное распределение частиц в суспензии.
10. По окончании инкубации поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант. Добавьте 1 мл буфера PBS или другого подходящего буфера, тщательно перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
11. Поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант и повторите процедуру промывки, описанную в п. 5 еще 3 раза.
12. После окончания промывки, ресуспендируйте частицы в подходящем объеме буфера PBS или другого подходящего буфера. Для предотвращения бактериальной контаминации добавляйте азид натрия до конечной концентрации 0.02% и для предотвращения агрегации белка Tween20 до конечной концентрации 0.01%.

### Хранение частиц

Полученные частицы с иммобилизованным белком храните при +4 °С в буфере PBS или другом подходящего буфера для иммобилизованного белка. Чтобы избежать бактериальной контаминации всегда добавляйте к частицам азид натрия до конечной концентрации 0.02%. Для предотвращения агрегации белка, связанного на частицах, желательно добавлять Tween20 до конечной концентрации 0.01%.

Следует помнить, что азид натрия токсичен для бактериальных и эукариотических клеток, поэтому, перед использованием частиц с клетками, отмойте частицы от азиды 3 раза буфером PBS или другим подходящим буфером.

### Рекомендации и комментарии к процедуре иммобилизации белков

1. Оптимизация соотношений количества частиц и белка, а также конечного объема, в котором происходит иммобилизация, всегда требует проверки и оптимизации. Когда концентрация частиц и/или белка в конечном объеме становится высокой, иммобилизация на поверхности частиц становится неравномерной.
2. Использование конкретного буфера, его солевой состав и значение pH могут влиять на эффективность иммобилизации.
3. Время и температура инкубации зависит от свойств конкретного белка. Оптимальные условия инкубации нужно подбирать эмпирически. Инкубация для иммобилизации при +10°C в буфере PBS в большинстве случаев является стандартной, но может быть не оптимальной для конкретного белка.

### Использование блокирующих реагентов

Для использования частиц с иммобилизованным белком в последующих процедурах мы рекомендуем провести блокировку полученных частиц подходящим блокирующим агентом. Блокирующий реагент должен соответствовать планируемым задачам. Блокировка частиц необходима, чтобы закрыть неиспользованные активные области частиц и снизить неспецифическое связывание.

Блокирующие буферы и реагенты обычно используются для применений в иммунодетекции и иммуногистохимии. Эффективное использование блокирующих буферов сводит к минимуму фоновый шум, а также стабилизируют частицы при долгосрочном хранении. В качестве блокирующих реагентов используют обезжиренное молоко, казеин, сыворотку и BSA. Производимые разными фирмами блокирующие реагенты могут иметь преимущества при решении конкретных задач.

## 6. Выделение бактериальных клеток

Для выделения бактериальных клеток на поверхности частиц должен быть предварительно иммобилизован связывающий агент (антитела, специфический белок, специфическая структура, обеспечивающая взаимодействие с клеткой). Процедура иммобилизации описана в предыдущем разделе.

Перед началом работы с бактериальными клетками частицы с иммобилизованным белком должны быть:

- предварительно обработаны соответствующим дальнейшим задачам блокирующим реагентом
- отмыты и переведены в стерильный соответствующим дальнейшим задачам буфер для дальнейшей работы с клетками (обычно можно использовать PBS или другой подходящий для конкретных клеток солевой буфер)
- отмыты и не содержать в буфере токсичных для клеток агентов (азиды, детергентов и т.п.)

Поскольку взаимодействие иммобилизованного агента с клеткой может иметь невысокую эффективность ввиду разных обстоятельств (неэффективная иммобилизация, стерические проблемы, низкая аффинность и т.п.), мы рекомендуем брать избыток магнитных частиц по отношению к количеству клеток.

### Выделение клеток магнитными частицами

Для выделения клеток магнитными частицами мы рекомендуем использовать стерильные 2 мл пробирки.

Проводите процедуру выделения в стерильных условиях, с использованием стерильных буферов.

1. Внесите в пробирку 1 мл клеток ( $10^6$ - $10^7$  клеток на мл) в подходящем солевом буфере.
2. Внесите 100 мкл (0.5 мг) частиц с иммобилизованным агентом, ресуспендированных в аналогичном буфере. Аккуратно распределите частицы в объеме плавным пипетированием.
3. Инкубируйте на ротаторе с медленной скоростью перемешивания. Продолжительность и температура инкубации обсуждается в разделе Рекомендации к процедуре выделения клеток.
4. По окончании инкубации поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант с несвязавшимися клетками. Добавьте 1 мл буфера PBS или другого подходящего стерильного буфера, тщательно перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
5. Поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант и повторите процедуру промывки, описанную в п. 5 еще 3 раза.
6. После окончания отмывки, ресуспендируйте частицы в 1 мл среды, подходящей для дальнейшего размножения клеток.
7. Внесите ресуспендированные частицы в соответствующую для размножения клеток емкость с питательной средой. Инкубируйте клетки в соответствующих для них условиях.
8. Когда клетки совершат больше 5-8 цикла деления, отберите 1 мл клеточной культуры в стерильную пробирку. Поместите пробирку в магнитный штатив, дайте магнитным частицам собраться и перенесите супернатант содержащий свободные от магнитных частиц клетки в свежую питательную среду.
9. Продолжайте наращивать клетки до получения нужного количества.

### Рекомендации и комментарии к процедуре выделения клеток магнитными частицами

1. Количество используемых для выделения частиц может отличаться от рекомендованного в приводимом выше протоколе. Количество частиц определяется задачей, специфичностью взаимодействия агента с клеткой, количеством выявляемых клеток во взятом образце.
2. Условия инкубации частиц с клетками определяется эффективностью и специфичность взаимодействия иммобилизованного агента с клеткой. Для эффективного взаимодействия время инкубации должно подбираться экспериментально и может составлять от 30 минут до 3 часов. То же самое касается и температуры инкубации. В большинстве случаев инкубация при комнатной температуре дает хорошие результаты. Но в некоторых случаях повышение температуры инкубации до +37 °C приводит к более

эффективному взаимодействию. При выборе условий инкубации нужно всегда исходить из имеющейся информации о свойствах иммобилизованного агента по отношению к объекту взаимодействия. При отсутствии такой информации придется делать несколько экспериментальных точек с разными условиями инкубации.

## 7. Связанные продукты

- 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

## 8. Контактные данные

телефон: +7 495 737 4224

эл. почта: [info@sileks.com](mailto:info@sileks.com)