

# Иммобилизация антител (белка) на магнитных частицах

Предлагаемая методика дает возможность осуществить ковалентную иммобилизацию антител или белка по Вашему выбору на поверхности магнитных частиц с силикатной оболочкой. Частицы, имеющие SiO<sub>2</sub> оболочку, обладают высокой гидрофильностью и низкой неспецифической сорбцией белков на своей поверхности. Для возможности иммобилизации белков частицы модифицированы и имеют на поверхности активные NH<sub>2</sub> группы.

Инструкция к набору

## Иммобилизации антител/белков на магнитных частицах

Реактивы, входящие в набор, позволяют произвести 5 реакций иммобилизации по 400-600 мкг белка на одну процедуру.

Состав набора:

Магнитные частицы, 50 мг/мл.....	1 мл
Фосфатный буфер, 0.1 М, pH 7.4 .....	10 мл
Глутаровый альдегид, 50%-ный .....	5 мл
Азид натрия, 1%-ный.....	200 мкл
Терминирующий буфер.....	5 мл
Буфер для иммобилизации.....	5 мл
Дистиллированная вода.....	10 мл

Условия хранения: +4 °С

### Введение

Набор рассчитан на проведение процедуры ковалентного связывания белка на поверхности магнитных частиц. В результате этой процедуры Вы получаете возможность для:

- иммуномагнитного выделения уникальных клеток или белков из биологических жидкостей,
- повышения чувствительности иммунологических исследований за счет концентрирования специфического материала

В чем же преимущества ковалентного связывания по сравнению с пассивной адсорбцией?

1. Ковалентное связывание позволяет связать на поверхности на 20-40% белка больше, чем при пассивной адсорбции
2. Ковалентное связывание легко стандартизовать и унифицировать, получая частицы с определенным уровнем покрытия
3. Ковалентно пришитые белки значительно стабильнее. Так, после 1 часа при 56 °С количество IgG на ковалентно пришитых частицах остается практически неизменным – около 100% в то время, как на частицах с пассивной адсорбцией только 50-70%
4. В случае маленьких белков, только ковалентная пришивка может удержать их на поверхности
5. Когда белок привязан ковалентно, можно создавать достаточно жесткие условия для уменьшения неспецифического взаимодействия связанного белка с другими белками.

### Протокол иммобилизации

(В протоколе описана процедура, рассчитанная в первую очередь на связывания таких молекул, как IgG. Использование данного протокола для других белков может потребовать оптимизации добавляемого количества белка)



1. Внесите в 2 мл пробирку следующие компоненты (магнитные частицы перед использованием тщательно ресуспендируйте пипетированием):
  - дистиллированная вода.....50 мкл
  - 0.1 М фосфатный буфер, pH 7.4.....250 мкл
  - глутаровый альдегид, 50%-ный..... 500 мкл
  - магнитные частицы, 50 мг/мл.....200 мкл
2. Тщательно перемешайте содержимое пробирки пипетированием.

3. Инкубируйте пробирку в течении 3 часов при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Перемешивание должно быть мягким, не используйте вортекс или ультразвук. Если нет соответствующего оборудования, можно регулярно (прибл. каждые 5-10 мин.) переворачивать пробирку, чтобы осуществлять перемешивание частиц.
4. Подготовьте 3 мл 0.025 М фосфатного буфера (2250 мкл дист. воды + 750 мкл 0.1 М фосфатного буфера).
5. Поместите пробирку с частицами в магнитный штатив, дайте частицам собраться и как можно тщательнее удалите супернатант.
6. Используя магнитный штатив промойте частицы 3 раза по 1 мл 0.025 М фосфатным буфером, приготовленным в п.4.
7. В новой 2 мл пробирке подготовьте раствор иммобилизуемого белка, растворив 500 мкг белка в 500 мкл **Буфера для иммобилизации** (более подробные рекомендации смотрите в разделе **Дополнительная информация**). Отберите 10 мкл приготовленного раствора в отдельную пробирку для последующего расчета эффективности иммобилизации.
8. Внесите в пробирку с магнитными частицами 250 мкл дист. воды и 250 мкл 0.1 М фосфатного буфера. Тщательно перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
9. Перенесите суспензию обработанных глутаровым альдегидом магнитных частиц в пробирку с иммобилизуемым белком. Тщательно перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
10. Инкубируйте пробирку в течении 2 часов при комнатной температуре при постоянном перемешивании (более подробные рекомендации смотрите в разделе **Дополнительная информация**). Перемешивание должно быть мягким, не используйте вортекс или ультразвук. Если нет соответствующего оборудования, можно регулярно (прибл. каждые 5-10 мин.) переворачивать пробирку, чтобы осуществлять перемешивание частиц.
11. По окончании инкубации поместите пробирку в магнитный штатив и после того, как частицы соберутся у магнита, отберите 20 мкл супернатанта в отдельную пробирку для последующего расчета эффективности иммобилизации.
12. Добавьте в пробирку 500 мкл **Терминирующего буфера**. Обработка буфером нужна для того, что заблокировать неиспользованные активизированные группы.
13. Инкубируйте пробирку в течении 2 часов при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Перемешивание должно быть мягким, не используйте вортекс или ультразвук. Если нет соответствующего оборудования, можно регулярно (прибл. каждые 5-10 мин.) переворачивать пробирку, чтобы осуществлять перемешивание частиц.
14. Поместите частицы в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант. Добавьте 1 мл буфера PBS (состав буфера смотрите в разделе **Дополнительная информация**), тщательно перемешайте содержимое пробирки пипетированием.
15. Поместите частицы в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант и повторите процедуру промывки, описанную в п.14 еще 4 раза.
16. После окончания промывки, суспендируйте частицы в 1 мл буфера PBS и добавьте 20 мкл 1%-ного азиды натрия для предотвращения бактериальной инфекции (о хранении и работе с частицами смотрите в разделе **Дополнительная информация**).

## Дополнительная информация

### Перемешивание частиц

Перемешивание частиц не должно быть агрессивным. Самый лучший способ перемешивания, это регулярное переворачивание пробирки вверх дном.

Примитивное устройство для таких целей можно собрать из обычной верхнеприводной мешалки, прикрепив к патрону мешалки пробирку.

Скорость перемешивания следует установить минимальную, чтобы пробирка совершала несколько оборотов в минуту.

Лабораторные миксеры такого типа производит компания **Биосан** (Латвия, [www.biosan.lv](http://www.biosan.lv)).



### Количество глутарового альдегида

Этап обработки глутаровым альдегидом – один из основных моментов, существенно влияющих на последующую иммобилизацию белка. Количество добавляемого глутарового альдегида должно быть достаточным для полного насыщения всей поверхности частиц. Недостаток альдегида приведет к перекрестным реакциям между проактивированными и оставшимися неактивированными группами еще до того, как будет добавлен лиганд. Тем самым эффективность иммобилизации резко снижается.

### Количество иммобилизуемого белка

Предлагаемые частицы могут связать 60 мкг бычьего сывороточного альбумина (БСА, 65 кДа) или 50 мкг IgG (150 кДа) на 1 мг частиц. При связывании белков, отличных от указанных, следует учитывать размер белка: 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.

### Влияние температуры и времени на процесс иммобилизации

Температура имеет слабое влияние на процесс ковалентной иммобилизации. В том случае, если иммобилизуемый белок термолабилен, можно проводить реакцию иммобилизации при +10 °С. Увеличение продолжительности самого процесса иммобилизации с 2 часов до 5 часов увеличивает количество иммобилизованного белка приблизительно на 10-15%.

### Подготовка буфера PBS (расчет на 1 литр буфера)

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

### Хранение частиц

Полученные частицы с иммобилизованным белком храните при +4 °С в буфере PBS. Чтобы избежать бактериальной контаминации всегда добавляйте к частицам азид натрия до конечной концентрации 0.02%. Но следует помнить, что азид токсичен для бактериальных и эукариотических клеток, поэтому, перед использованием частиц с клетками, отмойте частицы от азиды 3 раза буфером PBS.

### Определение концентрации белка

Для определения концентрации можно воспользоваться любой доступной методикой.

Наша компания производит набор "**Coomassie G250** (метод Бредфорда)", использование которого позволит легко и быстро определить концентрацию белка в образцах.

Если реагент Coomassie у Вас есть, то для измерения следуйте следующей инструкции:

1. приготовьте разведения контроля для измерения в диапазоне концентраций 2.5-50 мкг/мл (см. инструкцию к набору **Coomassie G250**)
2. к аликвоте (10 мкл), отобранной в п.7 данного протокола иммобилизации, добавьте 490 мкл дист. воды (концентрация исходного раствора была 1000 мкг/мл, после проделанного разведения концентрация разведенной аликвоты составит 20 мкг/мл)
3. к аликвоте (20 мкл), отобранной в п.11 данного протокола иммобилизации, добавьте 480 мкл дист. воды (исходный раствор белка разводился равным объемом суспензии магнитных частиц, следовательно, для получения сопоставимого разведения для измерения нужно взять 2-кратное количество раствора)
4. внесите в каждую пробирку со стандартным разведением рекомендуемое количество реагента **Coomassie G250**, а в пробирки с разведенными аликвотами по 250 мкл реагента **Coomassie G250**.
5. Проведите измерения стандартных разведений и образца.
6. Используя стандартную кривую, рассчитайте концентрацию белка в образцах и количество иммобилизованного белка.