

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 SiO₂ оболочку, обладают высокой гидрофильностью и низкой неспецифической сорбцией белков на своей поверхности. Для возможности иммобилизации белков частицы модифицированы и имеют на поверхности активные NH₂ 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).



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 непроактивированными 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)

NaH₂PO₄ · H₂O.....0.16 г
Na₂HPO₄·2H₂O.....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.