

# SileksMag-COOH

карбоксилированные магнитные частицы для прямой ковалентной иммобилизации антител, белков, ферментов, нуклеотидных зондов

Кат. номер: K0174

**Назначение:** ковалентная иммобилизации антител, белков, ферментов, нуклеотидных зондов

**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	2
5. Процедура иммобилизации белка	3
6. Процедура иммобилизации олигонуклеотидного зонда	5
7. Связанные продукты	4
8. Контактные данные	4

## 1. Описание

Магнитные частицы с карбоксильной группой (-COOH) поставляются в виде водной суспензии в готовом для использования виде. Использование частиц возможно также в системах автоматического выделения.

Магнитные частицы с карбоксильной группой дают возможность осуществить ковалентную иммобилизацию антител или белка, а также 5'-амино модифицированных олигонуклеотидов.

Частицы представляют собой парамагнитное ядро, инкапсулированное в покрытым гидрофильным инертным носителем оболочку. Частицы имеют на поверхности высокую плотность активных COOH групп, позволяющих осуществлять высокоэффективную ковалентную пришивку.

Основное преимущество данных частиц в том, что они обладают низкой неспецифической сорбцией белков и нуклеиновых кислот на своей поверхности. Основные преимущества предлагаемых частиц:

- *низкое неспецифическое связывание*
- *возможность прямой ковалентной иммобилизации*
- *отличная ресуспендируемость*

Таблица 1. Описание и свойства магнитных частиц SileksMag-COOH

Основа	Оксид железа
Тип магнетизации	Суперпарамагнетик (нет остаточного намагничивания)
Форма частиц	Сфера
Размер	150-200 нм
Концентрация	10 мг/мл
Емкость частиц:	около 120 мкг бычьего сывороточного альбумина (BSA, 65 кДа) или 100 мкг IgG (150 кДа) на 1 мг частиц
Буфер хранения	Дистиллированная вода
Условия хранения	+4 °C, не замораживать

## 2. Свойства и преимущества

Свойства	Преимущества
➤ Низкое неспецифическое связывание белков	Отсутствие фоновых примесей
➤ Высокая эффективность пришивки белков	Требуется меньше частиц для эффективной пришивки белка
➤ Низкое неспецифическое связывание нуклеиновых кислот (ДНК)	Возможно выделение мРНК свободных от примесей других нуклеиновых кислот
➤ Высокая эффективность пришивки зондов	Требуется меньше частиц для эффективной пришивки зонда
➤ Инкапсулирование	Поверхность частиц химически инертная
➤ Частицы гомогенного размера	Выделению 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 различных системах лизирующих буферов от pH 5 до pH 12	Можно использовать максимально подходящие для конкретного объекта лизирующие буфера
➤ 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 лиганда, исходя из емкости применяемых частиц.
- Оптимальное время для иммобилизации определяется эмпирически. Не всегда инкубацией в течение суток достигается максимальная эффективность иммобилизации.
- Процедуру иммобилизации можно проводить в диапазоне температур от комнатной (+22 °C) до +4 °C. Температура проведения процедуры иммобилизации определяется свойствами иммобилизуемого лиганда и его стабильности при конкретной температуре.

## 4. Рекомендуемые буфера

### Буфера для иммобилизации

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

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

При использовании буферов типа MES с pH 5 может происходить неспецифическая сорбция белков на поверхности частиц. При pH 7 такой неспецифической сорбции не происходит. В буферах с pH выше 7 значительно ухудшается стабильность группировки, образуемой карбодимидом.

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, pH 7.0

Для иммобилизации нуклеотидных зондов мы рекомендуем буфер:

- *Рекомендуемый Буфер для Иммобилизации нуклеотидных зондов*  
100 мМ Имидазольный буфер, pH 7.0

#### **Оборудование и реактивы, необходимые для работы**

- 1.5 мл пробирки
- Магнитные частицы с карбоксильной группой
- Лиганд, содержащий амино группу
- Буфер для иммобилизации
- Магнитный штатив для пробирок 1.5 мл
- Ротатор или иное приспособление для постоянного перемешивания

## **5. Процедура иммобилизации белка**

#### **Преимущества ковалентного связывания по сравнению с пассивной адсорбцией**

- Ковалентное связывание позволяет связать на поверхности на 20-40% белка больше, чем при пассивной адсорбции
- Ковалентное связывание легко стандартизовать и унифицировать, получая частицы с определенным уровнем покрытия
- Ковалентно пришитые белки значительно стабильнее. Так, после 1 часа при 56°C количество IgG на ковалентно пришитых частицах остается практически неизменным около 100% , в то время, как на частицах с пассивной адсорбцией только 50-70%
- 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 могут связать не менее 120 мкг бычьего сывороточного альбумина (BSA, 65 кДа) или 100 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.

100 мкг BSA соответствует приблизительно 100 мкг антител.

100 мкг BSA 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**

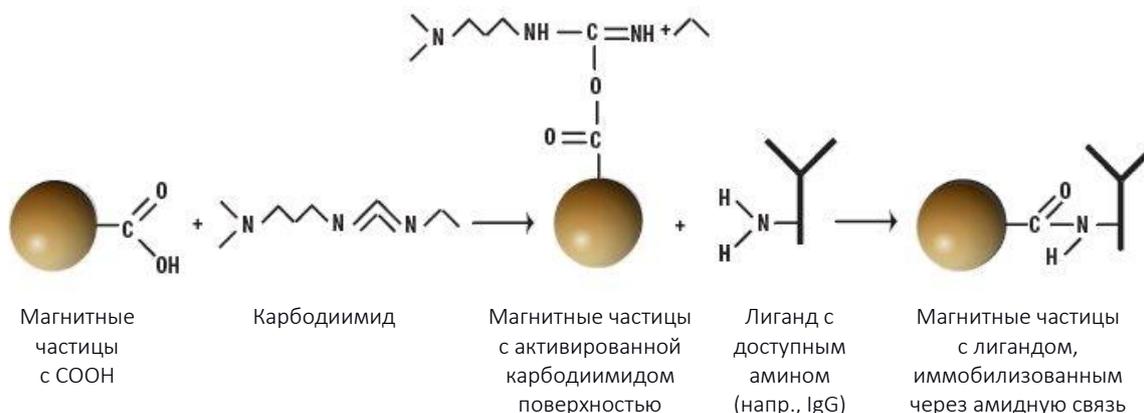
Температура может иметь влияние на процесс ковалентной иммобилизации. В том случае, если иммобилизуемый белок термолабилен, можно проводить реакцию иммобилизации при +10°C. Увеличение продолжительности самого процесса иммобилизации с 2 часов до 5 часов увеличивает количество иммобилизованного белка приблизительно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

### 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 25 мкг белка (в пересчете на БСА) на 20 мкл карбоксилированных магнитных частиц с концентрацией 10 мг/мл.



1. Внесите в пробирку 0.2 мг частиц (20 мкл), добавьте к частицам 400 мкл буфера для иммобилизации. Перемешайте частицы пипетированием.
2. Добавьте к суспензии частиц 400 мкл раствора 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида в буфере для иммобилизации (20 мг в 400 мкл). Мы рекомендуем использовать карбодиимид компании Sigma-Aldrich, кат. номер 03449 (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimid -hydrochlorid).
3. Внесите 25 мкг белка в 100 мл 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 1 часа. В процессе инкубации регулярно переворачивайте пробирку, 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, 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. Для предотвращения бактериальной контаминации добавляйте азид натрия до конечной концентрации 0.02%.

### Хранение частиц

Полученные частицы с иммобилизованным белком храните при +4 °C в буфере PBS. Чтобы избежать бактериальной контаминации всегда добавляйте к частицам азид натрия до конечной концентрации 0.02%. Для предотвращения агрегации белка, связанного на частицах, желательнее 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 азидов 3 раза буфером PBS.

### 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 белка в конечном объеме становится высокой, пришивку на поверхности частиц становится неравномерной.

2. Использование карбодиимида очень сильно влияет на результат иммобилизации. Поскольку промежуточная структура, образуемая карбодиимидом крайне нестабильна, очень важно, чтобы количество этого препарата было достаточно, чтобы белок мог ковалентно пришиваться к поверхности. С другой стороны, избыток карбодиимида приводит к перекрестной сшивке белков и, как следствие, невозможности белков пришиваться к поверхности. Сам карбодиимид, особенно его водорастворимая форма, нестабилен в процессе хранения (повышенная влажность, хранение при комнатной температуре и т.п., рекомендуется хранение только при -20 °С, перед использованием поддержать минимум 30 минут при комнатной температуре, чтобы минимизировать связывание с влагой).

Всегда проверяйте качество карбодиимида перед препаративным экспериментом.

Нужно иметь в виду, что нахождение карбодиимида в образце делает невозможным измерение белка при помощи реактива Бредфорд. Это значит, что оценку качества иммобилизации придется проводить другими методами.

Если используется оптический метод оценки, обязательно используйте контроль, содержащий карбодиимид в той же концентрации.

3. Время инкубации зависит от свойств конкретного белка. Оптимальное время инкубации нужно подбирать эмпирически.

## 6. Процедура иммобилизации олигонуклеотидного зонда

### Количество олигонуклеотидного зонда

Предлагаемые частицы могут связать не менее 20 мкг 5'-амино модифицированного олигонуклеотида на 1 мг частиц.

Для пересчета соответствующего количества нуклеотидной пробы можно воспользоваться следующей ссылкой:

*Weight to Molar Quantity* (for nucleic acids): [www.bioline.com/us/media/calculator/01\\_07.html](http://www.bioline.com/us/media/calculator/01_07.html)

### Влияние температуры и времени на процесс иммобилизации

Реакцию иммобилизации следует проводить при комнатной температуре в течение 3 часов.

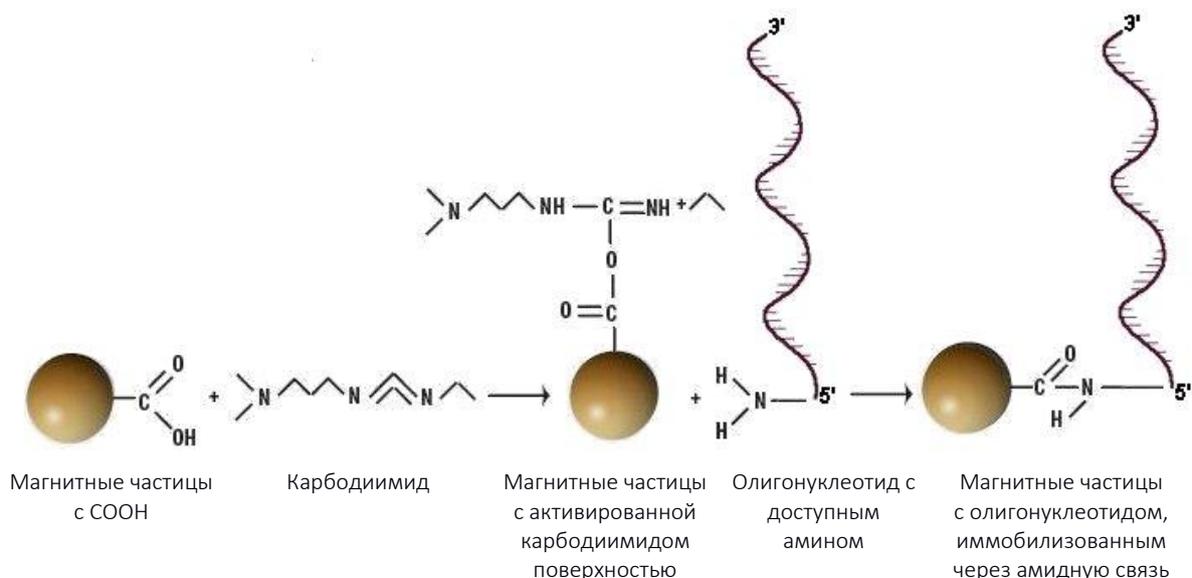
Проведение иммобилизации при +50°C или увеличение продолжительности самого процесса иммобилизации (например, в течение ночи) приводит, по нашим данным, к существенному ухудшению результата.

### 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 олигонуклеотида на 20 мкл карбоксилированных магнитных частиц с концентрацией 10 мг/мл.



1. Внесите в пробирку 0.2 мг частиц (20 мкл), добавьте к частицам 400 мкл буфера для иммобилизации (100 мМ имидазольный буфер). Перемешайте частицы пипетированием.
2. Добавьте к суспензии частиц 400 мкл раствора 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида в буфере для иммобилизации (20 мг в 400 мкл). Мы рекомендуем использовать карбодиимид компании Sigma-Aldrich, кат. номер 03449 (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimid -hydrochlorid).
3. Внесите 20 мкг 5'-амино модифицированного олигонуклеотида в объеме, не превышающем 20 мкл.
4. Инкубируйте пробирку в течение 3 часов при комнатной температуре. В процессе инкубации регулярно переворачивайте пробирку, обеспечивая равномерное распределение частиц в суспензии.
5. По окончании инкубации поместите пробирку в магнитный штатив, как можно тщательнее удалите супернатант. Добавьте 1 мл деионизированной воды, 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 5 раз.
7. После окончания промывки, ресуспендируйте частицы в подходящем объеме деионизированной воды. Для предотвращения бактериальной контаминации добавляйте азид натрия до конечной концентрации 0.02%.

#### Хранение частиц и использование частиц

Полученные частицы с иммобилизованным белком храните при +4 °С. Чтобы избежать бактериальной контаминации всегда добавляйте к частицам азид натрия до конечной концентрации 0.02%.

Перед использованием перенесите нужное для работы количество частиц в другую пробирку, добавьте 5-кратный объем деионизированной воды, ресуспендируйте частицы, соберите частицы в магнитном штативе и удалите супернатант. Промойте частицы еще 2 раза деионизированной водой, ресуспендируйте в необходимом объеме деионизированной воды. Перед использованием прогрейте частицы с иммобилизованным олигонуклеотидным зондом при температуре +65 °С в течение 10 минут.

#### Рекомендации и комментарии к процедуре иммобилизации олигонуклеотидного зонда

1. Соотношения количества частиц и олигонуклеотидного зонда отработано нами и не требует дальнейшей оптимизации. Конечный объем, в котором проходит иммобилизации, не должен быть маленьким, так как в концентрированных растворах распределение компонентов происходит неравномерно и покрытие частиц тоже будет неравномерным.
2. Избыток карбодиимида несильно влияет на результат иммобилизации. Поскольку промежуточная структура, образуемая карбодиимидом крайне нестабильна, очень важно, чтобы количество этого препарата было достаточно, чтобы олигонуклеотидный зонд мог ковалентно пришиваться к поверхности. Сам карбодиимид, особенно его водорастворимая форма, нестабилен в процессе хранения (повышенная влажность, хранение при комнатной температуре и т.п., рекомендуется хранение только при -20 °С, перед

использованием поддержать минимум 30 минут при комнатной температуре, чтобы минимизировать связывание с влагой).

Всегда проверяйте качество карбодиимида перед препаративным экспериментом.

Если используется оптический метод оценки, обязательно используйте контроль, содержащий карбодиимид в той же концентрации.

3. Достаточное эффективное время инкубации для иммобилизации олигонуклеотидного зонда – 3 часа при комнатной температуре. Увеличение времени инкубации или повышение температуры инкубации, по нашим экспериментальным данным, приводит к ухудшению результата. К сожалению, мы пока не знаем причины, которые приводят к такому ухудшению.

## 7. Связанные продукты

- SileksMag-COOH , активированные магнитные частицы, кат. номер K0174
- 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