

Сравнение эффективности протоколов выделения компонентов крови с использованием магнитных частиц (на модели выделения эритроцитов из цельной крови)

Алексей Жигулин, ООО Силекс, info@sileks.com

Введение

В сообщении от ноября 2023 года мы описывали результаты по выделению клеток на модели выделения эритроцитов из цельной крови. В данном сообщении мы приводим данные сравнительного выделения эритроцитов по двум разным протоколам.

В сообщении от ноября 2023 года мы использовали протокол, по которому на первом этапе клетки (в описываемой модельной системе – эритроциты) после связывания с антителами отмывались от не связавшихся антител центрифугированием. Такой подход применим для клеток, но не применим для объектов типа белков и макромолекул различного происхождения.

В данном сообщении на модели выделения эритроцитов из цельной крови, содержащей собственные антитела, мы хотели показать подход, позволяющий выделять любые объекты, в том числе и клетки, без таких процедур, как центрифугирование.

Модельная система

Для наглядной демонстрации эффективности выделения любых компонентов крови с использованием антител без центрифугирования образца мы использовали модельную систему выделения эритроцитов из цельной крови. Приводимые ниже соотношения были использованы для максимальной демонстрации эффекта выделения и могут быть изменены в зависимости от конкретных задач.

Материалы для модели

Антитела: IgG антитела к эпитопам D-антигена на поверхности резус-положительных эритроцитов.
Кровь: кровь с положительным резус-фактором.
Магн. частицы: SileksMag-Protein A, кат. номер K0181

Проведение эксперимента

Целью эксперимента было сравнение двух подходов для выделения компонентов, содержащихся в крови. Для наглядной визуализации использовалась модель связывания и выделения эритроцитов. Но точно такой же подход может быть с таким же успехом применен для выделения любых компонентов из крови, содержащей собственные антитела.

Протокол 1

Готовили два одинаковых образца: вносили 25 мкл цельной крови в 800 мкл буфера PBS.

Этап 1. Удаление присутствующих в образце антител

В первый образец вносили 200 мкл магнитных частиц SileksMag-Protein A. Во второй образец вносили 200 мкл буфера PBS и использовали в качестве контрольного. Оба образца инкубировали при постоянном неагрессивном перемешивании на ротаторе при комнатной температуре в течение 12 часов.

Образец с магнитными частицами помещали с магнитный штатив, собирали магнитные частицы и свободный от магнитных частиц супер переносили в новую пробирку. Визуального отличия между образцами, обработанным магнитными частицами и контрольным, не наблюдалось.

Этап 2. Связывание антител с целевым объектом

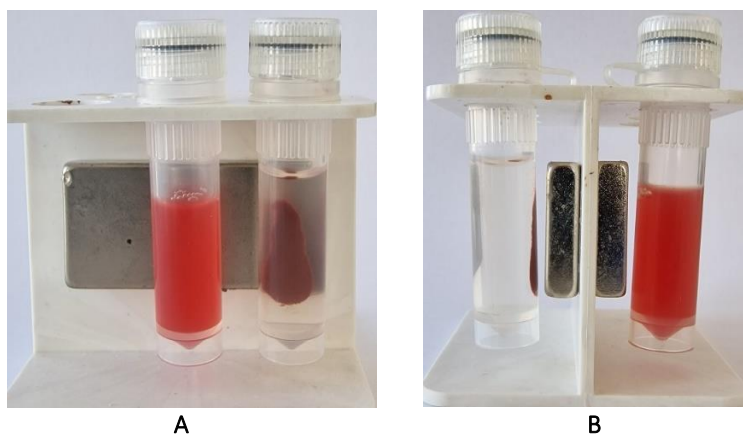
В образец, предварительно обработанный магнитными частицами SileksMag-Protein A, вносили антитела IgG к эпитопам D-антигена на поверхности резус-положительных эритроцитов. Количество вносимых антител рассчитывалось в соответствии с оценочной емкостью магнитных частиц, планируемых для внесения на следующем этапе. Образец, так же, как и контрольный образец, инкубировали с периодическим перемешиванием 2 часа при +37 °С в термоблоке.

Этап 3. Связывание и выделение комплекса антитело-антиген

После инкубации, в образец с ранее внесенными антителами вносили 200 мкл свежих магнитных частицами SileksMag-Protein A. Образец аккуратно перемешивали.

Связывание меченых антителами эритроцитов с магнитными частицами происходило сразу, без дополнительной инкубации (см. Фото 1).

Фото 1. Связывание меченых антителами эритроцитов с магнитными частицами



На Фото 1А в пробирке с магнитными частицами виден бордовый цвет магнитных частиц за счет связанных с ними эритроцитов. На Фото 1В видно полное отсутствие эритроцитов в образце после связывания их магнитными частицами.

Протокол 2

Этап 1. Подготовка комплекса магнитных частиц с антителами

Для подготовки комплекса магнитных частиц SileksMag-Protein A с антителами IgG к эпитомам D-антигена на поверхности резус-положительных эритроцитов готовили следующий образец: вносили 200 мкл суспензии магнитных частиц в 800 мкл буфера PBS. В суспензию вносили антитела IgG в соответствии с оценочной емкостью взятых магнитных частиц.

Суспензию магнитных частиц с антителами инкубировали при постоянном неагрессивном перемешивании на ротаторе при комнатной температуре в течение 12 часов.

Этап 2. Отмывка комплекса магнитных частиц с антителом

Полученные магнитные частицы отмывали от не связавшихся антител с помощью магнитного штатива три раза по 500 мкл PBS и ресуспендировали в конечном объеме 200 мкл буфера PBS.

Этап 3. Связывание и выделение антигена при помощи комплекса магнитные частицы-антитело

Для визуализации связывания эритроцитов полученным комплексом на магнитных частицах готовили два одинаковых образца: вносили 25 мкл цельной крови в 800 мкл буфера PBS.

В один образец, вносили 200 мкл магнитных частиц с комплексом белок А-антитела IgG полученных на предыдущем этапе. Во второй образец вносили 200 мкл буфера PBS и использовали в качестве контрольного. Образцы инкубировали с периодическим перемешиваем 2 часа при +37 °С в термоблоке.

Фото 2. Связывание эритроцитов с комплексом магнитные частицы-антитело



На Фото 2 в пробирке с магнитными частицами виден бордовый цвет магнитных частиц за счет связанных с ними эритроцитов. Несмотря на очевидный эффект связывания эритроцитов частицами, результат связывания ниже, по сравнению с результатом, полученным в Протоколе 1.

В обоих протоколах использовалось одинаковое количество антител.

Результаты и обсуждения

Два приводимых выше протокола показывают эффективность разных подходов для выделения искомого объекта из биологической жидкости, в которой содержатся собственные антитела.

Преимущество использования магнитных частиц с белком А заключается в следующем:

1. возможность масштабирования эксперимента в зависимости от имеющегося количества антител
2. в отличие от прямой иммобилизации, антитела иммобилизованы на поверхности частиц с белком А за счет своей константной Fc частью, в то время как антигенсвязывающий Fab участок находится в стерически активном положении.

Классический подход выделения искомого объекта из биологических жидкостей представляет собой Протокол 2. В этом протоколе используются магнитные частицы с белком А с иммобилизованными антителами.

Основным недостатком такого подхода является снижение эффективности взаимодействия иммобилизованных антител с антигеном. Снижение эффективности можно объяснить кинетическими и стерическими затруднениями – иммобилизованное на поверхности антитело обладает меньшей подвижностью и имеет стерические для взаимодействия с антигеном.

Протокол 1 демонстрирует более эффективный подход для выделения искомого объекта. Основное преимущество этого протокола – возможность широкой оптимизации при инкубации образца, очищенного от собственных антител, с целевыми антителами. Последующее выделение образовавшегося комплекса антиген-антитела путем связывания с магнитными частицами с белком А происходит быстро и эффективно.

Фото 3. Сравнительная эффективность результатов выделения по Протоколам 1 и 2



А. Протокол 1

В. Протокол 2

25 февраля 2025 г.