

## Особенности применения магнитных сорбентов при выделении нуклеиновых кислот и белков. Обзор.

Алексей Жигулин, ООО Силекс, [info@sileks.com](mailto:info@sileks.com)

### Введение

Сразу хочу предупредить, что обзор представляет собой субъективный опыт, полученный в ходе работы с магнитными частицами и разработке наборов на их основе. Суждения и определения терминов и понятий также являются субъективными, если только не указано, что это не цитата или заимствование.

Для кого может быть полезен данный обзор? В первую очередь для тех, кто хочет работать с магнитными частицами и хочет иметь понимание, как это функционирует. Для тех, кто хочет создавать свои частицы и разрабатывать наборы, это обзор не будет большой помощью, так как для создания чего-либо необходима в первую очередь экспериментальная работа.

Рассмотрим вначале основные понятия, которыми нам предстоит пользоваться.

### Сорбция

Сорбция, то, что мы будем рассматривать в данном обзоре, это связывание чего-либо на поверхности сорбента. Под сорбентом мы будем понимать нечто, что предназначено для связывания.

Связываться могут молекулы (нуклеиновые кислоты, белки, другие полимеры разной природы, органические и неорганические соединения) и элементарные частицы. Мы сосредоточимся на связывании молекул.

Связывание может происходить за счет образования ковалентной связи или ионного взаимодействия. Теоретически, связывание всегда обратимо, как ковалентное, так и ионное. Практически, связывание может быть настолько сильным, что иногда отделение связавшегося объекта от сорбента может привести к частичному или полному разрушению самого объекта или сорбента.

Сорбция, при котором последующее разделение связавшегося объекта и сорбента не приводит к изменению исходных участников процесса мы будем называть обратимым связыванием или обратимой сорбцией. И это именно то, что нас интересует.

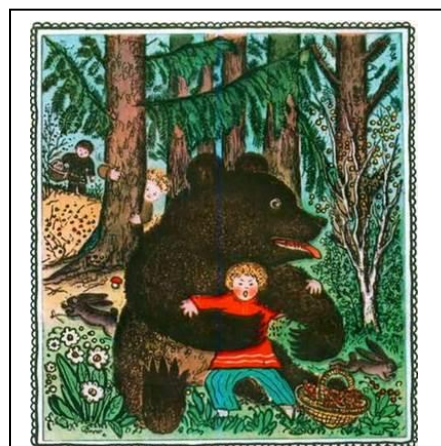
Сорбция, при котором последующее разделение связавшегося объекта и сорбента невозможно без разрушения какого-либо из исходных участников процесса мы будем называть необратимым связыванием или необратимой сорбцией. В некоторых случаях такое прочное связывание можно использовать, например, для удаления мешающего компонента.

Иммобилизацию можно назвать частным случаем ковалентно обусловленной сорбции. Но при этом нужно всегда помнить, что в зависимости от условий такой способ сорбции может быть обратимым.

### Магнитная частица

В интернете много информации о том, как все вещества так или иначе взаимодействуют с магнитным полем. Не будем здесь на этом останавливаться. Для тех, кому это интересно, посмотрите в интернете «диамагнетики», «парамагнетики», «ферромагнетики» и вы откроете для себя целый мир.

Здесь мы будем рассматривать частицы на основе железа, так как именно железные частицы обладают сильным ответом на магнитное поле.



- Я медведя поймал!
- Так веди его сюда!
- Не идёт.
- Так сам иди!
- Да он меня не пускает!

Частицы на основе железа можно разделить на две основные группы:

**Ферромагнитные:** основа частиц - железо (Fe).

Преимущества:

- очень хорошо собираются в магнитном поле

Недостатки:

- обладают остаточной намагниченностью (слипаются после снятия внешнего магнитного поля),

- химически нестабильны (железо, входящее в состав частиц, со временем окисляется, что приводит к растворению самого железа, а растворы с такими частицами окрашиваются в коричневый или темно-коричневый цвет).

**Суперпарамагнитные:** основа частиц - оксиды железа  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (маггемит) и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (магнетит).

Преимущества:

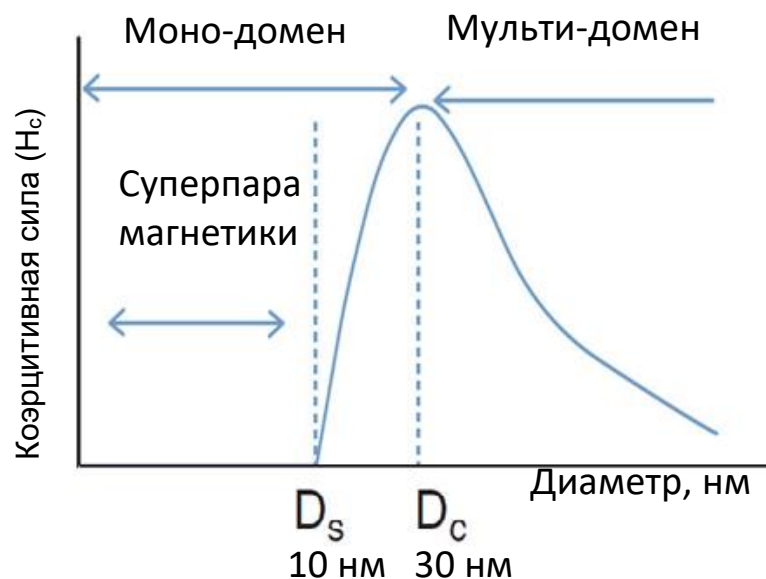
- не обладают остаточной намагниченностью (не слипаются после снятия внешнего магнитного поля и легко ресуспендируются),

- химически стабильны.

Недостатки:

- слабее собираются в магнитном поле по сравнению с ферромагнитными частицами.

В основе понятия «суперпарамагнитная частица» лежит принцип единичного домена. Единичный домен – это такая кристаллическая структура, которая обладает единым магнитным моментом. Единичный или моно-домен может существовать до определенного размера частиц. Именно такие частицы обладают тем, что можно назвать максимальной магнитизацией или максимальной коэрцитивной силой. С увеличением размера частицы в ней образуются несколько доменов и магнитизация частицы начинает уменьшаться.

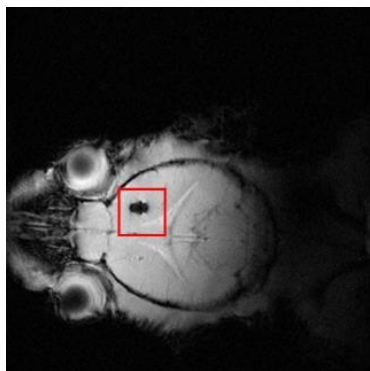


Этот график для кристаллической структуры  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  показывает, что уменьшение размера наночастиц (двигаемся по графику справа налево) увеличивает коэрцитивную силу  $H_c$  до критического размера. Между критическим размером ( $D_c$ ) и суперпарамагнитным порогом ( $D_s$ ) уменьшение размера наночастиц снижает коэрцитивную силу. Когда коэрцитивная сила достигает нуля, наночастица становится истинно суперпарамагнитной. Частицы с моно-доменом между критическим размером ( $D_c$ ) и суперпарамагнитным порогом ( $D_s$ ) также обладают суперпарамагнитными свойствами.

Таким образом, чтобы частица оставалась моно-доменной с максимальной магнетизацией, размер ее кристаллической структуры не должен превышать определенного порогового значения. Для  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  это размер 30 нм, для  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  это 40 нм. При помещении во внешнее магнитное поле эта частица развивает сильную внутреннюю намагниченность за счет обменного взаимодействия электронов внутри домена и, таким образом, является суперпарамагнитной.

Поскольку задействован только один домен, восприимчивость суперпарамагнитного вещества не так велика, как у ферромагнитного вещества. Кроме того, поскольку каждый домен находится в отдельной частице, в образце не может быть никаких взаимодействий или упорядочения доменов. Таким образом, в отличие от ферромагнетиков, суперпарамагнитные вещества не сохраняют никакой суммарной намагниченности после удаления внешнего поля. Другими словами, у них нет магнитной памяти.

Магнитные частицы меньше 30 нм, чаще всего от 5 до 10 нм, нашли широкое применение в Магнитно Резонансной Терапии (МРТ) или MRI (Magnetic Resonance Imaging).



Частицы покрывают специфическими антителами и вводят в кровоток. Частицы такого размера не фильтруются почками и могут циркулировать в кровотоке несколько суток. В процессе циркуляции частицы находят свой объект, связываясь со специфическим антигеном.

На приведенной фотографии, частицы связались на поверхности опухолевых клеток в мозгу.

Место скопления магнитных частиц визуализируется при помощи томографа.

Но, как уже было сказано выше, магнитные частицы меньше 30-40 нм обладают слабой магнитизацией. На практике это означает, что их будет очень сложно собирать магнитом. Поэтому для молекулярно-биологических приложений, где частицы нужно собирать, используют

частицы со структурой обладающей максимальной степенью магнитизации.

### **Функциональная поверхность**

Под функциональной поверхностью мы будем понимать то, что может выступать в качестве связывающего агента (или сорбента).

Частица сама по себе, даже без какого-либо покрытия, обладает собственной функциональной поверхностью, которая за счет особенностей своей кристаллической структуры, обладающей специфической электронной плотностью, может связывать и/или сорбировать различные вещества, такие как белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и много другого. В некоторых случаях взаимодействие имеет характер ковалентной связи, как в случае с SAMs (Self-Assembled Monolayers - Самособирающиеся монослои) или ионный, как с нуклеиновыми кислотами.

То, какой тип взаимодействия функциональной поверхности будет реализован - ковалентный или ионный – определяется целым рядом условий как физического (температура, давление), так и химического окружения (pH, реагент, в котором находится сорбент и связываемый объект в момент взаимодействия, химическая природа связываемого объекта, дополнительные компоненты в общей смеси и т.д.).

Если не понимать особенностей функциональной поверхности, может оказаться, что вы используете один вид сорбции вместо другого. Например, вместо ковалентной пришивки белок может сорбироваться на частицах за счет ионного взаимодействия. Такая достаточно распространенная ошибка выявляется позже при использовании, когда белок вместо надежной фиксации на поверхности десорбируется.

Создание функциональной поверхности – это главный элемент дизайна частицы.

Если вы сами не разрабатываете частицы для конкретной задачи, а покупаете готовые частицы (не в составе набора), вы всегда получаетекота в мешке.

«Почему? Как же так?» - спросите вы. Ответ прост и сложен одновременно.



Когда химик создает функциональную поверхность, он решает химическую задачу. Например, синтезировать силикатную оболочку или сделать поверхность с карбоксильными или аминогруппами и так далее. Каждый химик выбирает удобный и понятный ему способ синтеза. При этом, да, частица в результате получает тот

набор химических свойств, который так понятен любому химику, может быть измерен химическими и физическими методами анализа. Но всегда ли химические свойства поверхности соотносятся с возможностью применения конкретных частиц для молекулярно-биологических приложений? Нет, не всегда. Именно в этом источник тех проблем, с которыми сталкиваются большинство пользователей магнитных частиц.

### ***Влияние металлической структуры на свойства функциональной поверхности***

Это очень важный момент, который никак нельзя обойти.

Одинаковые ли свойства функциональной поверхности у немагнитной и магнитной силики?

Нет, не одинаковые. Это касается не только магнитных силикатных частиц, но также всех частиц, куда входит структура в виде железа или его оксидов.

Квантовая теория атомов в анализе молекул и их взаимодействии между собой показывает, что существуют взаимодействия между молекулами составляющими оболочку и наночастицами представляющими собой магнитное ядро. Взаимодействие определяется электронной плотностью всех атомов. В результате таких взаимодействий функциональная поверхность приобретает либо отрицательный, либо положительный электронный заряд. Сила заряда зависит от состава, структуры и толщины покрытия. Именно эти разнообразные вариации и создают отличия в свойствах частиц у разных производителей.

Таким образом, созданная функциональная поверхность на магнитных частицах будет иметь другие свойства, чем свойства автономной структуры, из которых создана поверхность.

### ***Специфические свойства частицы***

Как должна работать частица?

Она должна выполнять ту функцию, для чего она была создана.

Это значит, частицы для выделения нуклеиновых кислот должны выделять нуклеиновые кислоты, а не белки. Частицы для ковалентной иммобилизации должны ковалентно связывать пришиваемый белок, нуклеотидный зонд или другой объект, а не сорбировать его за счет ионного взаимодействия.

Свойства функциональной поверхности должны оставаться стабильными в течение заявленного производителем времени, в не меняться непредсказуемо.

И самое главное – частица и ее поверхность не должны разрушаться.

Как же можно узнать, соответствуют ли конкретные частицы тем задачам, для чего они были приобретены? Ответ – контроль и проверка каждой операции. Для правильного использования частиц нужно иметь понимание, что частицы должны делать и что делать не должны. Начинать нужно всегда с того, чего не должно быть. Так, проверка на неспецифическую сорбцию – обязательная процедура при работе с частицами, которые предполагается использовать в дальнейшем для ковалентной пришивки.

Тому, кто является пользователем, не имеет смысла глубоко погружаться в специфические тонкости. Лучшее решение - подобрать удовлетворяющий задаче набор с входящими в них частицами с подобранными под них буферами, отработанным протоколом и решить задачу минимальными усилиями.

Разработчику наборов предстоит большая экспериментальная работа.

Во-первых, предстоит решить, для каких задач вам нужны частицы.

Во-вторых, нужно выбрать отправную точку – частицы или предполагаемая готовая методика.

Если отправной точкой выбраны частицы, придется модифицировать методику под конкретные свойства частиц. Часто изменения могут быть существенными. Но и результат может быть впечатляющим.

Если начинать с методики, подбирая под нее частицы, скорее всего получится условно работающая система, которая будет работать в одних случаях и не работать в других. Останется только понять, где можно пользоваться такой системой, а где не стоит.

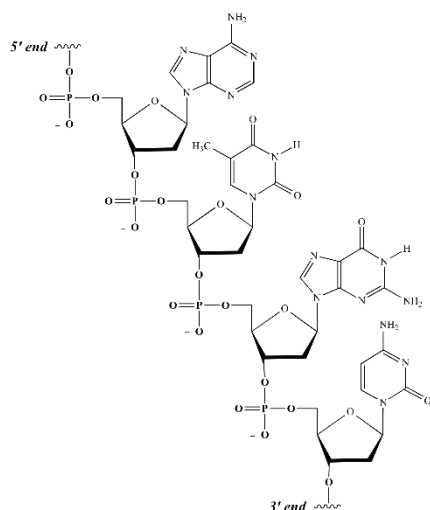
И в-третьих, посчитать все расходы и решить, а нужно ли этим вообще заниматься.

Рассмотрев основные понятия, связанные с магнитными частицами, перейдем к применению магнитных частиц для конкретных приложений.

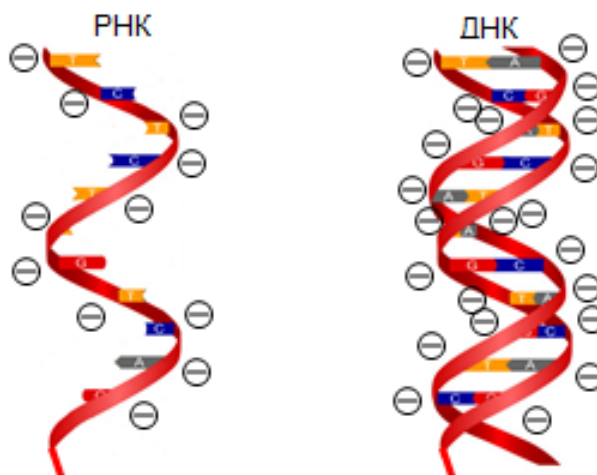
## Выделение нуклеиновых кислот

### Основные принципы

Нуклеиновые кислоты представляют из себя полимеры с отрицательным зарядом поверхности.



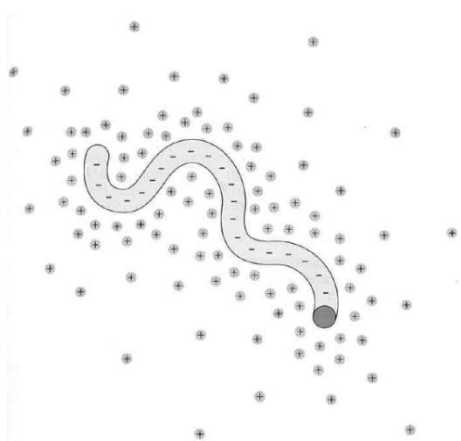
Фосфатные остатки обуславливают отрицательный заряд нуклеиновых кислот



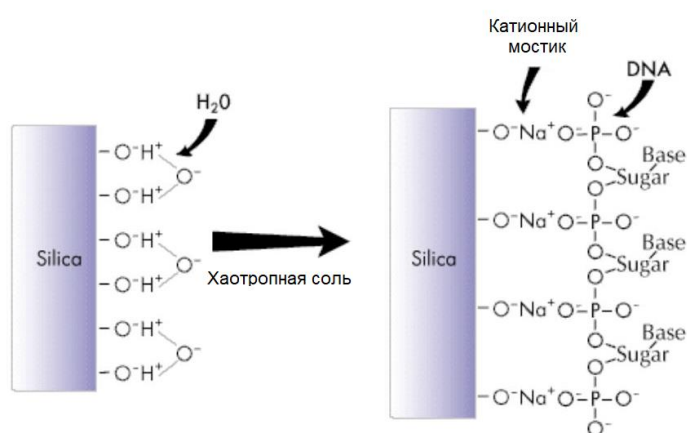
Отрицательный заряд РНК значительно слабее по сравнению с зарядом ДНК

Для того, чтобы связать отрицательно заряженный полимер нужна поверхность с противоположным зарядом. Но есть одна проблема – если поверхность будет иметь постоянный заряд, нуклеиновая кислота прочно свяжется на поверхности, и мы получим необратимую сорбцию.

Поэтому, чтобы создать управляемую сорбцию, используют соли, которые создают «шубу» из противоположного заряда на поверхности нуклеиновой кислоты и обеспечивают связывание с функциональной поверхностью. Чтобы ионы соли своим положительным зарядом могли выполнить роль мостика, функциональная поверхность также должна быть заряжена отрицательно.



Нуклеиновая кислота в присутствии соли приобретает положительный заряд

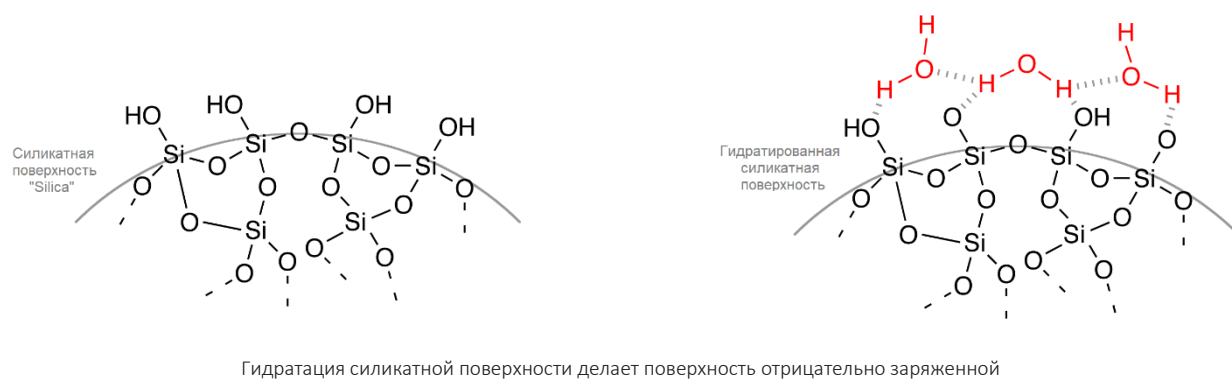


Наличие положительно заряженных ионов соли создает катионный мостик между отрицательными зарядами на поверхности и на нуклеиновой кислоте

Чтобы сделать сорбцию обратимой нужно удалить ионы соли (или уменьшить их концентрацию) и нуклеиновая кислота перестанет удерживаться поверхностью и будет десорбирована. Десорбция РНК из-за слабого заряда будет проходить легче, по сравнению с сильно заряженной ДНК.



Классически считается, что оптимальной поверхностью для обратимой сорбции нуклеиновых кислот является силика, или силикатная поверхность, или диоксид кремния.



Удобство силики заключается в том, что на сегодняшний день существует большое количество протоколов синтеза и исходных реагентов, которые позволяют получать силикатное покрытие разного качества и с разными свойствами.

Но следует отметить, что выделение нуклеиновых кислот возможно не только на силикатных частицах. Голые оксиды железа ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) обладают способностью адсорбировать ДНК, но агрегаты из-за сил притяжения уменьшают площадь поверхности, которая может быть использована для адсорбции. Частицы с карбоксильными группами также обладают способностью сорбировать ДНК в растворах, содержащих ПЭГ.

Модифицированные частицы магнитного феррита кобальта были исследованы на предмет выделения ДНК при высоких концентрациях хлорида натрия в присутствии ПЭГ. Описаны также другие модификации поверхности магнитных наночастиц для выделения нуклеиновых кислот.

И все же мы остановимся на применении частиц покрытых силикой, как наиболее применимых в действующих на сегодняшний день протоколах.

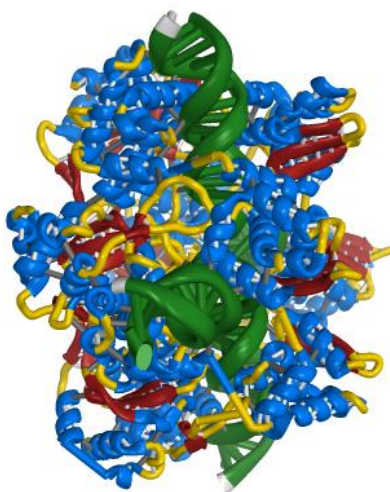
### Основные проблемы при выделении нуклеиновых кислот

Основные проблемы при выделении нуклеиновых кислот заключаются в том, при выделении нуклеиновых кислот выделяются не только нуклеиновые кислоты.



Нужно начать с того, что ни в одном образце, из которого выделяются нуклеиновые кислоты, они не находятся в свободном состоянии, как это изображают на картинках.

Нуклеиновые кислоты **всегда** связаны с белками, полисахаридами, липидами. Это очень сложные образования и полностью разрушить их в процессе выделения невозможно.



Комплекс ДНК с белками

Основная задача при выделении нуклеиновых кислот – добиться максимального отделения нуклеиновых кислот от других компонентов. В присутствии хаотропных солей белки своим зарядом экранируют нуклеиновые кислоты от связывания с поверхностью силики. Когда критическое количество белков удалено, происходит сорбция нуклеиновой кислоты с оставшимися на ее поверхности белками. Некоторая часть белков может быть удалена в процессе дополнительной отмывки после сорбции, но все еще значительное количество белков остается в комплексе с нуклеиновыми кислотами, связанными на поверхности частиц.

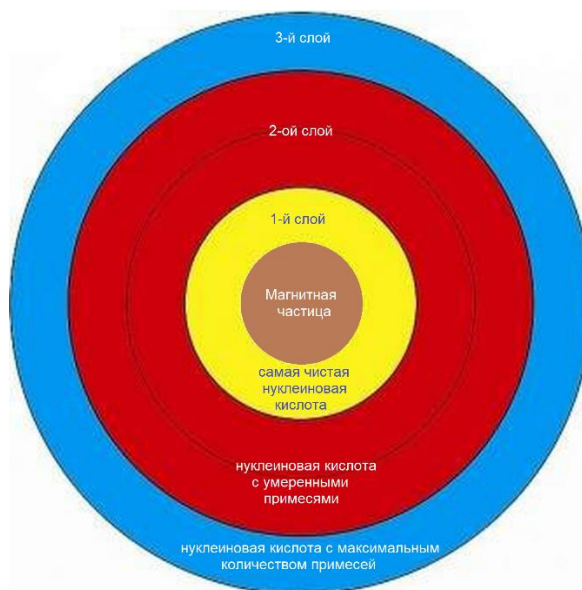
Далее идет элюция (десорбция). И вот получена условно чистая нуклеиновая кислота. Теперь все зависит от того, как она будет использоваться дальше.

Самый простой вариант – ПЦР. В процессе денатурации ДНК освобождается от большинства белков, а Taq-полимераза отлично выполняет свою работу даже в присутствии большого количества посторонних примесей. Сложнее, если нужно анализировать РНК. Стадия синтеза первой цепи кДНК – пристрастная проверка на наличие примесей. Эффективный отжиг праймера и работа обратной транскриптазы очень сильно зависят от концентрации магния. Присутствие примесей, связывающих магний, а также ингибирующих работу фермента, приводят к неэффективной наработке кДНК и, как следствие, низкой чувствительности в последующей ПЦР.

Есть несколько решений проблемы с образцом, в котором остались нежелательные примеси.

1. Повторить выделение, используя уже выделенный материал в качестве исходного. Повторное выделение иногда, но не всегда, позволяет удалить еще некоторое количество примесей. В случаях, когда комплекс белков и особенно полисахаридов с нуклеиновой кислотой прочный, повторное выделение может не помочь.
2. Развести образец (обычно, дистиллированной водой) от 4 до 10 раз.
3. Брать меньше образца в реакцию. Так, я настоятельно рекомендую после выделения на силикатных частицах брать в реакцию синтеза первой цепи не больше 1/8, лучше 1/10 от конечного объема реакционной смеси. Работает всегда. Попытка внести больше образца во всех случаях приводит к ухудшению результата вне зависимости от того, частицы какого производителя используются и несмотря на то, что рекомендует сам производитель (увы, не все производители тщательно проверяют свои рекомендации). Эта же рекомендация работает для ДНК, выделенной из крови, прошедшей несколько циклов заморозки-разморозки.

Большое значение для чистоты выделяемой нуклеиновой кислоты имеет количество частиц, которое используется при выделении. При работе с частицами существует такое правило: меньше частиц – чище выделение. Рассмотрим, почему это именно так.



Сорбция нуклеиновых кислот на магнитной частице

На рисунке схематически показано, как происходит сорбция нуклеиновых кислот на частице с силикатной поверхностью.

В первую очередь сорбируются нуклеиновые кислоты, имеющие наименьшее количество примесей и значит наибольший заряд для связывания с частицей (1-й слой, желтый цвет).

Затем сорбируются нуклеиновые кислоты, где примесей больше (2-й слой, красный цвет).

И наконец, самые «грязные» нуклеиновые кислоты (3-й слой, синий цвет).

В процессе правильно сделанной отмывки можно удалить «грязные» слои или примеси из этих слоев. Но самым эффективным будет использовать правильное соотношение магнитных частиц к количеству нуклеиновой кислоты в пробе.

Каждая частица имеет емкость, определяемая зарядом, который создается в тех или иных условиях на ее поверхности. Этот заряд позволяет связать определенное количество нуклеиновых кислот. Затем емкость частицы заканчивается и нуклеиновая кислота больше не может связаться на поверхности такой «заполненной» частицы.

Рассмотрим на очень условном примере, как работает правило по соотношению количества взятых частиц для получения чистой нуклеиновой кислоты.

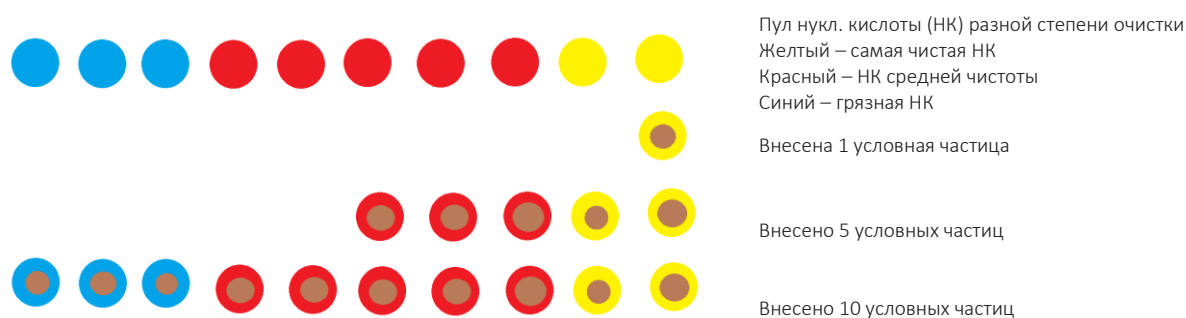


Схема показывающая, как работает принцип «меньше частиц – чище выделение»



В процессе выделения в образце всегда присутствуют нуклеиновые кислоты, в разной степени связанные с белками и другими примесями.

При недостатке частиц в первую очередь связываются наиболее чистые «сильно заряженные» нуклеиновые кислоты. Это определяется, как говорилось выше, особенностями заряда нуклеиновых кислот разной степени чистоты и зарядом частиц.

По мере увеличения количества вносимых частиц, свободные частицы начинают сорбировать то, что еще может сорбироваться.

Если продолжать вносить частицы, они начнут сорбировать уже откровенные примеси, так как даже нежелательные компоненты имеют заряд и могут сорбироваться на поверхности частиц.

Правильное решение – найти золотую середину между чистотой и количеством.

Такой подход работает, конечно, в тех условиях, когда количество нуклеиновой кислоты в пробе заведомо достаточно (избыточно) для последующего анализа. В случаях, когда количество нуклеиновой кислоты мало и она должна быть выделена полностью, следует брать минимальное количество частиц, которым еще удобно манипулировать во время процедуры выделения и очистки.

### ***Особенности выделения нуклеиновой кислоты из различных образцов***

#### ***Выделение ДНК и РНК из бактериальных клеток и клеточных культур***

Эффективность выделения из бактерий зависит от клеточной стенки. Как только клеточная стенка разрушена, дальнейшее выделение не представляет проблем. Универсальный способ разрушить любую клеточную стенку - вибрационная мельница для гомогенизации.

Выделение из клеточных культур является беспроблемным.

#### ***Выделение ДНК и РНК из плазмы***

Высокая концентрация белка в плазме сильно влияет на чистоту, особенно при выделении РНК.

#### ***Выделение ДНК и РНК из крови***

К высокой концентрации белка добавляется гемоглобин.

Гемоглобин хорошо связывается как с силикатными частицами, так и с нуклеиновой кислотой. При выделении ДНК и РНК из свежей крови гемоглобин чаще всего удаётся удалить.

Если кровь была однократно заморожена и хранилась при температуре ниже - 60 °С, то проблем с удалением гемоглобина тоже скорее всего не будет.

Проблемы начинаются с кровью, которая хранилась при температуре - 20 °С и выше, а также с кровью, которая несколько раз замораживалась и оттаивалась. В такой крови образуются прочные комплексы нуклеиновая кислота-белок-гемоглобин. В таких случаях получение чистой нуклеиновой кислоты является проблемой. Все зависит от свойств частиц и продуманности протокола.

#### ***Выделение ДНК и РНК из соскобов***

Основная проблема – находящиеся в образце гликопротеины (слизь). Гликопротеины очень хорошо сорбируются на силикатных частицах, если от них не избавляться, и мешают связыванию нуклеиновых кислот. Гликопротеины стандартно удаляются отмывкой с использованием солевого буфера типа PBS или TE, эпителиальные клетки собираются центрифугированием. Дальнейшее выделение беспроблемно.

#### ***Выделение ДНК и РНК из растений***

Для подготовки растительного образца лучше использовать вибрационную мельницу для гомогенизации. Следующая проблема – полисахариды и полифенолы. Избавиться от них или сильно уменьшить их концентрацию нужно до того, как будут добавлены силикатные частицы. В противном случае никакой сорбции нуклеиновых кислот не будет – все частицы будут покрыты полисахаридами и полифенолами.

## Выделение белков и антител

### Основные принципы

При выделении нуклеиновых кислот происходит неспецифическое выделение ДНК и РНК, содержащихся в образце. Анализ искомой последовательности происходит позже при помощи таких методов, как ПЦР, гибридизация, секвенирование и тому подобное. Конечно, есть редкие исключения, когда при помощи зондов выделяют уникальную последовательность.

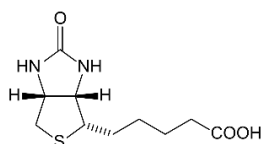
В отличие от выделения нуклеиновых кислот, при выделении белков сразу ставится задача получения конкретного белка. Решить такую задачу можно преимущественно методами классической иммунохимии.

Чтобы селективно изъять конкретный белок из пула других белков, требуется агент, способный избирательно связываться с данным белком. Такими агентами могут выступать:

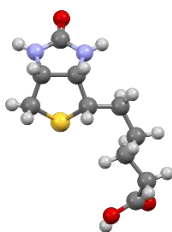
- антитела,
- другие молекулы или белки, избирательно связывающиеся с конкретным белком.

Если с антителами все более-менее понятно, то на другом варианте следует немного остановиться.

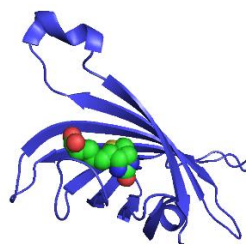
Самым распространенным примером избирательного взаимодействия белка с небелковой молекулой являются стрептавидин и биотин.



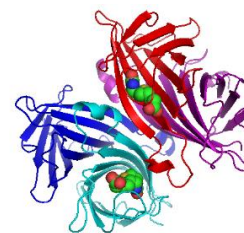
Структурная формула биотина



Шаростержневая модель биотина



Мономерный стрептавидин (ленточная диаграмма) со связанным биотином



Тетрамерная структура стрептавидина (ленточная диаграмма) с двумя связанными биотинами

Взаимодействие является высокоспецифичным, а его сила такова, что его можно отнести к категории необратимой сорбции. Разрушить это взаимодействие можно только в достаточно жестких условиях: инкубация в неионных водных растворах (не содержащих соли) при температуре выше 70 градусов. Такая процедура может эффективно нарушить взаимодействие без денатурации тетрамера стрептавидина. И биотин, и стрептавидин остаются активными после диссоциации, и поэтому обе молекулы можно использовать повторно.

Другими агентами, избирательно связывающимися с белками, могут быть:

- другие белки (не антитела) взаимодействующие с определенными доменами белка-мишени,
- субстраты, их аналоги, псевдосубстраты,
- органические и неорганические кофакторы (органические: напр. NAD, NADP, coenzyme A, витамины (тот же биотин) и многое другое; неорганические: металлические ионы и кластеры с их участием).

И многое другое, о чем я не знаю.

Чтобы агент мог связать белок, этот агент должен быть прочно прикреплен к функциональной поверхности. Фиксация агента на поверхности возможна путем ионной сорбции или ковалентной пришивки.

Выбор ионной сорбции нежелателен тем, что в процессе дальнейшей работы в связи с изменениями условий, в которых будет использоваться частица, связь сорбированного агента с поверхностью может ослабнуть и агент десорбируется.

Ковалентная пришивка позволяет крепко удерживать агент на поверхности. Еще одно преимущество ковалентной фиксации – возможность регенерации и многократного повторного использования частиц с пришитым агентом.

### ***Химические группы для ковалентной пришивки***

Для ковалентной пришивки функциональная поверхность может иметь различные доступные поверхностные функциональные группы. Самые используемые функциональные группы: карбоксил (-COOH), карбонил (-COH), amino (-NH<sub>2</sub>). Есть также другие группы, которые используются реже для специфических задач.

Выбор тех или иных функциональных групп определяется в первую очередь особенностью пришиваемого агента. Не всегда пришиваемый агент имеет доступную группу для химической пришивки (это касается и некоторых белков, третичная структура которых делает химические группы недоступными для использования). В таких случаях приходится использовать нековалентную фиксацию или модифицировать агент, создавая доступные для химического взаимодействия группы.

Нормальная практика, когда производитель предлагает протокол, в котором рекомендует, каким образом осуществить пришивку к функциональным группам конкретных частиц. Очень важно, чтобы этот протокол был отработан именно с данными частицами. Попытка воспользоваться протоколом одного производителя для частиц другого производителя может привести к неприятным последствиям. Причина обсуждалась в разделе *Влияние металлической структуры на свойства функциональной поверхности*.

Функциональные группы вместе с металлическим ядром создают специфические эффекты на функциональной поверхности. Это определяется в том числе плотностью и регулярностью функциональных групп. Все это находит отражение в поверхностном заряде частицы.

Перед тем, как делать ковалентную пришивку, необходимо проверить частицы на наличие неспецифической сорбции в рабочих буферах для пришивки. Для этого проведите инкубацию белка, предназначенного для пришивки, с частицами по протоколу, предусмотренному для пришивки, но без связывающего реагента. Если белок очень ценен, в качестве контрольного белка можно использовать бычий сывороточный альбумин. К сожалению, такой вариант проверки не работает с частицами с карбонильной группой (-COH), так как карбонильная группа напрямую связывается с доступным амином на поверхности белка.

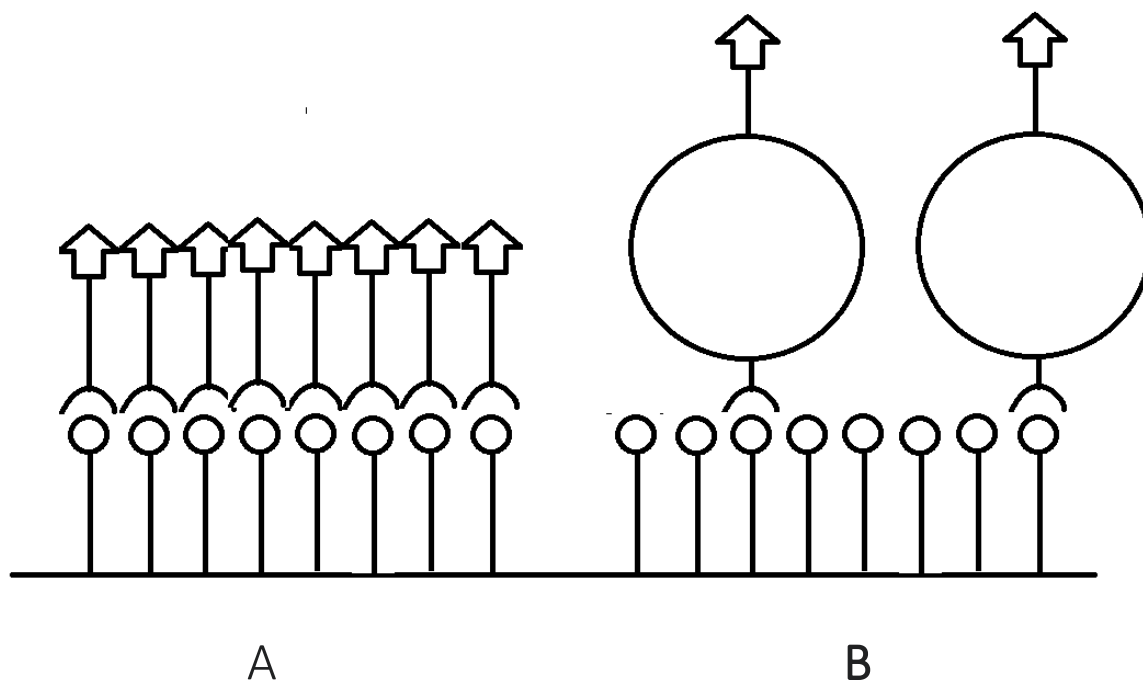
Если в результате проверки частицы демонстрируют больше 30% неспецифической сорбции от заявленной специфической емкости частиц, имеет смысл подобрать другой буфер для проведения реакции, использовать такие поверхностно-активные вещества как Tween 20 и Triton-X100.

Опасность неспецифической сорбции заключается в том, что неспецифически сорбированные белки выступают посредниками в образовании ковалентной связи с другими белками. Полученное соединение нестабильно удерживается на поверхности частицы и может десорбироваться при изменении условий.

### ***Плотность пришивки к поверхности***

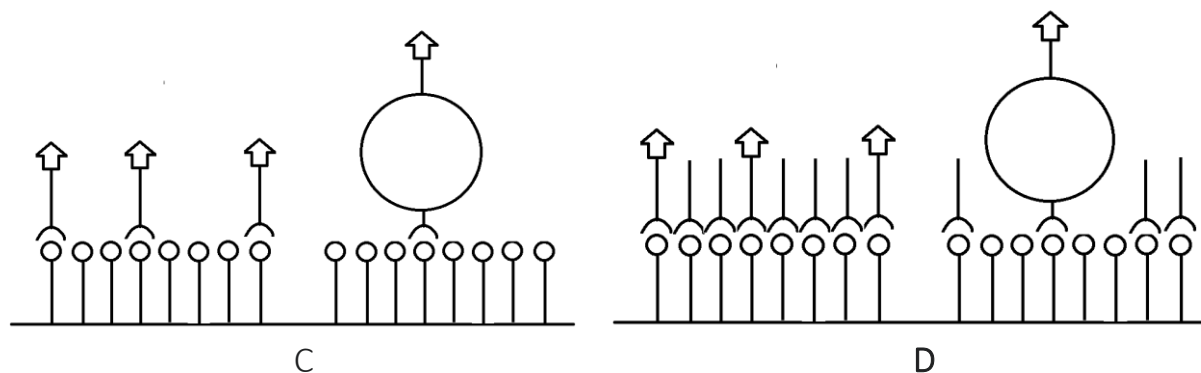
При синтезе частиц с функциональными группами каждый производитель исходит из собственных представлений, сколько функциональных групп и в каком виде они должны быть на поверхности. Обычно исходят из принципа – чем больше, тем лучше.

С одной стороны, такой подход позволяет максимально эффективно использовать функциональную поверхность. С другой стороны, пользователь должен обладать квалификацией и пониманием, как будет происходить пришивку агента к самой поверхности и как затем будет происходить взаимодействие пришитого агента с объектом, с которым он будет связываться.



Особенность пришивки к функциональным группам с плотной посадкой  
 А – пришивка агента, имеющего компактную структуру, В – пришивка агента с объемной структурой

Как видно на приведенном выше рисунке, плотное расположение функциональных групп на поверхности имеет преимущество в том случае, если пришиваемый агент имеет компактную структуру (например, молекула биотина). Но даже в этом случае могут возникнуть стерические проблемы с плотно пришитым агентом. В случае, если структура пришиваемого агента имеет большие размеры (например, белки), при пришивке могут возникнуть стерические проблемы, которые снизят эффективность пришивки.



Регулирование плотности пришивки  
 С - регулирование плотности пришивки за счет снижения концентрации пришиваемого реагента  
 D - регулирование плотности пришивки за счет использования нейтрального связывающегося агента

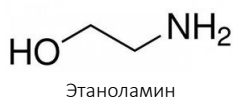
В некоторых случаях производители синтезируют частицы с различной плотностью функциональных групп на поверхности. Тогда выбор делается на основании конечного функционального использования частиц с пришитым агентом.

В случае максимально плотного расположения функциональных групп на поверхности решить проблему плотности пришивки можно двумя способами:

1. за счет снижения концентрации пришиваемого реагента исходя из заявленной емкости частиц используется оптимальное для последующих целей количество пришиваемого агента, меньшее, чем заявленная емкость

## 2. за счет использования нейтрального агента

пришиваемый агент смешивается в оптимальных пропорциях с нейтральным агентом, который тоже будет пришит, и полученная смесь используется для окончательной пришивки (например, для «разряженной» пришивки на частицы с карбонильной группой (-COH) можно использовать этаноламин).



Этаноламин за счет аминогруппы реагирует с активными карбонильными группами. Таким образом на поверхности вместо карбонильной группы образуется нейтральная гидроксильная группа.

Нейтральный агент выбирается индивидуально в каждом конкретном случае под конкретное использование.

### **Свойства пришитого агента**

Свойства агента после пришивки могут меняться. То или иное изменение свойств происходит в большинстве случаев.

В случае с небелковыми молекулами это связано с распределением электронных плотностей, о котором говорилось выше. При пришивке белков может происходить критическое структурное изменение белка, приводящее к частичной или полной потере белком функциональных свойств.

### **Выделение белков при помощи пришитых антител**

Я рекомендую напрямую пришивать антитела к поверхности, только в исключительных случаях, когда их много, и они дешевые.

В противном случае лучше воспользоваться частицами с белком А или G. Эти белки связывают антитела таким образом, что антиген узнающий участок антитела всегда остается свободным. Таким образом, функциональность антител полностью сохраняется. Для того, чтобы комплекс белка А или G с антителом не диссоциировал при диссоциации связавшегося с антителами белка, можно воспользоваться реагентом BS3 (bis(sulfosuccinimidyl)suberate), разработан фирмой Pierce и продается фирмой Thermo Scientific. BS3 является гомобифункциональным, водорастворимым, нерасщепляемым и непроницаемым для мембран амин-аминым сшивающим линкером. Сшитый при помощи него комплекс белка А или G с антителом можно считать единой структурой для выделения специфического белка. Комплекс не разрушается даже после многократного использования в процедурах связывания с белком и последующей диссоциации.

## **В качестве заключения**

*«В Хогвартсе тот, кто просит помощи, Гарри, всегда её получает.»*

*Джоан Кэтлин Роулинг*

*Гарри Поттер и Дары Смерти. Часть 2.*

Работа с магнитными частицами лишь на первый взгляд кажется простой. При использовании частиц есть много нюансов и подводных камней, незнание которых может привести к разочарованию.

Мой совет – не бойтесь спрашивать.

Какие-то ответы можно найти в интернете или у тех, кто по характеру работы должен быть в курсе. Но самый лучший способ – позвонить и спросить того, кто этим непосредственно занимается.

Спрашивайте Силекс. Нам всегда есть что рассказать.