

Immobilizacja białek na powierzchni cząstek magnetycznych

Przedmowa

Zestaw umożliwia przeprowadzenie reakcji kowalencyjnego wiązania białka na powierzchni magnetycznych cząstek. Pozwala na:

- izolację unikalnych komórek lub białek z roztworu,
- zwiększenie efektywności izolacji w stosunku do tradycyjnie stosowanych metod.

Porównanie metody kowalencyjnego wiązania białek i pasywnej metody adsorpcyjnej:

- Kowalencyjne wiązanie białka pozwala na związanie powierzchniowo od 20-40% więcej białka niż w przypadku standardowych procedur izolacji.
- Kowalencyjne wiązanie pozwala na normalizację i ujednoczenie otrzymanych cząstek, z określonym poziomem pokrycia magnetycznych cząstek.
- Kowalencyjne wiązanie białka podnosi jego stabilność. Po 1 min inkubacji w temp. 56°C ilość IgG kowalencyjnie związana z nośnikiem pozostaje praktycznie niezmienna – około 100%, natomiast w metodzie adsorpcyjnej zostaje związane tylko 50-70%.
- W przypadku immobilizacji małych białek tylko metoda kowalencyjnego wiązania umożliwia immobilizację ich na powierzchni.
- Białka kowalencyjnie związane na powierzchni magnetycznych cząstek są bardziej odporne na warunki reakcji, zmniejsza się również ilość niespecyficznych reakcji z innymi białkami.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu, pozwalają na przeprowadzenie **5 reakcji immobilizacji po 400-600 µg** białka, wg poniższej procedury.

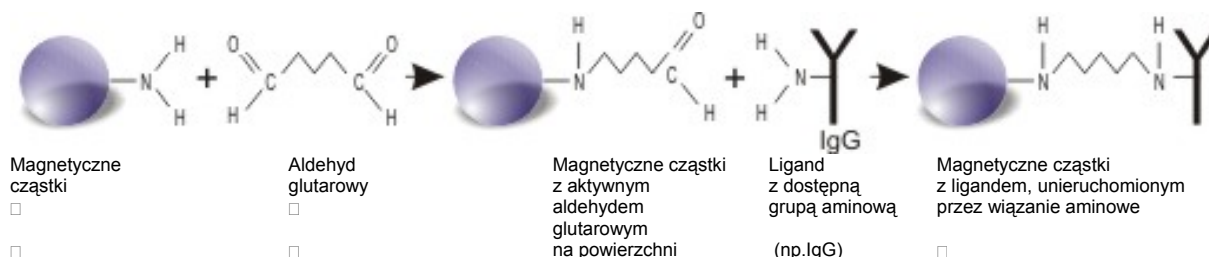
Skład zestawu:

<u>Magnetyczne cząstki, 50 mg/mL</u>	<u>1 mL</u>
<u>Bufor fosforanowy, 0.1 M, pH 7.4</u>	<u>10 mL</u>
<u>Aldehyd glutarowy, 50%</u>	<u>5 mL</u>
<u>Azydek sodu, 1%</u>	<u>200 µl</u>
<u>Bufor terminujący</u>	<u>5 mL</u>
<u>Bufor dla immobilizacji</u>	<u>5 mL</u>
<u>Woda destylowana</u>	<u>10 mL</u>

Przechowywanie: **+4 °C**

Protokół immobilizacji:

(Opisana procedura w protokole reakcji obliczona jest przede wszystkim dla immobilizacji immunoglobulin IgG. Wykorzystanie protokołu w celu immobilizacji innych białek niż immunoglobuliny może wymagać optymalizacji metody pod względem ilości użytego białka.)



1. Do 2 mL próbówki dodać następujące składniki reakcji
(magnetyczne cząstki przed użyciem dokładnie zwiesić w roztworze):

- woda destylowana	50 μ l
- 0.1 M bufor fosforanowy, pH 7,4	250 μ l
- aldehyd glutarowy, 50%	500 μ l
- magnetyczne cząstki, 50 mg/mL	200 μ l

 Dokładnie wymieszać zawartość próbówki przez pipetowanie.
2. Inkubować próbówkę w czasie 3 godz., w temperaturze pokojowej i przy stałym mieszaniu. *
3. Przygotować 3 mL 0,025 M buforu fosforanowego do przemywania magnetycznych cząstek (2250 μ l wody destylowanej + 750 μ l 0,1 M buforu fosforanowego).
4. Ulokować próbówkę z magnetycznymi cząstkami w statywie, aby pozwolić na ich sedymentację pod wpływem działania magnesu; następnie zlać supernatant.
5. Wykorzystując magnetyczny statyw przemyć cząstki 3-krotnie stosując po 1 mL 0,025M buforu fosforanowego.
6. W nowej 2 mL próbówce przygotować roztwór białka przez rozpuszczenie 500 μ g białka w 500 μ l **buforu do immobilizacji**. Pobrać 10 μ l przygotowanego roztworu do oddzielnej próbówki dla pomiaru efektywności procesu immobilizacji.
7. Do próbówki z magnetycznymi cząstkami dodać 250 μ l wody destylowanej i 250 μ l 0,1 M buforu fosforanowego. Dokładnie wymieszać zawartość próbówki przez pipetowanie.
8. Przenieść zawiesinę poddanych działaniu aldehydu glutarowego magnetycznych cząstek do próbówki z unieruchomionym białkiem. Dokładnie wymieszać zawartość próbówki poprzez pipetowanie.
9. Inkubować próbówkę w czasie 2 godzin, w temperaturze pokojowej i przy stałym mieszaniu.* Po zakończeniu inkubacji ulokować próbówkę w magnetycznym statywie, a następnie po sedymentacji cząstek pobrać 20 μ l supernatantu w celu dalszego pomiaru efektywności immobilizacji.
10. Do próbówki dodać 500 μ l **buforu terminującego** w celu zablokowania nieużywanych, ale ciągle aktywnych grup na powierzchni magnetycznych cząstek.
11. Inkubować próbówkę następnie 2 godziny w temperaturze pokojowej i przy stałym mieszaniu.* Po inkubacji ulokować próbówkę z magnetycznymi cząstkami w statywie, możliwie najdokładniej zlać supernatant. Dodać 1 mL buforu PBS i dokładnie zmieszać zawartość próbówki przez pipetowanie.
12. Ponownie ulokować próbówkę z magnetycznymi cząstkami w statywie, możliwie najdokładniej zlać supernatant. Powtórzyć 5-krotnie przemywanie cząstek przy pomocy PBS. Po zakończeniu płukania zawiesić cząstki w 1 mL buforu PBS. Dodać 20 μ l 1% azydku sodu w celu eliminacji ryzyka przypadkowego zakażenia.

Dodatkowa informacja

Mieszanie cząstek

* Mieszanie nie powinno być zbyt intensywne. Nie zaleca się wykorzystania wortexu lub ultradźwięków do mieszania cząstek magnetycznych. W przypadku braku mieszadła można regularnie (w przybliżeniu, co ok. 5-10 min.) odwracać probówkę.

Ilość aldehydu glutarowego

Etap z aldehydem glutarowym jest kluczowy dla procesu immobilizacji białka i warunkuje optymalną wydajność reakcji immobilizacji białka na powierzchni cząstek magnetycznych.

Zbyt mała ilość aldehydu prowadzi do powstania krzyżowych reakcji pomiędzy grupami aktywowanymi i tymi, które nie zostały aktywowane. Ilość dodanego aldehydu glutarowego powinna wystarczyć do pełnego nasycenia powierzchni cząstek magnetycznych. Bardzo ważny jest również sposób, w jaki podaje się ligand. Jeżeli nie jest to przeprowadzone optymalnie, efektywność immobilizacji raptownie obniża się.