Lumiprobe
Life science solutions

Инструкция к наборам для флуоресцентного мечения антител

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к наборам для флуоресцентного мечения антител 3-10

RU

Инструкция к наборам для флуоресцентного мечения антител

Наборы позволяют быстро ввести флуорофоры (флуоресцентные красители) в состав антитела (2–3 метки на 1 молекулу белка). В набор входят компоненты для проведения 10 реакций × 100 мкг антитела. Принцип действия основан на использовании сукцинимидного эфира красителя (берется в избытке), который в слабощелочной среде реагирует со свободными аминогруппами антитела (N-концевой аминогруппой, аминогруппой на лизине). Последующая очистка антитела от непрореагировавшего реагента производится гель-фильтрацией на микроколонках (входят в набор).

Состав набора

Компонент набора	Количество						
	1321-10гхп 10 реакций	3321-10гхп 10 реакций	7321-10гхп 10 реакций	5321-10гхп 10 реакций	6321-10гхп 10 реакций	1821-10гхп 10 реакций	6821-10гхп 10 реакций
N1320, sulfo-Cyanine3 NHS-эфир, 1 гхп	10	—	—	—	—	—	—
N3320, sulfo-Cyanine5 NHS-эфир, 1 гхп	—	10	—	—	—	—	—
N7320, sulfo-Cyanine5.5 NHS-эфир, 1 гхп	—	—	10	—	—	—	—
N5320, sulfo-Cyanine7 NHS-эфир, 1 гхп	—	—	—	10	—	—	—
N6320, sulfo-Cyanine7.5 NHS-эфир, 1 гхп	—	—	—	—	10	—	—
N1820, AF 488 NHS-эфир, 1 гхп	—	—	—	—	—	10	—
N2825, AF 594 NHS-эфир, 1 гхп	—	—	—	—	—	—	10
16115, Desalting receptacle vial, 1.5 mL, 10 pcs	1	1	1	1	1	1	1
18115, Desalting spin column with waste vial, 10 pcs	1	1	1	1	1	1	1
11125, PBS tablet, for 100 mL of buffer, 1 pcs	1	1	1	1	1	1	1
15050, ДМСО (диметилсульфоксид) для мечения, 1 mL	1	1	1	1	1	1	1
1584-05mL, Раствор азида натрия, 3%, 0.5 mL	1	1	1	1	1	1	1
1689-15mL, Гидрокарбонат натрия, 126 mg	1	1	1	1	1	1	1

Хранить при температуре от +4°C до +20°C. Не замораживать! Транспортировка:

до трех недель при комнатной температуре. Избегайте хранения на свету. Берегите от влаги.

Срок хранения 12 месяцев.

Протокол

1. Подготовка антитела

Препарат антитела не должен содержать примеси свободных аминокислот или других белков, например, БСА, а также компонентов буферных растворов с pH 2–7,5 или 9–12. Если антитело находится в буферном растворе с pH 8–8,5 (на основе бикарбоната натрия или Tris-HCl) и гарантированно не содержит других примесей, его можно использовать в реакции без дополнительной очистки. Если вы не уверены, что препарат антитела не содержит примесей, то обязательно проведите процедуру очистки. Для очистки антитела (при необходимости) рекомендуется использовать один из следующих методов: диализ, гель-фильтрация или ультрафильтрация на колонках, с использованием 0,1 М раствора гидрокарбоната натрия*.

Оптимальные условия для проведения мечения антитела: концентрация антитела 1 мг/мл в растворе 0,1 М гидрокарбоната натрия без посторонних примесей. Присутствие консервирующего агента азида натрия в растворе антитела (до концентрации 0,04%) не оказывает влияния на реакцию.

Если концентрация антитела ниже 1 мг/мл, то ее необходимо довести до 1 мг/мл с помощью концентрирования (ультрафильтрацией) и последующего разбавления. Для полной очистки от возможных примесей рекомендуется провести два цикла концентрирования/разбавления. После каждого концентрирования антитело разбавляется 0,1 М гидрокарбонатом натрия.

Если концентрация антитела выше 1 мг/мл, перед разбавлением рекомендуется провести его однократную промывку на колонке для ультрафильтрации с помощью 0,1 М гидрокарбоната натрия. Для полной очистки от возможных примесей

рекомендуется провести два цикла концентрирования/разбавления. После промывки антитело разбавляется 0,1 М гидрокарбонатом натрия.

Концентрацию антитела рекомендуется контролировать спектрофотометрически (для этих целей лучше всего подходит бескюветный спектрофотометр).

Стоит отметить, что концентрация антитела в реакционной смеси влияет на степень мечения. Например, при постановке реакции со 100 мкг антитела в объеме менее 100 мкл будет получено модифицированное антитело со степенью мечения до 4–5 молекул красителя на антитело. При постановке реакции со 100 мкг антитела в объеме, большем 100 мкл, будет получено модифицированное антитело со степенью мечения 0,3–1 молекул красителя на антитело.

* Для приготовления 0,1 М гидрокарбоната натрия необходимо к содержимому пробирки с сухим гидрокарбонатом натрия, входящей в состав набора, добавить 15 мл деионизированной воды.

2. Постановка реакции

2.1. В пробирку с лиофилизованным флуорофором (флуоресцентным красителем) добавьте раствор антитела в 0,1 М гидрокарбонате натрия (рекомендуемые количества — 100 мкг** антитела в 100 мкл), перемешайте на вортексе до полного растворения реагента и инкубируйте 30 мин при комнатной температуре.

** Если необходимо провести реакцию с меньшим количество антитела, необходимо развести лиофилизованный реагент в 10 мкл безводного ДМСО и взять для реакции по 1 мкл раствора на каждые 10 мкг антитела. Раствор реагента в ДМСО не подлежит хранению.

3. Очистка антитела от избытка реагента

3.1. Предварительно растворите таблетку буфера PBS в 100 мл воды.

3.2. Подготовьте колонку. Убедитесь, что колонка имеет комнатную температуру. Сорбент ресуспендируйте на вортексе. Снимите с колонки колпачки, поместите ее в пробирку для сбора жидкости и центрифугируйте получившуюся конструкцию 2 мин при 1000 *g* (необходимо строго соблюдать установленную скорость; для стандартного ротора радиусом 6 см, 1000 *g* соответствует 3800 об/мин; при центрифугировании необходимо соблюдать ориентацию колонки в роторе: выступ

на верхней части колонки должен быть направлен от центра ротора). После центрифугирования удалите фильтрат.

3.3. Нанесите на колонку 400 мкл буфера PBS, центрифугируйте 2 мин при 1000 *g*. После центрифугирования удалите фильтрат. Перенесите колонку в 1,5 мл пробирку для сбора антитела, входящую в набор.

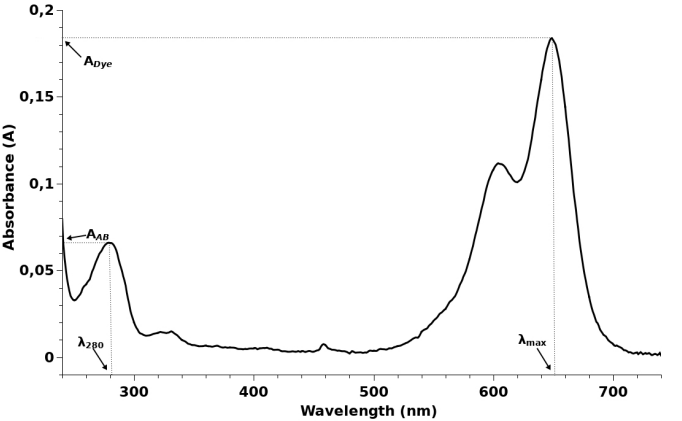
3.4. Нанесите в центр колонки 100 мкл*** реакционной смеси, инкубируйте 1 мин, центрифугируйте в течение 2 мин при 1000 *g*. В пробирке соберется очищенное антитело****.

*** Для очистки на колонку можно наносить от 50 до 100 мкл. Если реакция проводилась в меньшем объеме, рекомендуется после реакции довести объем препарата минимум до 50 мкл путем добавления буфера PBS.

**** После центрифугирования к препарату антитела можно добавить раствор азида натрия (имеется в наборе) в объеме 1% от объема препарата. При необходимости препарат антитела можно разделить на аликвоты по мере центрифугирования. В этом случае аликвоту, с которой ведется работа, следует хранить при +4°C, остальные аликвоты — при -20°C. При +4°C допустимо хранить только те растворы, в которые добавлен азид натрия.

4. Контроль количества флуорофоров, прореагировавших с антителом

Для того чтобы вычислить степень мечения (число молекул флуорофора, введенных на 1 молекулу антитела), необходимо измерить оптическую плотность раствора при длине волны 280 нм (A_{AB}) и длине волны максимума поглощения красителя (A_{Dye}). Типичный вид спектра поглощения показан на рисунке.
В зависимости от красителя длина волны максимума его поглощения может меняться.



В спектре поглощения меченого антитела присутствует пик красителя (длинноволновый), и пик поглощения антитела (~280 нм). Число молекул флуорофора на 1 молекулу антитела рассчитывается по формуле:

$$\frac{Dye}{AB} = \frac{A_{Dye} \times \varepsilon_{AB}}{\left(A_{AB} - A_{Dye} \times CF\right) \times \varepsilon_{Dye}}$$

где **Dye/AB** — искомое число молекул красителя на молекулу антитела, $\mathbf{A_{Dye}}$ — оптическая плотность образца на длине волны максимума поглощения красителя, $\mathbf{A_{AB}}$ — оптическая плотность образца на длине волны 280 нм, ε_{AB} — мольный коэффициент экстинкции антитела на длине волны 280 нм (для IgG — 210000), ε_{Dye} — мольный коэффициент экстинкции красителя на длине волны максимума поглощения (берется из таблицы ниже), $\mathbf{CF_{280}}$ — фактор коррекции для красителя на длине волны 280 нм (берется из таблицы ниже).

Краситель	λ_{max}, нм	ε	CF_{280}
sulfo-Cyanine3	548	162 000	0.06
sulfo-Cyanine5	646	271 000	0.04
sulfo-Cyanine5.5	673	195 000	0.11
sulfo-Cyanine7	750	240 600	0.04
sulfo-Cyanine7.5	778	222 000	0.09
AF 488	495	71 800	0.10
AF 594	586	105 000	0.51

Пример расчета

В ходе реакции мечения IgG красителем sulfo-Cyanine5 после очистки был получен препарат, имеющий спектр поглощения на рисунке выше. Определить степень мечения антитела.

По спектру поглощения находим $\mathbf{A_{Dye}}$ = 0,184 на длине волны максимума поглощения красителя (646 нм, см. таблицу), $\mathbf{A_{AB}}$ = 0,066 (на длине волны 280 нм). $\boldsymbol{\varepsilon_{AB}}$ = 210000 для IgG, из таблицы берем $\boldsymbol{\varepsilon_{Dye}}$ = 271000 и $\mathbf{CF_{280}}$ = 0,04.

$$\frac{Dye}{AB}=\frac{A_{Dye}\times\varepsilon_{AB}}{(A_{AB}-A_{Dye}\times CF)\times\varepsilon_{Dye}}=\frac{0.184\times210\,000}{(0.066-0.184\times0.04)\times271\,000}=2.43$$

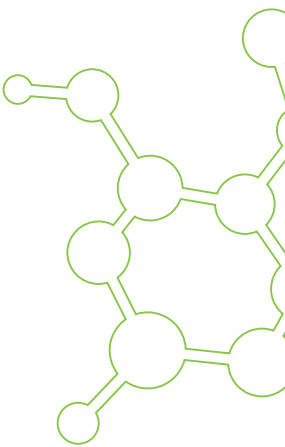
Dye/AB — искомое число молекул красителя на молекулу антитела — составляет 2,43 молекулы флуорофора на антитело.

Интерпретация результатов и хранение антител

Оптимальная степень мечения для получения хорошего флуоресцентного сигнала составляет в большинстве случаев 2–3 молекулы красителя на молекулу антитела. Дальнейший рост степени мечения не приводит к существенному усилению флуоресцентного сигнала, поскольку наблюдается концентрационное тушение флуоресценции. Если степень мечения недостаточна, необходимо уменьшить количество антитела, вводимого в реакцию. Низкая степень мечения может быть связана с использованием набора с истекшим сроком годности.

Антитела после мечения желательно протестировать на предмет их связывания с субстратом. Хранить меченые антитела можно при -20°C. Аликвоту, с которой ведется работа, необходимо хранить при +4°C во избежание многократного замораживания-оттаивания. Стабильность конъюгатов определяется стабильностью самого антитела, а не флуорофора. Не следует хранить меченые антитела на прямом солнечном свету, однако они вполне совместимы с комнатным освещением.

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com