

Инструкция к наборам для
флуоресцентного мечения антител

Contents

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

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						
	1321-10гкл 10 реакций	3321-10гкл 10 реакций	7321-10гкл 10 реакций	5321-10гкл 10 реакций	6321-10гкл 10 реакций	1821-10гкл 10 реакций	6821-10гкл 10 реакций
N1320, sulfo-Cyanine3 NHS-эфир, 1 гкл	10	—	—	—	—	—	—
N3320, sulfo-Cyanine5 NHS-эфир, 1 гкл	—	10	—	—	—	—	—
N7320, sulfo-Cyanine5.5 NHS-эфир, 1 гкл	—	—	10	—	—	—	—
N5320, sulfo-Cyanine7 NHS-эфир, 1 гкл	—	—	—	10	—	—	—
N6320, sulfo-Cyanine7.5 NHS-эфир, 1 гкл	—	—	—	—	10	—	—
N1820, AF 488 NHS-эфир, 1 гкл	—	—	—	—	—	10	—
N2825, AF 594 NHS-эфир, 1 гкл	—	—	—	—	—	—	10
A1115, Desalting spin column, PBS, 1 pcs	10	10	10	10	10	10	10
Пробирка приемная для обессоливания, 1.5 мл	10	10	10	10	10	10	10
Пробирка приемная без крышки, 2 мл	10	10	10	10	10	10	10
Таблетка PBS, на 100 мл буфера	1	1	1	1	1	1	1
15050, ДМСО (диметилсульфоксид) для мечения, 1 mL	1	1	1	1	1	1	1
1584-05mL, Раствор азиды 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!

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 азиды 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 бесцветный 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 лиофилизированным 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 количеством антитела, необходимо развести лиофилизированный 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****.

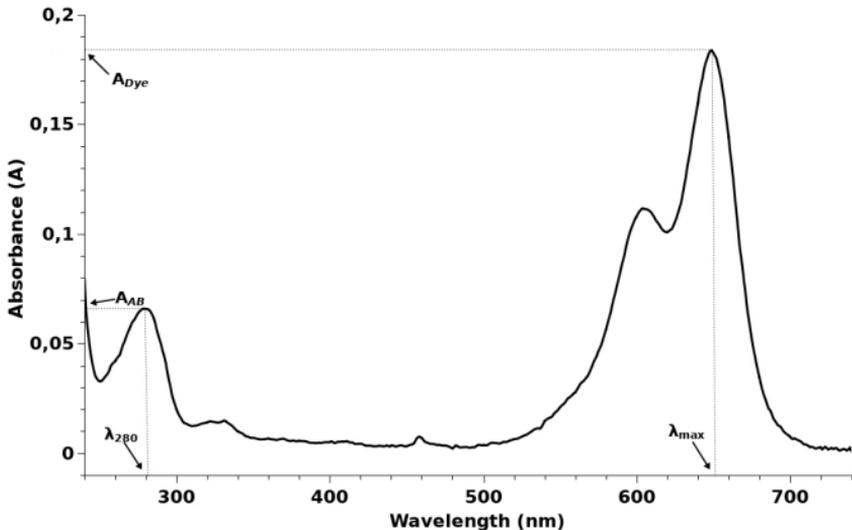
*** Для очистки на колонку можно наносить от 50 до 100 мкл. Если реакция проводилась в меньшем объеме, рекомендуется после реакции довести объем препарата минимум до 50 мкл путем добавления буфера PBS.

**** После центрифугирования к препарату антитела можно добавить раствор азид 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_{280}) и длине волны максимума поглощения красителя ($A_{\text{дye}}$). 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:

$$\frac{Dye}{AB} = \frac{A_{Dye} \times \epsilon_{AB}}{(A_{AB} - A_{Dye} \times CF) \times \epsilon_{Dye}}$$

где **Dye/AB** — искомое число молекул красителя на молекулу антитела, **A_{Dye}** — оптическая плотность образца на длине волны максимума поглощения красителя, **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), **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 $A_{\text{Dye}} = 0,184$ на длине волны максимума поглощения красителя (646 нм, см. таблицу), $A_{\text{AB}} = 0,066$ (на длине волны 280 нм). $\epsilon_{\text{AB}} = 210000$ для IgG, из таблицы берем $\epsilon_{\text{Dye}} = 271000$ и $CF_{280} = 0,04$.

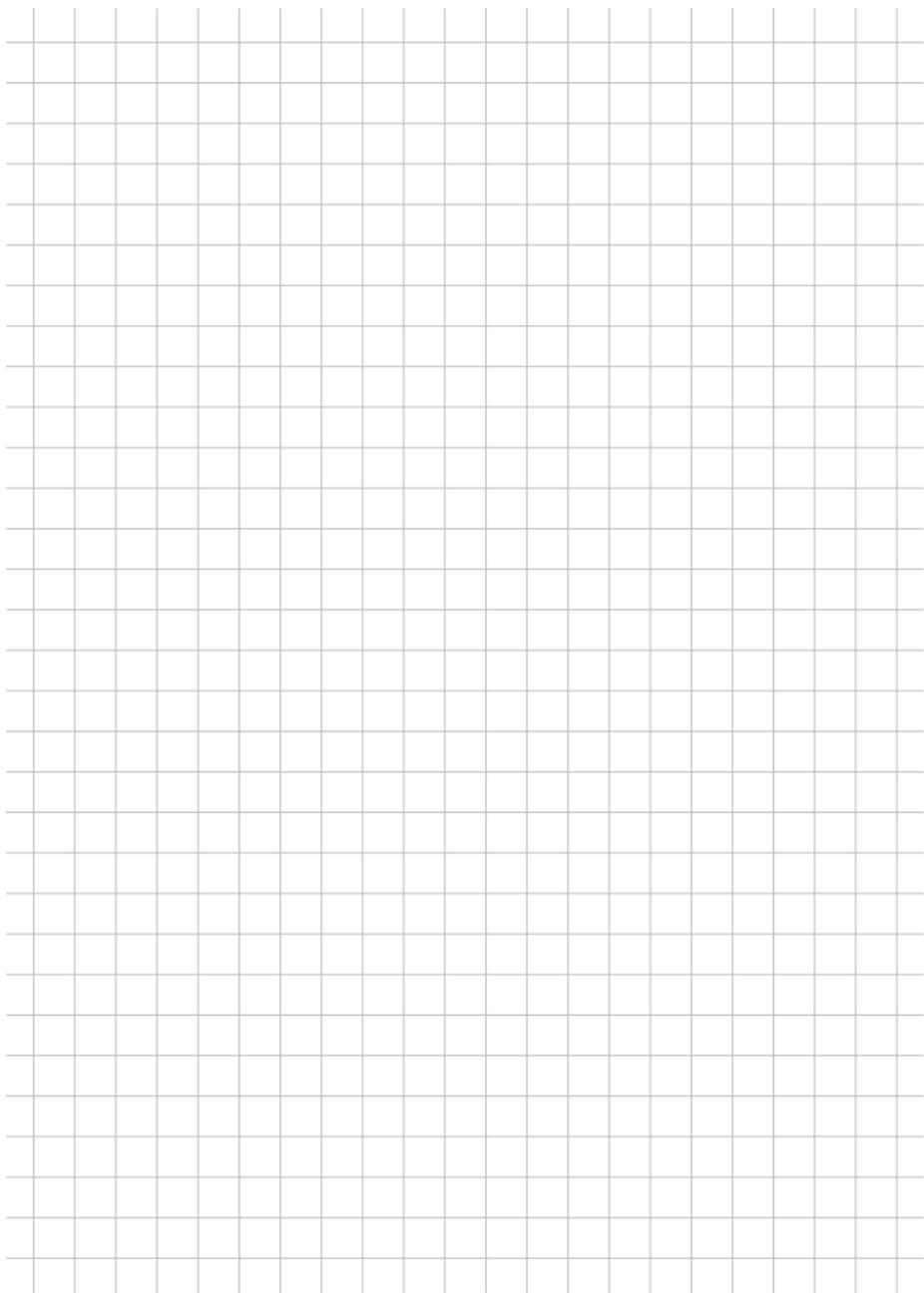
$$\frac{Dye}{AB} = \frac{A_{Dye} \times \epsilon_{AB}}{(A_{AB} - A_{Dye} \times CF) \times \epsilon_{Dye}} = \frac{0.184 \times 210\,000}{(0.066 - 0.184 \times 0.04) \times 271\,000} = 2.43$$

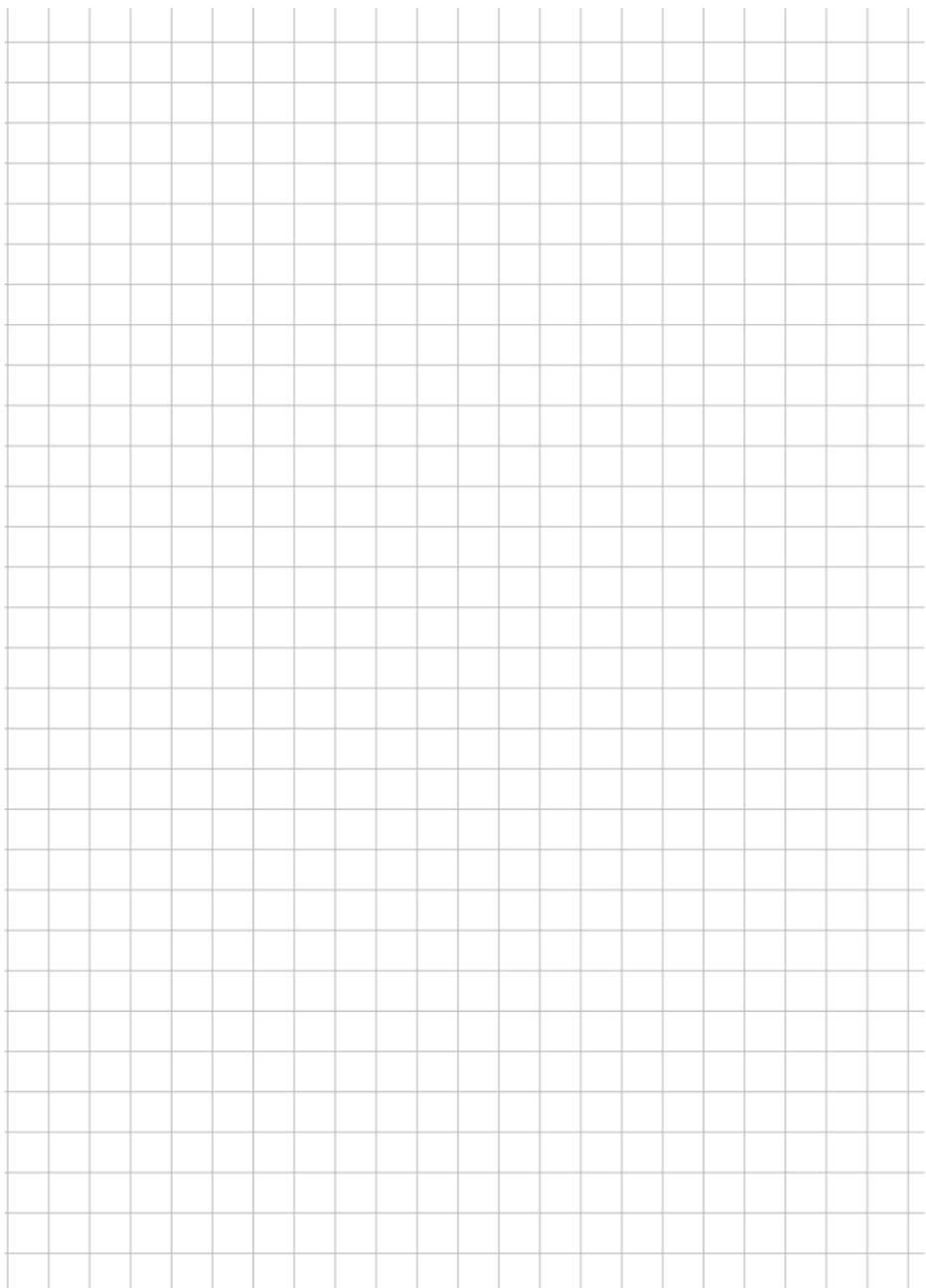
Dye/AB — искомое число молекул красителя на молекулу антитела — составляет 2,43 молекулы флуорофора на антитело.

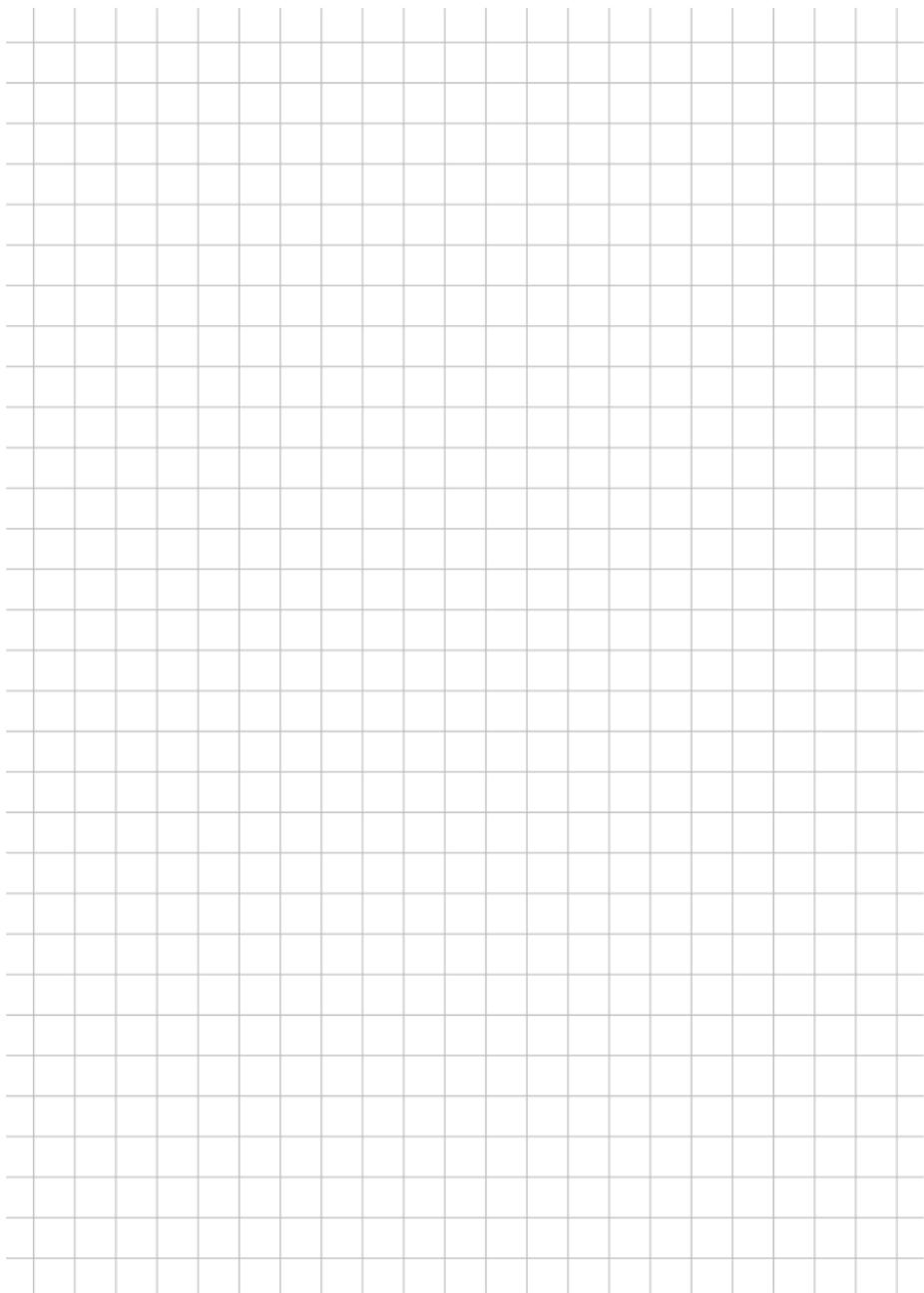
Интерпретация результатов и хранение антител

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 $+4^{\circ}\text{C}$ во избежание многократного замораживания-оттаивания. Стабильность конъюгатов определяется стабильностью самого антитела, а не флуорофора. Не следует хранить меченые антитела на прямом солнечном свете, однако они вполне совместимы с комнатным освещением.









22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

