



ООО «Абисенс»

ОГРН 1187746448977, ИНН 9710059340, КПП:
236701001
354340, Краснодарский край, ф.т. Сириус, пгт. Сириус,
пр-кт Олимпийский, д.1, помещ 1-07-13
Почта: 141700, Московская область, г. Долгопрудный,
ул. Дирижабельная, 13, а/я 3.
Тел: +7(495)973-39-93 E-mail: contact@abisense.com
р/сч: 40702810270010282764
в Московский филиал АО КБ "Модульбанк",
БИК: 044525092, к/сч: 30101810645250000092

Паспорт на
реагент производства ООО «Абисенс»
AbiFlow SP-Agarose, AbiFlow Q-Agarose, AbiFlow CM-Agarose

Условия хранения: реагент необходимо хранить при температуре 2 – 8 °С в защищённом от света месте. Не замораживать!



Ознакомьтесь с инструкцией по технике безопасности перед использованием.

По соображениям безопасности транспортировки, поставляемый флакон с носителем **не содержит** консерванта и может храниться в таком виде не более 2 дней. В случае более длительного срока хранения рекомендуем руководствоваться следующей таблицей для расчёта объёма 96% этанола, который надо добавить в транспортный флакон для получения 20% спиртового раствора.

Заказанный объем носителя, мл	Объем суспензии в транспортном флаконе, мл	Объем 96% этанола, который надо добавить для получения 20% раствора для хранения, мл
10	16.0	4.0
25	40.0	10.0
50	80.0	20.0
100	160.0	40.0
250	400.0	100.0

Носители для ионообменной хроматографии (ИОХ) от компании ООО «Абисенс» представляют собой сферические агарозные микрочастицы, к которым пришиты отрицательно или положительно заряженные ионные группы. Смолы-носители, содержащие сильные ионообменные группы (Q и SP), сохраняют свой заряд в широком диапазоне значений pH, что позволяет выбирать наиболее подходящий pH для работы с каждым конкретным образцом. Для слабых смол-ионообменников (DEAE и CM) степень ионизации и, следовательно, обменная емкость сильно варьируются в зависимости от pH. Слабые ионообменники обладают альтернативной селективностью, но в более узком рабочем диапазоне pH.

Этапы ИОХ:

1. Уравновешивание смолы.

Первым шагом является уравновешивание стационарной фазы до желаемых начальных условий. Когда наступает равновесие, все заряженные группы неподвижной фазы связаны с противоионами, способными к обмену, такими как Cl^- или Na^+ . Значение pH и ионная сила стартового буфера подбирается таким образом, чтобы при загрузке образца интересующие белки связывались с носителем, и чтобы максимальное количество примесей при этом не связывалось. Значение pH стартового буфера должно быть как минимум на 0.5–1 единицу pH выше pI целевого белка при использовании анионита (Q, DEAE) и на 0.5–1 единицу pH ниже pI целевого белка при использовании катионита (SP, CM). Для образцов с неизвестными данными по изменению заряда в зависимости от pH попробуйте следующее:

- для анионообменника (Q):

стартовый буфер: pH 8.0

буфер для элюирования: стартовый буфер, включающий 1 M NaCl, pH 8.0.

- для катионообменника (SP):

стартовый буфер: pH 6.0

буфер для элюирования: стартовый буфер, включающий 1 M NaCl, pH 6.0.

Если селективность при использовании сильного ионообменника (Q или SP) неудовлетворительная, попробуйте вместо этого использовать слабый ионообменник (DEAE или CM).

2. Нанесение образца и промывка смолы.

Второй этап – нанесение образца и промывка. Целью этого этапа является максимальное связывание целевой молекулы \ молекул и удаление всех остальных молекул-примесей. Буфер, с которым наносится образец, должен иметь тот же pH и ионную силу, что и стартовый буфер для уравновешивания смолы, чтобы связывать все целевые белки. Таким образом, белки с зарядом, отличным от заряда носителя, свяжутся с ионными группами

носителя, концентрируясь на нем. Незаряженные белки или белки с тем же зарядом, что и ионные группы на смоле, проходят через колонку, не взаимодействуя с ней.

3. Элюирование.

Когда образец нанесен и колонка промыта стартовым буфером, необходимо элюировать связанные белки. Чаще всего это делают за счет увеличения ионной силы (концентрации соли) буфера, а иногда – за счет изменения pH. При увеличении ионной силы возрастает концентрация ионов солей (обычно Na^+ или Cl^-), которые конкурируют со связанными молекулами за заряды на поверхности носителя. При этом один или несколько связанных белков начинают элюироваться и перемещаться вниз по колонке. Белки с наименьшим результирующим зарядом при выбранном pH будут первыми выходить из колонки по мере увеличения ионной силы, а белки с наибольшим зарядом будут удерживаться сильнее всего и будут элюироваться последними. Чем выше суммарный заряд белка, тем выше должна быть ионная сила, чтобы этот белок с колонки смыть. Контролируя изменения ионной силы и используя разные формы градиента (так называемые *gradient elution* и *step elution*), можно получать нужные белки в очищенной, концентрированной форме.

4. Регенерация колонки.

Промывка буфером с высокой ионной силой (1 М NaCl) регенерирует колонку и удаляет любые молекулы, которые могли остаться после этапа элюции. Также на этом этапе восстанавливается полная доступная ионная емкость смолы. Перед следующим использованием колонку вновь уравнивают нужным стартовым буфером.

5. Очистка (Cleaning-in-Place).

Cleaning-in-Place (CIP) – это процедура очистки, которая позволяет удалить загрязняющие вещества, такие как липиды, различные отложения или денатурированные белки, которые могут оставаться в колонке после регенерации. Регулярный CIP предотвращает накопление загрязнений в слое носителя и помогает сохранить емкость колонки, скорости потока и общую эффективность смолы.

Для каждого процесса в зависимости от типа присутствующих загрязнений нужно разрабатывать отдельный протокол CIP. Выполнять цикл CIP рекомендуется после каждых 1–5 циклов использования колонки.

Для удаления ионно-связанных белков колонку промывают 1 CV (CV = column volume, объем хроматографического носителя в колонке) 2 М NaCl в течение 10-15 мин. Для удаления отложений, гидрофобно-связанных белков и липопротеинов колонку промывают 2 CV 1 М NaOH в течение 1-2 ч. Для удаления липидов и очень гидрофобных белков колонку промывают 3 CV 0.5% раствора неионогенного детергента в 70% этаноле или 30% изопропаноле в течение 1-2 ч.

6. Химическая стабильность.

Носители AbiFlow 100 Agarose стабильны во всех распространенных рутинно-используемых водных буферах, 1 М NaOH, в денатурирующих агентах (8 М мочевины, 6 М гуанидина гидрохлорид), с неионогенными детергентами, в 70% этаноле, 1 М уксусной кислоте и 30% изопропанолем.

Не используйте катионные детергенты с SP или CM смолами.

Не используйте анионные детергенты с Q или DEAE смолами.

Избегайте окислителей.

7. Хранение.

AbiFlow 100 SP Agarose следует хранить в 0.2 М растворе ацетата натрия и 20% этаноле при 4-30°C. AbiFlow 100 Q Agarose, AbiFlow 100 CM Agarose, AbiFlow 100 DEAE Agarose следует хранить в 20% этаноле при 4-30°C.

Смолу НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ!

8. Общие рассуждения.

Какую смолу выбрать: катионообменную или анионообменную?

- Если целевой белок более стабилен при рН значениях ниже своего pI, следует использовать катионит.
- Если целевой белок более стабилен при рН значениях выше своего pI, следует использовать анионит.
- Если целевой белок стабилен при рН значениях как выше, так и ниже своего pI, можно использовать оба типа ионообменников.

Какой ионообменник выбрать: сильный или слабый?

- Большинство белков имеют значения pI в диапазоне 5.5-7.5 и, таким образом, могут быть разделены как на сильных, так и на слабых ионообменниках.
- В случаях, когда максимальное разрешение колонки достигается при экстремальных значениях рН и интересующие молекулы при этом стабильны, используйте сильный ионообменник.

Выбор буфера, рН и ионной силы.

- Обычно следует использовать самую высокую ионную силу, которая позволяет при этом связывать целевой белок.
- Требуемая концентрация буфера варьируется от белка к белку. Обычно для обеспечения адекватной буферной емкости нужна ионная сила хотя бы в 10 мМ.

- Поскольку соли (включая буферы) способствуют стабилизации белков в растворе, их концентрация должно быть достаточно высокой, чтобы предотвратить денатурацию и осаждение.

Паспорт безопасности:

Внимание: может причинять вред при впитывании через кожу и при проглатывании. А также вызывать раздражение слизистых оболочек и дыхательных путей, провоцируя аллергические реакции, симптомы астмы или затруднение дыхания. При появлении раздражения или аллергических реакций необходимо срочно обратиться к специалисту.

Меры предосторожности: избегать вдыхания и прямого попадания на слизистые оболочки, использовать перчатки и защитную одежду.

При попадании на кожу: промыть большим количеством воды с мылом в течение 15 минут. Удалить загрязнение с одежды, необходимо постирать одежду перед повторным использованием.

При вдыхании: вывести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему покой в удобном для дыхания положении.

При попадании в глаза: преимущественно держать веки открытыми, осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. При наличии контактных линз-предварительно их снять.

При проглатывании: промыть рот большим количеством воды, выпить воды (по меньшей мере два стакана). При плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью.

При появлении респираторных и аллергических симптомов, а также если пострадавший находится в бессознательном состоянии: обратиться за медицинской помощью.