



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 Magnetic 100 Ni-AZUR Agarose**

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



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, мкл	Объем суспензии в транспортном флаконе, мл	Объем 96% этанола, который надо добавить для получения 20% раствора для хранения, мл
100	2 × 0.8 мл	2 × 0.2 мл
250	5 × 0.8 мл	5 × 0.2 мл
500	10 × 0.8 мл	10 × 0.2 мл

Традиционно очистка с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии (МХАХ, Immobilised Ion Affinity Chromatography – ИМАС) белков, секретируемый в супернатантах культур эукариотических клеток, сопровождается частыми проблемами, связанными с несовместимостью носителя со средой для культивирования клеток, которая стремится «содрать» иммобилизованные на носителе ионы никеля во время нанесения образца на колонку. Результатом является низкое, либо практически нулевое связывание целевого белка с носителем.

Помимо этого, очистка осложняется еще и тем, что концентрация целевого белка в супернатанте часто бывает очень низкой. Это приводит к необходимости использовать большие объемы образцов, что также приводит к повышенному отщеплению ионов металлов.

Для того, чтобы преодолеть эти проблемы, требуется значительная предварительная подготовка образца, а именно замена буфера с помощью ультрафильтрация в сочетании с процедурами концентрирования. Такая предварительная пробоподготовка отнимает время и может оказаться потенциально опасной для чувствительных к изменению условий белков.

Благодаря использованию AbiFlow Magnetic 100 Ni-AZUR Agarose процедуры предварительной пробоподготовки можно свести к минимуму.

AbiFlow Magnetic 100 Ni-AZUR Agarose является магнитным носителем для МХАХ белков. Микрочастицы заряжены ионами никеля, который прочно связан со специально разработанным хелатирующим лигандом AZUR. Ионы никеля остаются на смоле даже после 24-часовой инкубации в 10 мМ ЭДТА.

Образцы, обычно вызывающие отщепление ионов металлов, можно безопасно наносить прямо на смолу без трудоемких процедур предварительной пробоподготовки. Примерами образцов, которые часто вызывают подобные проблемы, являются супернатанты клеточных культур, содержащие секретируемые белки, меченные полигистидином, из эукариотических клеток, таких как клетки насекомых или клетки CHO. AbiFlow Magnetic 100 Ni-AZUR Agarose также подходит для очистки белков из других образцов, вызывающих ion-stripping из традиционных носителей для МХАХ.

Для образцов, не проявляющих в значительной мере свойств отщепления ионов металлов, рекомендуется использовать носитель AbiFlow Magnetic 100 Ni-AZUR Agarose, который обычно демонстрирует более высокую аффинность к белкам, меченым His-Tag.

Важные замечания перед началом работы:

- Носитель AbiFlow Magnetic 100 Ni-AZUR Agarose предназначен для одноразового использования.
- При использовании магнитного планшета выньте магнит, прежде чем добавлять жидкость, и наоборот, вставьте магнит перед удалением жидкости.
- Дозирование суспензии магнитных микрочастиц: перед дозированием гомогенизируйте суспензию путем тщательного встряхивания флакона, после ресуспендирования немедленно отберите необходимый объем суспензии в рабочую пробирку. Микрочастицы быстро осаждаются, поэтому рекомендуется ресуспендировать частицы между каждым пипетированием.
- Рекомендованные буферы: связывающий буфер 20 мМ NaH_2PO_4 , 500 мМ NaCl , pH 7.4; промывочный буфер 20 мМ NaH_2PO_4 , 500 мМ NaCl , 0-30 мМ имидазол, pH 7.4; элюирующий буфер 20 мМ NaH_2PO_4 , 500 мМ NaCl , 500 мМ имидазол, pH 7.4.

Для минимизации содержания нецелевых белков в элюате рекомендуется добавлять имидазол в низких концентрациях в промывочный буфер. Однако для некоторых целевых белков даже небольшое увеличение концентрации имидазола в промывочном буфере может привести к его частичному элюированию. Поэтому нужно подбирать концентрацию имидазола таким образом, чтобы обеспечить баланс высокой чистоты (низкое связывание нецелевых белков клетки-хозяина) и высокого выхода (сильное связывание меченного полигистидином целевого белка). Для повышения чистоты используются более высокие концентрации имидазола в промывочном буфере. Обычно для супернатантов клеточных культур насекомых тоже нужны более высокие концентрации имидазола, чем для, например, супернатантов клеточной культуры СНО.

Оптимальная концентрация имидазола, обеспечивающая наилучшие результаты, зависит от конкретного образца и обычно ниже для AbiFlow Magnetic 100 Ni-AZUR Agarose, чем для AbiFlow Magnetic 100 Ni-AZUR Agarose. Нахождение оптимального концентрации имидазола для конкретного белка следует проводить методом проб и ошибок, но в целом, концентрация от 10 до 20 мМ в промывочном буфере является хорошим стартом для большинства белков.

Если промывочный буфер содержит имидазол, элюирование следует проводить немедленно сразу после этапа промывки, так как длительное выдерживание образца в промывочном буфере может привести к частичной потере целевого белка.

Ниже приведен общий протокол очистки:

1. Тщательно гомогенизируйте суспензию магнитных микрочастиц, отберите 200 мкл суспензии, поместите ее в пробирку объемом 1.5 мл. Поместите пробирку в магнитный штатив и удалите консервирующий буфер.
2. Добавьте 500 мкл связывающего буфера, ресуспендируйте частицы, отбросьте жидкую фазу.
3. Сразу же перенесите частицы в большую пробирку, содержащую 10 мл образца. Ресуспендируйте микрочастицы и инкубируйте смесь в течение 4 часов при перемешивании. Поместите пробирку в магнитный штатив, отбросьте жидкую фазу.
4. Добавьте 500 мкл связывающего буфера, вновь перенесите микрочастицы в пробирку на 1.5 мл, ресуспендируйте частицы, отбросьте жидкую фазу. Повторите этап отмывки еще два раза.
5. Добавьте 200 мкл элюирующего буфера, ресуспендируйте частицы и инкубируйте их в течение 1 минуты, соберите элюат (эта фракция содержит основную часть очищенного белка). При необходимости повторите этап элюирования.

Протоколы, рекомендованные в данной инструкции, подходят для очистки большинства белков, меченных His-Tag. Тем не менее, некоторые условия могут потребовать оптимизации. Условия, на которые следует обратить внимание при планировании эксперимента:

- объем пробы;
- количество магнитных микрочастиц;
- время инкубации образца;
- концентрация имидазола во время этапа отмывки;
- количество отмывок;
- состав буфера, pH и т.д.

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.



Содержит ионы тяжелых металлов!

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.