

Мечение биомолекул активированными эфирами

Активированные эфиры, такие как NHS- (N-гидроксисукцинимидные), а также другие (sulfo-NHS, STP-), являются реакционноспособными производными, способными модифицировать аминокетильные группы биомолекул. Наиболее часто используются NHS-эфиры.

С помощью активированных эфиров часто вводят репортерные группы, такие как флуоресцентные красители. Алкины и азидогруппы могут быть также введены в состав биомолекул с помощью соответствующих активированных эфиров для того, чтобы подготовить биомолекулы к модификации через клик-реакции.

Поскольку почти все белки и пептиды содержат аминокетильные группы, их модификация особенно часто проводится посредством активированных эфиров. Другие биомолекулы, которые могут быть помечены — аминокетильные ДНК, олигонуклеотиды с аминокетильным, и аминокетильные сахара.

Реакция активированных эфиров с аминами проявляет существенную зависимость от pH. При низких значениях pH происходит протонирование аминокетильных групп, в результате чего снижается эффективность реакции. При высоких значениях pH существенным становится процесс гидролиза активированного эфира. Оптимальным значением pH для модификации является 8.3-8.5.

Обычно в качестве растворителя для модификации биополимеров используют воду. Поскольку многие активированные эфиры имеют низкую растворимость в воде, в качестве соразтворителя применяют диметилсульфоксид (ДМСО) или диметилформамид (ДМФ). Раствор активированного эфира в органическом растворителе прибавляют к раствору биополимера в буфере, обеспечивающем оптимальное значение pH. Диметилформамид может портиться при хранении, при этом в нем накапливается диметиламин, способный реагировать с активированными эфирами. Поэтому ДМФ для мечения должен быть хорошего качества (при этом он не имеет запаха диметиламина).

Мы рекомендуем следующий общий протокол для мечения активированными эфирами.

1. Рассчитайте количество активированного эфира:

$$\text{МассаАктивированногоЭфира [мг]} = 8 \times \text{МассаАмина [мг]} \times \frac{\text{МолекулярнаяМассаАктивированногоЭфира [Да]}{\text{МолекулярнаяМассаАмина [Да]}}$$

Число 8 — избыток активированного эфира. Это экспериментальное значение для достижения моно-мечения, обычное для водорастворимых белков и пептидов. Во многих случаях, однако, это значение необходимо оптимизировать, так как оно зависит от структуры и растворимости белка и активированного эфира. Молекулярные массы активированных эфиров Lumiprobe могут быть найдены на страницах соответствующих продуктов.

Например, чтобы пометить 3 мг BSA (молекулярная масса 69300 Да) активированным эфиром Cy5 NHS (молекулярная масса 592 Да), и получить в среднем монопомеченный продукт, необходимо взять $8 \times 3 \text{ мг} \times 592 \text{ Да} / 69300 \text{ Да} = 0.21 \text{ мг}$ активированного эфира Cy5 NHS.

2. Определите объем реакционной смеси. Реакцию можно проводить на любой шкале от наномолей до десятков граммов. При мечении минимальных количеств используйте минимальный объем реакции (10-20 мкл).
Оптимальная концентрация белка для мечения составляет 1-10 мг на мл смеси и более.

3. Растворите активированный эфир в чистом ДМФ или ДМСО (1/10 объема реакционной смеси). Для водорастворимых активированных эфиров можно использовать воду (водный раствор необходимо использовать и нельзя хранить). Растворы в безводном ДМФ можно на протяжении 1-2 месяцев при -20°C.
4. Растворите амин (белок, аминок-ДНК и т.д.) в буфере pH 8.3-8.5 (объем — 9/10 реакционной смеси). Можно использовать 0.1 М раствор бикарбоната натрия (NaHCO₃). Альтернативные буферы — 0.1 М Трис (хотя Трис содержит аминогруппу, она является малореакционноспособной в отношении активированных эфиров), или 0.1 М фосфатный буфер с pH 8.3-8.5. Значение pH буфера наиболее важно для успеха реакции.
При мечении значительных количеств веществ (когда количество активированного эфира составляет сотни миллиграмм) следует учитывать тенденцию к закислению смеси при гидролизе активированного эфира. Необходимо использовать более концентрированный буфер и следить за значением pH.
5. Добавьте раствор активированного эфира к раствору амина в буфере и хорошо размешайте на вортексе. Инкубируйте на льду в течение ночи, или при комнатной температуре в течение по меньшей мере 4 часов.
6. Очистите конъюгаты с помощью подходящего метода. Для макромолекул наиболее подходит гель-фильтрация. Можно использовать переосаждение или хроматографию. Органические примеси (такие как N-гидроксисукцинимид, активированный эфир и соответствующая кислота, образующаяся при гидролизе), как правило, хорошо отделяются от продукта. Для белков и нуклеиновых кислот можно использовать осаждение этанолом или ацетоном.

Lumiprobe Corporation

201 International Circle, Suite 135
Hunt Valley, Maryland 21030
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH

Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com