

Мечение активированными эфирами биомолекул, содержащих первичные аминогруппы

Активированные эфиры, такие как NHS- (N-гидроксисукциниimidные), а также другие (sulfo-NHS, STP-), являются реакционноспособными производными, способными модифицировать аминогруппы 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 аминогруппы, их модификация особенно часто проводится посредством активированных эфиров. Другими примерами являются модификации аминоолигонуклеотидов, аминомодифицированная ДНК и аминосодержащие сахара.

Реакция активированных эфиров с аминами проявляет существенную зависимость от pH. При низких значениях pH происходит протонирование аминогрупп, в результате чего снижается эффективность реакции. При pH выше оптимального гидролиз активированного эфира происходит слишком быстро, и выход модифицированной молекулы снижается. 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 сорасторителя применяют [диметилсульфоксид \(ДМСО\)](#) или диметилформамид (ДМФ). Раствор активированного эфира в органическом растворителе добавляют к раствору биополимера в буфере, обеспечивающем оптимальное значение pH.

Важно! Диметилформамид при хранении может разлагаться до диметиламина, который имеет рыбный запах и способен реагировать с активированными эфирами. Поэтому для мечения важно использовать [высококачественный ДМФ](#), не содержащий диметиламина и не имеющий рыбного запаха.

Мы рекомендуем следующий общий протокол для мечения активированными эфирами от Lumiprobe:

1. Рассчитайте необходимое количество активированного эфира, используя приведенную ниже формулу или наш [калькулятор мечения белков](#):

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

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 66500 Да) активированным эфиром Cy5 NHS (молекулярная масса 616 Да),

Lumiprobe Corporation

115 Airport Dr Suite 160
Westminster, Maryland 21157
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH

Fedor-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

Lumiprobe Limited

Suite 12, 3/F, Great Eagle Centre
23 Harbour Road, Wan Chai
Hong Kong
Mob.: +852-5929-0488 (from HK)
Phone: +86-147-14316277 (from China)
Email: hk@lumiprobe.com

Lumiprobe LTD

2 Tuvim St.
3223562, Haifa
Israel
Phone: +972-(0)4-374-0377
Email: il@lumiprobe.com

Lumiprobe Co., Ltd.

10H-11, Shenmao Commercial Center
No. 59 Xinxin Rd., Meiling Community
Lianhua Street, Futian District
Shenzhen, China
Phone: +86-1471431-6277
Email: cn@lumiprobe.com

и получить в среднем мономеченный продукт, необходимо взять $8 \times 3 \text{ mg} \times 616 \text{ Да} / 66500 \text{ Да} = 0.22 \text{ mg}$ 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 1/10 реакционного объема воды, ДМФ или ДМСО. Вода или ДМФ, не содержащий диметиламина, являются предпочтительными растворителями. Активированные эфиры, растворенные в ДМФ, могут храниться в растворе в течение 1-2 месяцев при -20°C. Водные растворы NHS-эфиров следует использовать сразу после приготовления.
4. Растворите амин (белок, амино-ДНК и т.д.) в буфере с pH 8.3-8.5 объемом 9/10 реакционной смеси.

Обычно используют 0.1 М раствор бикарбоната натрия (NaHCO₃). В качестве альтернативы можно использовать 0.1 М фосфатный буфер. Значение pH буфера наиболее важно для качества реакции. Избегайте использования буферов, содержащих амины. Можно использовать буфера на основе Tris, однако это не рекомендуется, поскольку Tris содержит аминогруппу (хотя ее сродство к активированным сложным эфирам незначительно).

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 ворте.
- Инкубируйте на льду в течение ночи, или при комнатной температуре в течение от 1 до 4 часов.
6. Очистите коньюгаты с помощью подходящего метода. Для макромолекул наиболее подходит гель-фильтрация. Можно использовать переосаждение или хроматографию. Для белков и нуклеиновых кислот можно использовать осаждение этанолом или ацетоном. Органические примеси (такие как N-гидроксисукцинимид, активированный эфир и соответствующая кислота, образующаяся при гидролизе), как правило, хорошо отделяются от продукта.