Конъюгация стрептавидина с биотином

Стрептавидин представляет собой тетрамерный биотин-связывающий белок, выделенный из бактерии *Streptomyces avidinii*. Стрептавидин способен с высокой аффинностью и селективностью связывать до четырех молекул биотина посредством множественных водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Из-за отсутствия углеводных модификаций и близкого к нейтральному pI, стрептавидин демонстрирует меньшее неспецифическое связывание, в сравнении с другим биотин-связывающим белком — авидином. Стрептавидин обладает высокой термостабильностью и устойчивостью к экстремальным значениям pH, денатурирующим агентам и ферментативной деградации, что позволяет использовать его в широком спектре экспериментальных условий.

Флуоресцентные конъюгаты стрептавидина обычно используют в качестве реагента второй ступени для специфического обнаружения различных биотин-меченых биомолекул, таких как белки (антитела и др.), нуклеиновые кислоты, липиды в протоколах непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания, вестерн-блоттинге, проточной цитометрии, микропланшетном анализе и других методах детекции.

Lumiprobe предлагает линейку флуоресцентно меченных стрептавидинов, охватывающих все наиболее используемые длины волн для микроскопии и проточной цитометрии:

Каталожный номер	Флуорофор	Возбуждение, нм	Эмиссия, нм
x1AS0	AMCA	348	435
x18S0	AF 488	495	519
x68S0	AF 594	586	613
x13S0	sulfo-Cyanine3	548	563
x33S0	sulfo-Cyanine5	646	662

Области применения

- Конъюгаты стрептавидина используются в качестве реагента второй ступени мечения в гисто- и цитохимии, проточной цитометрии, блот- и иммуноанализе.
- Конъюгаты стрептавидина также можно использовать для локализации производных биотина, широко использующихся в качестве нейроанатомических трейсеров: биоцитина, биоцитина-X, биотина этилендиамина и флуоресцентно меченного биоцитина.
- Конъюгаты стрептавидина можно предварительно смешивать с биотином для образования комплекса стрептавидин-биотин и проведения стрептавидин-биотиновой (sABC) амплификации сигнала.

Lumiprobe Corporation
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valey, 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

Приготовление и хранение стоковых растворов

- Конъюгаты стрептавидина поставляются лиофилизированными в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,4.
- Разведите 100 мкг порошка конъюгата стрептавидина (A1AS0, A18S0, A68S0, A13S0, A33S0) в 100 мкл дистиллированной или деионизированной воды для получения стокового раствора с концентрацией 1 мг/мл.
- Разведите 1 мг порошка конъюгата стрептавидина (11AS0, 118S0, 168S0, 113S0, 133S0) в 1 мл дистиллированной или деионизированной воды для получения стокового раствора с концентрацией 1 мг/мл.
- Восстановленные растворы стрептавидина стабильны в течение примерно шести месяцев при добавлении азида натрия до конечной концентрации 5 мМ или тимеросала до 0,2 мМ.
- Для длительного хранения стоковый раствор можно разделить на аликвоты и заморозить при температуре ниже -20 °C. Аликвоты необходимо хранить защищенными от света. Не допускайте многократного замораживания и оттаивания раствора.

Протокол

Прежде чем начать

- Избегайте использования растворов, содержащих биотин (некоторые сыворотки, RPMI 1640 и др.), в качестве разбавителей.
- Растворы белков (антител или стрептавидина) рекомендуется ненадолго центрифугировать в микроцентрифуге перед использованием и в эксперимент брать только супернатант. Данная процедура уменьшает неспецифическое фоновое окрашивание за счет устранения белковых агрегатов, которые могут образовываться в растворе при хранении.
- Выполните предварительное титрование растворов антител и стрептавидина для определения их наиболее оптимальных концентраций. Рекомендуется начинать с фиксированной концентрации биотинилированных антител, используя рекомендованное поставщиком их разведение, и титровать флуоресцентно меченный стрептавидин относительно этого количества. В случае сильного неспецифического окрашивания, необходимо оттитровать первичные антитела, используя фиксированное количество флуоресцентно меченного стрептавидина.
- Хотя стрептавидин дает незначительное фоновое окрашивание, рекомендуется выполнять этап блокирования неспецифических мест связывания антител, который предусмотрен в большинстве протоколов иммунохимии.
- При проведении блоттинга на мембранах рекомендуется включать Tween® 20 (0,1–0,2% об./об.) и SDS (0,02–0,1% об./об.) в буфер на заключительном этапе инкубации, чтобы свести к минимуму неспецифическое фоновое окрашивание.

Ниже приведены наиболее используемые методы применения стрептавидина в качестве вторичного реагента для мечения.

Непрямой метод

Наиболее распространенным методом использования меченого стрептавидина является двухэтапный протокол окрашивания. Первым шагом является введение биотинилированного зонда в клетку, ткань или на поверхность. Второй

Lumiprobe Corporation
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valey, 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

этап — связывание флуоресцентно меченного стрептавидина с биотином зонда.

1. Инкубируйте клетки или ткань с биотинилированным зондом, таким как антитела, одноцепочечная нуклеиновая кислота или лектин, в соответствии с рекомендациями производителя зонда.
2. Промойте клетки/ткани PBS или другим подходящим буфером для удаления избытка биотинилированного зонда.
3. Разбавьте стоковый раствор конъюгата стрептавидина (1 мг/мл) буфером, чтобы приготовить рабочий раствор стрептавидина. В большинстве гисто- и цитохимических исследований используется конечная концентрация 0,5–10 мкг/мл. Поскольку протоколы окрашивания разных методов применения сильно отличаются друг от друга, подходящее разведение конъюгатов стрептавидина необходимо определять опытным путем.
4. Инкубируйте клетки с раствором меченого стрептавидина в течение 60 мин при комнатной температуре.
5. Промойте клетки/ткани несколько раз буфером для удаления избытка стрептавидина.

Прямой метод

Альтернативой непрямому методу является предварительное смешивание биотинилированных антител или других биотин-содержащих молекул с флуоресцентно меченным стрептавидином перед инкубацией с клетками или тканью. Прямой метод может потребоваться в случаях, когда для многоцветного окрашивания используется более одной биотинилированной молекулы. В этом случае каждую биотин-содержащую молекулу следует предварительно смешать с разными флуоресцентно меченными стрептавидинами.

Важно! *В редких случаях прямой метод не дает желаемого результата. Если к антителу присоединено избыточное число остатков биотина, либо они находятся слишком близко к антиген-связывающему сайту антитела, могут возникнуть стерические затруднения, препятствующие связыванию антител. В таких случаях для получения хорошего окрашивания предпочтительнее использовать непрямой метод.*

1. Смешайте биотинилированный зонд (антитела, одноцепочечная нуклеиновая кислота или лектин) с флуоресцентно меченным стрептавидином и выдержите полученный премикс около 30 мин при комнатной температуре. Премикс стабилен не менее 7 дней и может использоваться в течение недели после приготовления.

   Прямой метод требует оптимизации соотношения биотинилированного зонда и флуоресцентно меченного стрептавидина. Рекомендуемые соотношения зонда к стрептавидину для первоначального тестирования: 3:1, 1:1 и 1:3. Оптимизацию соотношения необходимо проводить только один раз для каждой пары биотинилированный зонд-стрептавидин.
2. Инкубируйте клетки или ткань с предварительно полученным комплексом зонд-стрептавидин в течение 60 мин или дольше при комнатной температуре.
3. Промойте клетки/ткани несколько раз буфером для удаления избытка стрептавидина.

Lumiprobe Corporation
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valey, 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